

Transgénèse et utilisation de séquences « barrière » permettant de s'affranchir des effets de position

La transgénèse est un puissant moyen d'étude de la régulation des gènes chez les eucaryotes, dans l'organisme adulte ou au cours du développement. L'aléa majeur de cette technique est l'effet de position imprimé au transgène (qui s'insère au hasard) par les séquences génomiques qui le flanquent. Des séquences « barrière », susceptibles de protéger le transgène, ont été identifiées et caractérisées dans les génomes de drosophile, de poulet et dans le génome humain. Bien que différentes, ces séquences semblent avoir conservé quelques propriétés isolantes au cours de l'évolution, en particulier par leurs effets sur l'organisation de la chromatine.

Pascale Lapie
Jean Deutsch

ADRESSES

Laboratoire de biologie du développement, Institut Jacques-Monod, Cnrs et université Paris 7, 75251 Paris Cedex 05, France.
P. Lapie: *chercheur, docteur de l'université Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6)*. Adresse actuelle: Inserm U. 134, hôpital de La Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France. J. Deutsch: *maître de conférences à l'université Pierre-et-Marie-Curie (Paris 6)*. Adresse actuelle: laboratoire d'évolution moléculaire, université Pierre-et-Marie-Curie, 9, quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France.

Le phénomène conduisant à une dérégulation de l'expression d'un gène sous l'influence d'éléments régulateurs du génome est classiquement nommé effet de position [1]. Cet effet peut être causé par des réarrangements chromosomiques qui altèrent l'expression génique, en déplaçant un gène intact d'un site à un autre du génome. Des maladies humaines peuvent en résulter. Des effets de position semblables sont couramment rencontrés lors des expériences de transgénèse réalisées chez la drosophile ou les mammifères. Ces effets seront variables en fonction du site d'intégration du transgène et ils peuvent être exercés par des séquences tant de l'euchromatine que de l'hétérochromatine. L'hété-

rochromatine est constituée principalement de séquences d'ADN non codantes répétées (ADN satellite), associées à des complexes protéiques. L'euchromatine, qui comporte la grande majorité des gènes, est, quant à elle, activement transcrite.

Les effets de position exercés par l'hétérochromatine

Le déplacement d'un gène près d'un bloc d'hétérochromatine conduit à l'apparition d'un phénotype particulier: la bigarrure ou *variegation*. La première mutation présentant un tel phénotype a été induite par les rayons X par Muller en 1930 [2] chez la drosophile. Cette mutation déplace le *locus white*, normalement situé à l'extrémité distale

RÉFÉRENCES

1. Wilson C, Bellen HJ, Gehring WJ. Position effects on eucaryotic gene expression. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 679-714.
2. Muller HJ. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J Genet* 1930; 22: 299-334.
3. Tartof KD, Bremer M. Mechanisms for the construction and developmental control of heterochromatin formation and imprinted chromosome domains. *Development* 1990; Suppl.: 35-45.
4. Locke J, Kotarski MA, Tartof KD. Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics* 1988; 120: 181-98.
5. Eissenberg JC. Position effect variegation in *Drosophila*: towards a genetics of chromatin assembly. *Bio Essays* 1989; 11: 14-7.
6. Gasser SM, Laemmli UK. Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* 1986; 46: 521-30.
7. McNabb SL, Beckendorf SK. *Cis*-acting sequences which regulate expression of the *sgs-4* glue protein gene of *Drosophila*. *EMBO J* 1986; 5: 2331-40.
8. Hiromi Y, Kuroiwa A, Gehring WJ. Control elements of the *Drosophila* segmentation gene *fushi tarazu*. *Cell* 1985; 43: 603-13.
9. Stief A, Winter DM, Stråling WH, Sippel AE. A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* 1989; 341: 343-5.
10. Bonifer C, Vidal M, Grosveld F, Sippel AE. Tissue specific and position independent expression of the complete gene domain for chicken lysozyme in transgenic mice. *EMBO J* 1990; 9: 2843-8.
11. Udvardy A, Maine E, Schedl P. The 87A7 chromomere. Identification of novel chromatin structures flanking the heat shock locus that may define the boundaries of higher order domains. *J Mol Biol* 1985; 185: 341-58.
12. Udvardy A, Schedl P. Dynamics of chromatin condensation: redistribution of Topoisomerase II in the 87A7 heat shock locus during induction and recovery. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7522-30.

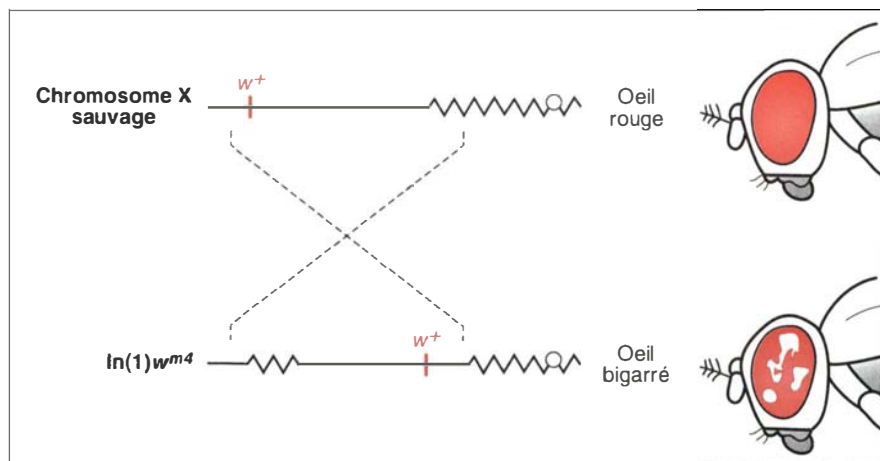


Figure 1. **Mutation à phénotype variegated ou bigarré du gène white: *In(1) w^{M4}***. Le locus white (w^+) est localisé dans l'euchromatine (ligne droite) sur le chromosome X. Le phénotype de l'œil de la mouche est sauvage: couleur rouge vif. L'inversion *In(1)w^{M4}* résulte d'une cassure du chromosome X adjacente au locus white et d'une cassure dans la région hétérochromatique péricentromérique (ligne en zigzag). Ainsi le gène white est juxtaposé à l'hétérochromatine. L'œil de la mouche est de phénotype bigarré (variegated), se traduisant par la présence de régions pigmentées (gène white actif) et non pigmentées (gène white inactif). (D'après [5].)

du chromosome X, à proximité de l'hétérochromatine péricentromérique. Ce bloc d'hétérochromatine exerce une répression variable d'une cellule à l'autre sur le gène *white* dont le produit contrôle la pigmentation de l'œil. Cette répression est héritée de façon clonale; chez les drosophiles mutantes présentant une bigarrure, l'œil contient des secteurs colorés (phénotype $white^+$) juxtaposés à des secteurs non pigmentés (phénotype $white^-$) (figure 1). D'après le modèle de Tartof *et al.* [3-5], l'hétérochromatine se formerait par assemblage d'un complexe de protéines autour d'une séquence d'initiation. Le simple jeu de la loi d'agation de masse aboutirait à la propagation de ce complexe, donc de la structure hétérochromatique, du point d'initiation vers une séquence de terminaison. Lors d'une inversion ou d'un réarrangement chromosomique, le déplacement du site de terminaison peut conduire à un envahissement de l'euchromatine par l'hétérochromatine. La fin de la propagation du complexe hétérochromatique dépend de manière aléatoire du dosage des différentes composantes

du complexe. Le gène déplacé est inactivé dans les cellules où il est capté dans le bloc d'hétérochromatine.

Les effets de position exercés par l'euchromatine

Un autre type d'effet de position met en jeu des séquences euchromatiques. Ces effets de position peuvent être causés par la fusion d'un gène à une séquence régulatrice d'un autre gène, à la suite d'un remaniement chromosomique. Dans d'autres cas, les séquences de type *enhancer* d'un élément transposable s'intégrant à proximité d'un gène sont responsables de ces effets. Les manifestations de ces effets de position sont couramment observées lors des expériences de transgénèse chez la drosophile et chez les mammifères. Lorsque le transgène s'intègre dans une région euchromatique, son expression est souvent affectée par les séquences génomiques de type *enhancer* ou *silencer* voisins du site d'intégration. Des travaux récents permettent maintenant de réaliser la transgénèse tout en s'affranchissant

de ces effets de position. Ces méthodes sont basées sur l'utilisation des propriétés de séquences d'ADN « isolantes » ou « barrière ».

Les séquences isolant des effets de position

Les séquences d'attachement à la matrice nucléaire (SAR)

Chez les eucaryotes, la chromatine est organisée en domaines. Des boucles de chromatine seraient formées grâce à l'interaction de séquences d'ADN particulières, les SAR (*scaffold associated region*), avec la matrice nucléaire (figure 2). En plus d'une fonction structurale, cette compartimentation du génome pourrait jouer un rôle fonctionnel en isolant d'éléments régulateurs externes l'ADN d'un domaine compris entre deux séquences SAR.

Les travaux de Gasser et Laemmli en 1986 [6] ont permis d'isoler et de caractériser des séquences SAR dans des gènes de drosophile. Généralement, ces séquences d'une taille d'environ 1 kilobase sont localisées dans les séquences non codantes et encadrent les gènes. Néanmoins, dans le cas du *locus hsp70* de drosophile codant pour une protéine de choc thermique, une séquence SAR est retrouvée entre les deux unités divergentes de transcription de ce *locus*. Les éléments SAR possèdent des séquences consensus de fixation à un composant de la matrice nucléaire : la topoisomérase II, ainsi que de courtes séquences de 10 nucléotides riches en adénosine (*A box*) ou thymidine (*T box*). Des expériences de transgénèse chez la drosophile suggèrent que les séquences SAR ont la propriété d'isoler les transgènes des effets de position génomique. Des transgènes contenant le gène *sgs4* codant pour une des protéines de la glu produite par les glandes salivaires, ou le gène de segmentation *fushi tarazu* (*ftz*), dépourvus de leur élément SAR localisé à l'extrémité 3', ont une expression sensible aux effets de position [7, 8].

Cet effet isolant a aussi été montré par les travaux de Stief *et al.* [9], réalisés sur le gène codant pour le lysozyme chez le poulet. La transfection transitoire de macrophages de

poulet en culture par une construction dans laquelle une séquence SAR (élément A) du gène de lysozyme est introduite entre le promoteur et le *enhancer* de ce même gène entraîne le blocage de sa transcription. La transformation stable de ces macrophages par une construction contenant l'élément A de part et d'autre du transgène a un double effet. Le transgène est isolé des effets de position, et l'élément A active sa transcription. Cet effet isolant a aussi été observé lors d'expériences de transgénèse chez la souris en utilisant le gène complet du lysozyme de poulet [10]. Néanmoins, contrairement aux expériences de transfection de macrophages, aucun effet activateur exercé par les séquences SAR n'a été observé. Ces résultats contradictoires pourraient être expliqués par l'utilisation, cette fois-ci, du gène entier dans le transgène, respectant les distances entre les séquences *enhancer* et les séquences SAR.

Les séquences *scs* et *scs'* de drosophile

Chez la drosophile, le *locus* cytogénétique 87A7 contient 2 gènes *hsp70* codant pour une protéine de choc thermique de 70 kDa. Les deux séquences *scs* et *scs'* (*specialized chromatin structure*) qui le délimitent, mais qui sont distinctes des séquences SAR, présentent une organisation nucléoprotéique particulière, suggérant qu'elles constituent les barrières du domaine 87A7 [11]. Ces deux éléments sont définis par deux sites hypersensibles à l'action de la DNase I, encadrant une région « centrale » protégée d'environ 200 à 300 paires de bases (pb). Le choc thermique, qui induit l'expression des gènes de ce *locus*, modifie le profil de protection contre la DNase I ainsi que la localisation de la topoisomérase II autour de chaque élément [12]. On n'observe pas de grande similitude entre ces deux éléments, en dehors de leur richesse en nucléotides adénosine et thymidine (70 %) [13].

Ces séquences sont de bons candidats pour constituer des frontières isolant des domaines chromatiniens. Kellum et Schedl en 1991 [14] ont étudié, par transgénèse chez la drosophile, la sensibilité aux effets de

position d'un gène encadré par ces deux séquences. Le gène *white* a été utilisé comme gène rapporteur. Son expression est autonome, cellulaire et la coloration de l'œil est un indicateur sensible du niveau de transcription du gène. La présence des séquences *scs* et *scs'* de part et d'autre du gène *white* l'isole des effets de position. Dans tous les cas où l'insertion du transgène se produit dans une région euchromatique (9 lignées sur 10), le gène *white* présente un niveau sauvage d'expression se traduisant par une coloration

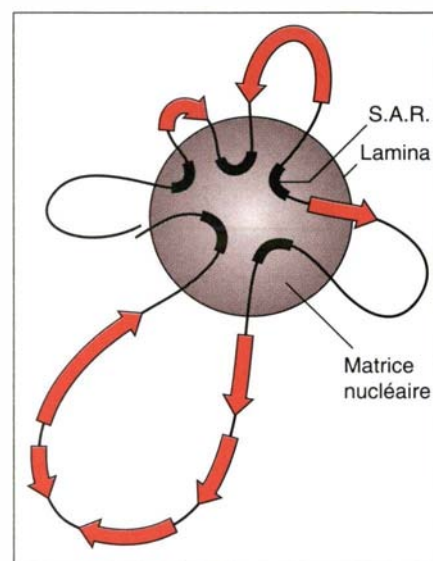


Figure 2. L'organisation de la chromatine en boucles d'après le modèle de Gasser et Laemmli. L'ADN génomique est organisé en boucles d'une taille variable, comprise entre 5 et 100 kb. Les boucles sont attachées à la matrice nucléaire au niveau de régions spécifiques d'ADN : les SAR (*scaffold associated region*). Les SAR, d'une longueur d'environ 1 kb, sont des séquences d'ADN non transcrites qui possèdent des motifs consensus de reconnaissance de la topoisomérase II. La matrice nucléaire est composée de plusieurs protéines dont la topoisomérase II. La lamina périphérique est aussi constituée de protéines. Chaque boucle peut contenir une ou plusieurs unités de transcription (flèche). Cette organisation compartimente le génome et permet d'isoler des domaines transcriptionnels actifs des éléments régulateurs externes. (D'après [34].)

RÉFÉRENCES

13. Farkas G, Udvardy A. Sequence of *scs* and *scs'* *drosophila* DNA fragments with boundary function in the control of gene expression. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 2604.
14. Kellum R, Schedl P. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* 1991; 64: 941-50.
15. Kellum R, Schedl P. A group of *scs* elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 2424-31.
16. Reitman M, Felsenfeld G. Developmental regulation of topoisomerase II sites and DNase I-hypersensitive sites in the chicken β -globin locus. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 2774-86.
17. Felsenfeld G. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 1992; 355: 219-24.
18. Chung JH, Whiteley M, Felsenfeld G. A 5' element of the chicken β -globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *drosophila*. *Cell* 1993; 74: 505-14.
19. Geyer PK, Corces VG. DNA position-specific repression of transcription by a *drosophila* zinc finger protein. *Genes Dev* 1992; 6: 1865-73.
20. Corces VG, Geyer PK. Interactions of retrotransposons with the host genome. *Trends Genet* 1991; 7: 86-90.
21. Dorsett D. Distance-independent inactivation of an enhancer by the suppressor of hairy-wing DNA-binding protein of *drosophila*. *Genetics* 1993; 134: 1135-44.
22. Modolell J, Bender W, Meselson M. *Drosophila melanogaster* mutations suppressible by the *suppressor of hairy-wing* are insertions of a 7.3 kilobase mobile element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1678-82.
23. Harrison DA, Gdula DA, Coyne RS, Corces VG. A leucine zipper domain of the suppressor of hairy-wing protein mediates its repressive effect on enhancer function. *Genes Dev* 1993; 7: 1966-78.
24. Parkhurst SM, Harrison DA, Remington MP, et al. The *drosophila su(Hw)* gene, which controls the phenotypic effect of the gypsy transposable element, encodes a putative DNA-binding protein. *Genes Dev* 1988; 2: 1205-15.

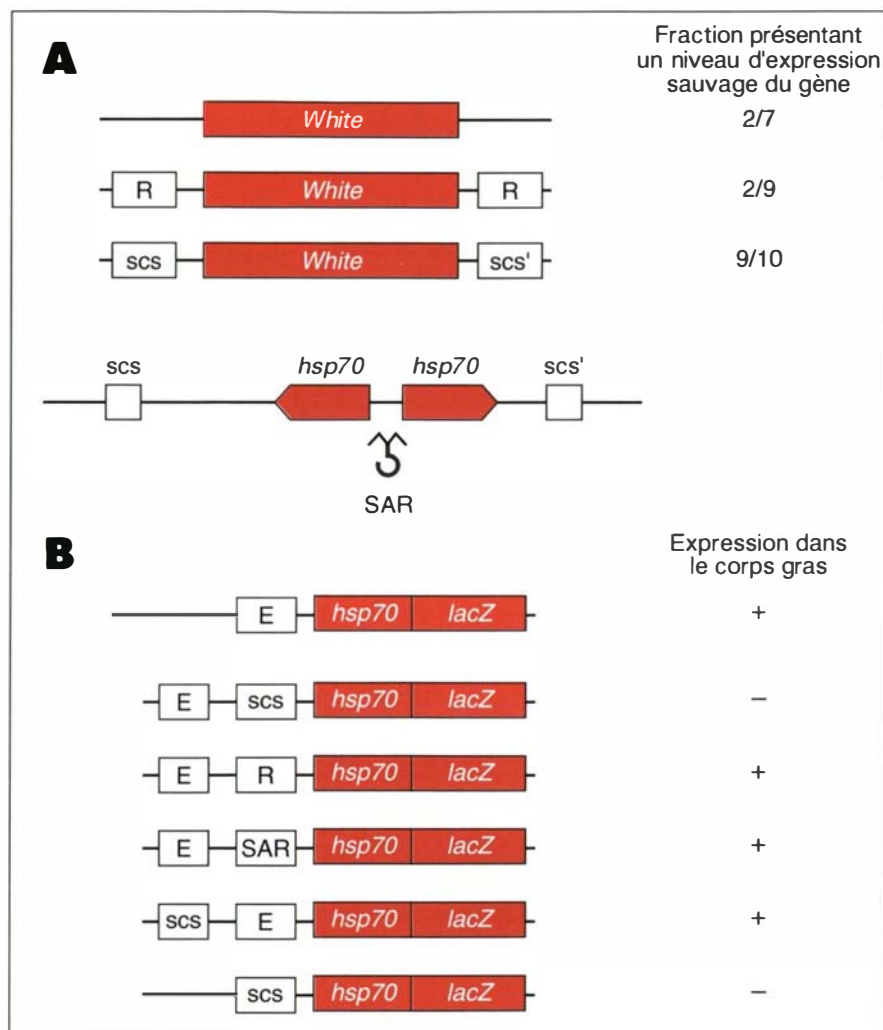


Figure 3. Effet barrière des séquences *scs* et *scs'* (specialized chromatin structure) sur un transgène contenant le gène *white*. **A.** La carte du locus *hsp70* localisé à la position cytologique 87A7 est schématisée en bas. Les deux gènes *hsp70* (boîte) sont flanqués par les séquences *scs* et *scs'* (carré). La séquence SAR (crochet) est localisée entre les deux unités de transcription divergentes. L'expression du gène *white*, introduit par transgène dans le génome de la *drosophile* à différents sites, est mesurée par la pigmentation de l'œil des lignées transgéniques. Le gène *white*, seul ou bordé par les séquences d'ADN du plasmide pBR322 (R), est sensible aux effets de position. En revanche, l'introduction de part et d'autre de ce gène des séquences *scs* et *scs'* bloque ces effets. **B.** Dans le corps gras, l'expression du gène *lacZ* fusionné au promoteur du gène *hsp70* est contrôlée par le enhancer (E) du gène *yp1* codant pour une des protéines vitellines. L'activation par cet enhancer est bloquée par la séquence *scs*, alors que les séquences du plasmide pBR322 (R) ou de la SAR du locus 87A7 (SAR) n'ont pas cet effet. (D'après [35].)

rouge vif de l'œil (*figure 3A*). En revanche, la substitution des séquences *scs* et *scs'* par un fragment d'ADN quelconque d'une même taille appartenant au plasmide pBR322 ne supprime pas les effets de position (*figure 3A*). La présence d'une séquence *scs*, ou de deux séquences *scs* et *scs'* localisées en amont du gène *white*, n'est pas suffisante pour conférer les propriétés isolantes. Pour protéger le gène des effets de position exercés par l'euchromatine, il est nécessaire de l'encadrer par une séquence *scs* et une séquence *scs'*. Les deux séquences *scs* et *scs'* d'une taille respective de 1,8 kb et 0,5 kb ne sont pas équivalentes. En revanche, l'intégration du transgène dans un site hétérochromatique induit une pigmentation bigarrée de l'œil (1 lignée sur 10). Ces séquences n'ont pas d'effet de barrière vis-à-vis des effets de position causés par l'hétérochromatine. Par ailleurs, les séquences *scs* et *scs'* n'activent pas la transcription d'un gène *white* s'exprimant à faible niveau (gène mini-*white*). Les expériences sur ces deux types de gènes *white* montrent que les séquences *scs* et *scs'* ont un effet « neutre », ni activateur ni répresseur, sur la transcription du gène qu'elles isolent.

Afin de vérifier que ces éléments bloquent les effets d'un *enhancer*,

Kellum et Schedl [15] ont introduit ces séquences entre un *enhancer* et un gène rapporteur dans un transgène (*figure 3B*). Le *enhancer* du gène *yp1* (*yolk protein 1*) de drosophile (codant pour une des protéines vitellines) contrôle la transcription de ce gène spécifiquement dans le corps gras. Dans la construction, il contrôle l'expression du promoteur *hsp70* auquel est fusionné le gène *lacZ* codant pour la β -galactosidase. L'activation du promoteur par le *enhancer* est bloquée lorsqu'une séquence *scs* ou *scs'* est introduite entre les deux (construction *E-scs-hsp70: lacZ*). Ce phénomène est indépendant de l'orientation de la séquence barrière. Des résultats comparables avec le *enhancer* du gène *ftz* (*fushi tarazu*) ont été obtenus [15].

L'élément 5' (5'HS₄) du locus β -globine de poulet

Les sites hypersensibles à la DNase I sont généralement situés dans les régions régulatrices des gènes. Deux types de sites hypersensibles à la DNase I ont été trouvés au locus β -globine de poulet [16] (*figure 4*): un site constitutif nommé 5'HS₄ (5' end hypersensitive site 4), présent dans tous les tissus quel que soit l'état de transcription du gène, et quatre sites spécifiquement sensibles dans les cel-

lules érythroïdes, localisés dans une région de contrôle de la transcription. Chez l'homme et la souris, cette région de contrôle nommée LCR (*locus control region*) activerait la transcription des gènes du locus β -globine ([17] pour revue).

Chung *et al.* [18] ont montré par des expériences de transfection stable de cellules érythroïdes humaines que l'élément 5'HS₄ peut protéger des effets de position le gène rapporteur *neo*, conférant la résistance à la néomycine. Pour observer cette protection, deux éléments sont nécessaires, un à chaque extrémité du gène rapporteur. Lorsque l'élément 5'HS₄ est intercalé entre le gène *neo* et la région LCR murine, l'activation du gène est bloquée. L'analyse de la structure chromatienne de ces transformants a permis de montrer que l'effet isolant est accompagné d'un changement de la compaction de l'ADN dans la construction intégrée. La région LCR décondense la chromatine au niveau du promoteur, permettant son activation. L'élément 5'HS₄, en revanche, empêche cette décondensation locale de la chromatine et bloque ainsi la transcription.

L'effet isolant de cet élément 5'HS₄ a été étudié *in vivo* par transgénèse chez la drosophile [18] en suivant la même approche que Kellum et Schedl [14]. Dans ce cas, un seul élément ne suffit pas mais deux éléments, de part et d'autre d'un gène rapporteur *white*, sont nécessaires pour isoler le transgène.

Un site hypersensible à la DNase I, nommé 5'HS₅, a été mis en évidence au locus β -globine humain, qui présente des propriétés semblables au site de poulet 5'HS₄ quant à l'expression des gènes globine (*figure 4*), suggérant une conservation au cours de l'évolution de cet élément: l'élément humain 5'HS₅, étudié dans les cellules érythroïdes, semble posséder lui aussi des propriétés isolantes, mais son effet est moins marqué que celui observé avec les séquences de poulet [18].

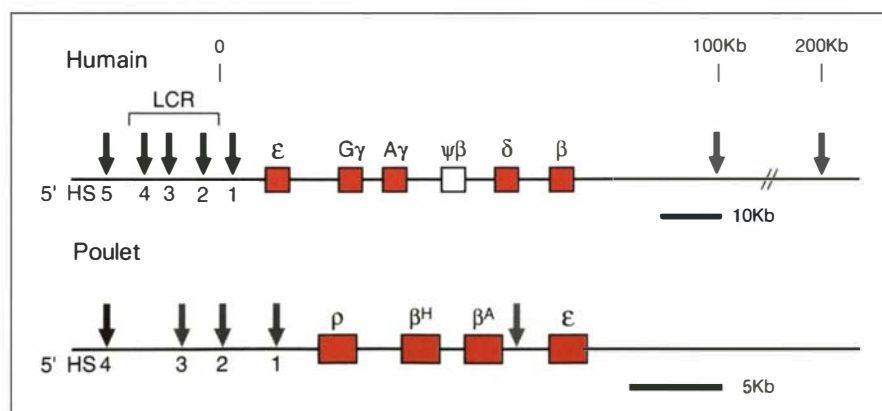


Figure 4. **Carte du domaine β -globine chez l'homme et le poulet.** Les différents gènes de ce locus sont schématisés par des boîtes. Les sites constitutifs d'hypersensibilité à la DNase I 5'HS₅ (5' end hypersensitive site 5) pour l'homme et 5'HS₄ (5' end hypersensitive site 4) pour le poulet sont représentés par des flèches noires. Les sites d'hypersensibilité à la DNase I spécifiques des cellules érythroïdes sont indiqués par des flèches grisées. La LCR (locus control region) humaine est aussi montrée. (D'après [18].)

La séquence isolante de l'élément transposable *gypsy*

Le rétrotransposon *gypsy*, présent dans le génome de la drosophile, a une longueur de 7,5 kb. Il code

RÉFÉRENCES

25. Spana C, Harrison DA, Corces VG. The *Drosophila melanogaster* suppressor of hairy-wing protein binds to specific sequences of the gypsy retrotransposon. *Genes Dev* 1988; 2: 1414-23.
 26. Roseman RR, Pirrotta V, Geyer PK. The su(Hw) protein insulates expression of the *Drosophila melanogaster* white gene from chromosomal position-effects. *EMBO J* 1993; 12: 435-42.
 27. Van Holde K. Properly preparing promoters. *Nature* 1994; 367: 512-3.
 28. Kim J, Shen B, Dorsett D. The *Drosophila melanogaster* suppressor of hairy-wing zinc finger protein has minimal effects on gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1993; 135: 343-55.
 29. Paro R. Imprinting a determined state into the chromatin of *drosophila*. *Trends Genet* 1990; 6: 416-21.
 30. Galloni M, Gyurkovics H, Schedl P, Karch F. The *bluetail* transposon: evidence for independent cis-regulatory domains and domain boundaries in the bithorax complex. *EMBO J* 1993; 12: 1087-97.
 31. Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, et al. Brahma: a regulator of *drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 1992; 68: 561-72.
 32. Randazzo FM, Khavari P, Crabtree G, Tamkun J, Rossant J. *brgl*: a putative murine homologue of the *drosophila* *brahma* gene, a homeotic gene regulator. *Dev Biol* 1994; 161: 229-42.
 33. Brunk BP, Martin EC, Adler PN. *Drosophila* genes *Posterior sex comb* and *Suppressor two of zeste* encode proteins with homology to the murine *bmi-1* oncogene. *Nature* 1991; 353: 351-3.
 34. Gasser SM, Laemmli UK. A glimpse at chromosomal order. *Trends Genet* 1987; 3: 16-22.
 35. Eissenberg JC, Elgin SCR. Boundary functions in the control of gene expression. *Trends Genet* 1991; 7: 335-40.
- pour des protéines de type rétroviral et possède à ses extrémités deux répétitions d'environ 500 pb nommées LTR (*long terminal repeat*). Lorsque l'élément *gypsy* s'insère entre un *enhancer* et le promoteur du gène *yellow*, l'activation par le *enhancer* est bloquée, conduisant à l'apparition d'un phénotype mutant (y-) [19, 20]. Les travaux de Dorsett [21] montrent que l'effet de barrière peut se produire même si l'élément est loin du promoteur qu'il bloque (jusqu'à 85 kb). Des mutations causées par l'insertion de cet élément dans le génome peuvent être inversées par une mutation à un autre site: le *locus suppressor of hairy-wing* (*Su(Hw)*) [22]. L'analyse de mutants thermosensibles du gène *Su(Hw)* montre que l'effet de barrière est réversible et se produit rapidement après fixation de la protéine su(Hw) sur le transposon *gypsy* [21]. Le gène *Su(Hw)* code pour une protéine contenant des motifs de liaison à l'ADN de type doigt à zinc [23, 24]. Elle se lie à un élément d'environ 370 pb (nommé BR), localisé en 3' du LTR 5' de l'élément *gypsy*, et aussi à 100 à 200 sites euchromatiques du génome de la drosophile [25]. Roseman *et al.* [26] ont étudié par transgénèse l'effet isolant de cette séquence cible de la protéine su(Hw) en suivant la même stratégie que celle employée par Kellum et Schedl [14, 15]. Pour cette expérience, le gène *mini-white*, conférant un œil de couleur jaune, est utilisé comme gène rapporteur, le *enhancer* (*Eye*) étant celui du gène *white* (*figure 5*). Cet élément de 370 pb (BR) bloque l'activation du gène *mini-white* par le *enhancer* (construction *Eye: BR>w*). L'effet de barrière est accentué si une seconde séquence BR est intégrée en 3' du gène *mini white* (construction *Eye: BR>w>BR*) (*figure 5*). Cet effet est dépendant de la protéine su(Hw): lorsque le gène *Su(Hw)* est muté, la protection du gène rapporteur est levée.
- Lorsque le transgène possédant les séquences isolantes BR s'insère dans une région hétérochromatique, l'œil des mouches transgéniques obtenues est bigarré. Cependant, cet effet est accentué dans le contexte génétique mutant pour le gène *su* (*Hw*). La protéine su (*Hw*), en se liant à sa séquence cible, aurait ainsi un effet suppresseur de bigarrure. Ce système possède une propriété supplémentaire par rapport aux deux autres systèmes présentés: il protège en partie des effets de position causés par l'hétérochromatine.

Conclusion

La perspective de pouvoir s'affranchir des effets de position dans des systèmes de transformation chez les mammifères serait d'une grande utilité pour la thérapie génique. L'isolement et la caractérisation des séquences barrière permet de l'envisager. Nous avons vu que des éléments isolants identifiés dans un organisme peuvent présenter la même fonction dans un autre. Cela suggère fortement que les protéines qui reconnaissent ces éléments et qui organisent la chromatine en domaines sont conservées au cours de l'évolution. Il est significatif que des éléments homologues soient identifiés et fonctionnent de manière semblable dans le *locus* β -globine de l'espèce humaine et du poulet.

Il est tout à fait remarquable que ces éléments aient conservé la même fonction chez la drosophile, où un tel *locus* n'est pas présent. La transgénèse chez la drosophile permet, ainsi, une étude sensible de ces éléments. L'utilisation d'un même test permet de comparer les propriétés de ces différents éléments. Si chacun des éléments que nous avons décrits présente des propriétés isolantes, au-delà de leurs différences de séquence apparaissent de légères différences dans leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, les séquences SAR n'ont pas toutes des propriétés isolantes, comme le montrent les expériences effectuées sur la séquence SAR du *locus hsp70* [15]. Par ailleurs, ces séquences ne semblent pas être toujours neutres en ce qui concerne la transcription puisque dans certains cas elles ont un effet activateur. Les éléments *scs* et *scs'*, en revanche, sont isolants et neutres pour la transcription. Mais ces deux éléments, bien que trouvés au même *locus*, ne sont pas équivalents d'un point de vue fonctionnel.



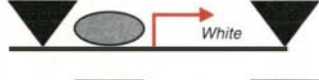


		Phénotypes				
		Jaune	Orange	Brun	Rouge	Bigarré
B.R. : Eye>w		0	0	5	2	0
Eye : B.R.>w		1	2	6	0	0
B.R. : Eye>w>B.R.		0	0	11	1	3
Eye : B.R.>w>B.R.		16	0	0	0	0
B.R.>w>B.R.		13	0	0	0	2

Figure 5. **Effet barrière de l'élément de 370 pb (BR) du rétrotransposon gypsy sur un transgène contenant le gène mini-white.** Le nombre de lignées transgéniques présentant différents types de pigmentation de l'œil est indiqué pour chaque construction testée. La région de fixation de la protéine su(Hw) est représentée par un triangle (BR). Le enhancer du gène white (Eye) est symbolisé par un cercle grisé. Le sens de transcription du gène mini-white est indiqué par une flèche. Le phénotype bigarré de l'œil observé dans certaines lignées résulte de l'insertion du transgène dans une région hétérochromatique. (D'après [26].)

Chaque élément isolé n'a pas d'effet isolant, mais les deux éléments doivent encadrer le transgène pour obtenir cet effet. Enfin, deux séquences barrière 5'HS₄, localisées à chaque extrémité du transgène, permettent de bloquer les effets de position, alors qu'une seule n'est pas suffisante. Ces différences fonctionnelles suggèrent que plusieurs systèmes ont pu être mis au point chez les eucaryotes pour structurer les domaines chromatinien.

Une organisation structurée de la chromatine semble être impliquée dans les mécanismes de la régulation transcriptionnelle chez les eucaryotes. La régulation de l'expression des gènes a surtout été étudiée au niveau de l'initiation de la transcription. Les avancées mêmes de ces études, en montrant la généralité des *enhancers*, éléments cibles de facteurs spécialisés de transcription pouvant agir à distance du promoteur du gène contrôlé, posent deux problèmes concernant la structure de la chromatine. Le premier est directement lié à notre propos : si les *enhancers* peuvent agir à distance, leur spécificité exige de pla-

cer des limites à leur action. Ces limites peuvent être conférées par des séquences isolantes. Le deuxième problème est lié à la nécessité, pour l'activité même des facteurs de transcription fixés sur le *enhancer*, de pouvoir entrer physiquement en contact avec le complexe d'initiation de la transcription fixé au site du promoteur du gène. Une compartimentation du génome permettrait d'individualiser des domaines de chromatine condensée, inactifs d'un point de vue transcriptionnel, et des domaines de chromatine décondensée, accessibles à la machinerie de la transcription et aux facteurs régulateurs ; elle favoriserait, en outre, l'établissement des contacts au sein d'un domaine entre différents éléments régulateurs.

Cette modification de la structure chromatinienne s'accompagnant d'un repositionnement des nucléosomes, d'une modification des protéines histones et de la présence de protéines non histones associées à l'ADN [17, 27], peut être mise en évidence par l'observation des profils spécifiques de sensibilité à la DNase I, liés à l'activité des gènes.

Les mécanismes par lesquels les séquences barrières isolent un domaine ne sont pas encore élucidés. Des interactions spécifiques se produisent entre ces séquences isolantes et des protéines qui ne sont pas encore toutes identifiées. La topoisomérase II, cible des séquences SAR et des éléments *scs* et *scs'*, joue probablement un rôle au niveau de ces séquences pour déclencher la décondensation de la chromatine. Dans le cas des séquences BR du rétrotransposon *gypsy*, une des protéines a été identifiée, la protéine su(Hw), mais d'autres facteurs cellulaires sont nécessaires. En effet, l'utilisation de ce système chez la levure montre que, même en présence de la protéine su(Hw), les effets de position s'exercent sur un transgène contenant les éléments BR [28]. Ce système nécessiterait, pour être totalement fonctionnel, d'autres facteurs protéiques absents chez la levure.

Des études réalisées chez la drosophile apportent des arguments supplémentaires concernant l'importance du rôle direct joué par des protéines régulatrices sur la structure de la chromatine. C'est le cas dans la régulation des gènes des complexes homéotiques (*HOM-C*). Si la mise en place du profil d'expression de ces gènes dépend de facteurs de transcription classiques appartenant à la cascade des gènes du développement précoce, le maintien de leur expression dépend de deux autres classes de régulateurs : des répresseurs appartenant au groupe *Polycomb* (*Pc*), et des activateurs appartenant au groupe *trithorax* (*trx*). Chacun de ces groupes comprend une à plusieurs dizaines de gènes. Les produits des gènes du groupe *Pc* forment un complexe multi-moléculaire associé à la chromatine. Leur fonction serait de « geler » la chromatine des complexes *HOM-C* dans un état permettant la persistance d'un profil d'expression correct, bien longtemps après disparition des régulateurs précoces ([29] pour revue). Les gènes des complexes *HOM-C* sont voisins, et leurs régions régulatrices sont proches. Pourtant, leurs domaines d'expression sont spécifiques. Une région a été identifiée dans le

complexe *bithorax* (*BX-C*), qui joue le rôle de barrière entre les éléments *cis*-régulateurs du complexe. Cette région serait la cible de protéines du groupe *Polycomb* [30]. L'analyse de la fonction des gènes du groupe *trx* est aujourd'hui moins avancée. Il est cependant significatif que l'un d'entre eux, le gène *brahma* (*brm*), présente des similitudes structurales avec le gène de levure *SNF2/SWI2* [31]. Chez la levure, ce gène appartient au groupe des gènes *SNF/SWI*, dont les produits forment un complexe multimérique de protéines associées à la chromatine. Ce complexe intervient en particulier dans la régulation des gènes *MAT*, définissant le type sexuel de la levure. La similitude de structure entre les gènes de drosophile et de levure a permis de définir un domaine conservé, le « bromodomaine », dont on a relevé la présence dans plusieurs gènes de mammifères [32]. De même, le produit de l'un des gènes du groupe *Pc*, le gène *Posterior sex comb* (*Psc*), s'est révélé très voisin de l'oncogène murin *bmi-1* [33]. Tout cela suggère fortement que les propriétés de ces protéines ont été conservées au cours de l'évolution dans l'ensemble du monde eucaryote, et que les mécanismes de régulation au niveau de la chromatine, mis en évidence dans des cas particuliers par l'analyse génétique chez la levure ou chez la drosophile, peuvent concerner des mécanismes essentiels chez les vertébrés ■

Summary

Transgenesis and use of « boundary » elements which protect against position effects

Transgenesis has been frequently used to investigate genetic regulation in eucaryotes. This approach provides the opportunity to study gene expression in the whole organism and during development. However, the major drawback of this technique relies on the position effects due to genomic sequences flanking the transgene. Recent studies have allowed boundary sequences to be identified and characterized from *Drosophila*, chicken and human genomes.

When tested by transgenesis in *Drosophila*, boundary sequences insulate the transgene from the influence of the surrounding genome. Some of them prevent integrated DNA from position effects in transformed cells. Although structurally different from each other, they seem to have conserved some insulating properties through evolution. Their study may provide new information concerning gene regulation by higher order chromatin packaging.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Jean-Antoine Lepasant pour les conseils et l'aide qu'il a apportés à la rédaction de cet article.

TIRÉS A PART

P. Lapie.