

Contrôle du développement des gènes de globine : nouvelle approche à l'aide de « YAC »

Les familles des gènes de globines présentent la caractéristique d'une corrélation entre arrangement spatial et ordre chronologique d'expression au cours du développement. L'ensemble des gènes de chacune des deux familles est, de plus, sous le contrôle d'un élément régulateur majeur situé en amont et à distance, appelé le LCR (*locus control region*) [1]. Cette propriété, qui n'est sans doute pas unique, est dans ce cas spécifique un modèle d'étude pour d'autres familles géniques. La recherche actuelle d'une induction pharmacologique de la synthèse d'hémoglobine (Hb) fœtale comme abord thérapeutique des hémoglobinopathies majeures confère de plus à cette étude un intérêt d'actualité très particulier.

Si l'accord est actuellement fait sur l'existence d'une régulation autonome du gène embryonnaire ϵ globine, la question continue à se poser concernant le mécanisme de la commutation Hb fœtale \rightarrow Hb adulte (*switch*) normalement observée dans la période périnatale, fondamentale pour une manipulation éventuelle de cette commutation : l'expression compétitive que l'on observe est-elle la conséquence directe de l'ordre des gènes sur le chromosome, ou serait-elle due à l'action successive de facteurs transactivateurs présents dans l'environnement ? Différentes approches expérimentales, utilisant surtout des souris transgéniques, ont abordé cette question. Les profils successifs de l'expression du trans-

gène au cours du développement de l'animal ont permis d'inférer des conclusions concernant la régulation du développement en favorisant le rôle joué par l'ordre spatial des gènes. Des limitations techniques, dues surtout à la taille des constructions utilisées, limitent cependant la valeur de ces conclusions. Dans tous les cas de figure, il y a eu plus ou moins une distorsion de l'organisation du *locus* β -globine et des modifications de distance entre le LCR et les différents gènes, ce qui peut retentir sur leur interaction réciproque. Des travaux récents semblent réorienter un peu différemment l'interprétation du développement et de son contrôle.

Dans un premier travail, l'équipe de George Stamatoyannopoulos à Seattle (Washington, USA) a réalisé des constructions transgéniques de deux gènes identiques en tandem, μ LCR $\gamma\gamma$ ou μ LCR $\beta\beta$, en introduisant dans un des deux gènes, par une courte délétion, un marqueur permettant d'en différencier l'expression au niveau de l'ARN par protection à la RNase. Les fragments utilisés étaient, de plus, choisis de façon à respecter une différence importante de distance, 4 à 6 kb, entre le LCR et chacun des deux gènes quel que soit le mode d'intégration. Dans les deux cas, le gène le plus proche du LCR est exprimé de façon majoritaire à toutes les étapes du développement, aucune commutation n'est observée ; l'ordre des gènes influence incontestablement

leur expression. L'étape suivante a été le même type de construction, de marquage et de respect des distances, mais avec deux gènes différents, μ LCR $\gamma\beta$ ou μ LCR $\beta\gamma$. Dans les deux cas, le gène γ est exprimé de façon clairement majoritaire chez la souris à la période embryonnaire. Le rôle de proximité du LCR, incontestable précédemment, semble s'effacer devant celui, majeur, des facteurs transactivateurs d'environnement, la compétition des promoteurs l'emportant ici sur l'ordre des gènes dans la construction utilisée. Ces données expérimentales s'accordent bien avec des observations faites *in vivo*. Chez la chèvre, la disposition spatiale des gènes de globine intercale un gène adulte entre les gènes embryonnaire et fœtal ; l'expression successive des différents gènes suit dans ce cas une commutation en spirale et non plus longitudinale. On doit également remarquer le mode d'expression, chez l'homme, de gènes structuralement identiques ou presque identiques comme les deux gènes γ ou les gènes α . L'expression fœtale, dans les deux cas, est nettement majoritaire au niveau du gène le plus proche du LCR, $\alpha\gamma$ et α_2 , mettant ici en évidence l'effet de position [2].

Une deuxième approche expérimentale, plus intéressante peut-être, est susceptible également de faciliter l'étude de la régulation des gènes de globine au cours du développement. Par opposition à des construc-

tions artificielles modifiant l'organisation du *locus* étudié, réduisant les distances entre les zones régulatrices par élimination d'autres zones présumées neutres, il était particulièrement souhaitable d'étudier la régulation dans un contexte reproduisant réellement la situation existant *in vivo*. La même équipe, responsable de la première étude, a réussi l'expression dans la souris transgénique d'un segment purifié à partir d'un YAC (*yeast artificial chromosome*). Ce fragment de 230 kb comprend, outre la totalité du *locus* β globine et des différents éléments régulateurs, de larges zones flanquantes en

5' et 3', débordant ainsi l'ensemble du domaine chromatinien impliqué dont on sait qu'il s'étend à 95 kb au moins en aval des gènes de structure. La régulation au cours du développement est conforme dans ce cas à la régulation attendue de gènes humains, légèrement différente de celle des gènes murins endogènes qui n'expriment que les étapes embryonnaire et adulte. Outre la performance technique, l'intérêt de ce travail est évident ; il doit permettre l'introduction de mutations dans ce β -YAC entier et l'observation de leurs conséquences dans le contexte d'un *locus* dont

l'organisation n'a pas été modifiée [3].

D.L.

1. Labie D, Krishnamoorthy R. Du nouveau dans les séquences activatrices des gènes de globine. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 255-8.
2. Peterson KR, Stamatoyannopoulos A. Role of gene order in developmental control of human γ - and β -globin gene expression. *Mol Cell Biol* 1993 ; 13 : 4836-43.
3. Peterson KR, Clegg CH, Huxley L, et al. Transgenic mice containing a 248-kb yeast artificial chromosome carrying the β -globin locus display proper developmental control of human globin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 7593-7.

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Correction à long terme de la dégénérescence de fibres musculaires déficientes en dystrophine par transfert de gène à l'aide d'un vecteur adénoviral.** La dystrophie musculaire de Duchenne est une affection héréditaire qui affecte 1 garçon sur 3 500, due à l'absence d'une protéine sarcolemmique de 427 kDa, la dystrophine. Il n'existe pas actuellement de thérapeutique susceptible d'en modifier durablement l'évolution qui aboutit au décès des patients vers l'âge de 20 ans. Le développement récent de techniques de transfert de gène permet d'envisager, à terme, un traitement de cette maladie par thérapie génique. Une des voies de recherche testées actuellement utilise un vecteur adénoviral dont les gènes E1A, E1B et E3 ont été délétés, et qui contient un minigène de dystrophine, placé sous le contrôle du LTR (*long terminal repeat*) du virus du sarcome de Rous, codant pour une protéine tronquée de 200 kDa ou « minidystrophine » (Ad-RSVmDys). Les premiers essais de transfert par injection intramusculaire de ce vecteur

chez des souris *mdx* (modèle murin d'absence de dystrophine) avaient démontré son efficacité puisque 5 à 50 % des fibres exprimaient la minidystrophine au niveau du sarcolemme dans le muscle injecté (durée maximale d'étude de l'expression de 3 mois) [1, 2]. Les mêmes auteurs qui avaient publié ces premiers résultats (Vincent *et al.* des laboratoires d'Axel Kahn, Jean Claude Kaplan, Pascale Briand, Institut Cochin de Génétique Moléculaire, Paris, France ; et de Michel Perricaudet, Institut Gustave Roussy, Villejuif), rapportent maintenant dans *Nature Genetics* [3] que 6 mois après une injection unique de l'adénovirus recombinant décrit ci-dessus, jusqu'à 60 % des fibres du muscle injecté peuvent synthétiser la minidystrophine, et être protégées du processus dégénératif qui affecte les fibres déficientes en dystrophine. Cela a pu être évalué en marquant les fibres initialement présentes au moment de l'injection grâce à un deuxième vecteur contenant le gène de la β -galactosidase, co-injecté avec le vecteur minidystrophine dans une

patte, ou injecté seul dans la patte controlatérale servant de témoin. Les animaux ont ensuite été sacrifiés à différents temps (une semaine à six mois après l'injection). Dans la patte témoin, l'expression de la β -galactosidase diminue significativement en six semaines, puis disparaît, tandis qu'elle se maintient à un niveau important dans la patte injectée avec les deux vecteurs. De plus, avec le temps, l'expression de la β -galactosidase dans cette patte se restreint progressivement aux seules fibres exprimant la minidystrophine suggérant que ces fibres sont protégées contre le phénomène de nécrose. Dans les muscles exprimant la minidystrophine, on constate aussi une diminution de la régénération musculaire, évaluée par le pourcentage de fibres centronucléées, par rapport à la patte témoin.

- [1. Ragot T, *et al.* *Nature* 1993 ; 361 : 647-50.]
- [2. Ragot T, *et al.* *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 238-241.]
- [3. Vincent N, *et al.* *Nature Genet* 1993 ; 5 : 130-4.]