

Le domaine paired : divers moyens de construire une protéine PAX

Les protéines PAX jouent des rôles importants dans de multiples aspects du développement chez les invertébrés et les vertébrés, allant de la segmentation à l'organogenèse. Elles sont caractérisées par la présence du domaine paired (PD), un domaine bipartite de liaison à l'ADN. Des études de liaison à l'ADN *in vitro* et la résolution de la structure tridimensionnelle du PD de la protéine de drosophile Paired attachée à son site de liaison ont montré que ce domaine est, en fait, constitué de deux sous-domaines, amino- et carboxy-terminaux, respectivement appelés PAI et RED [1]. Le domaine PAI semble être essentiel à la liaison à l'ADN alors que le domaine RED joue un rôle secondaire et ne fait qu'apporter une spécificité accrue à certaines protéines telles que Pax6. Ainsi, la protéine Paired fonctionne parfaitement *in vivo*, même après délétion de son domaine RED. De façon intéressante, plusieurs des protéines PAX contiennent un autre domaine de liaison à l'ADN, un domaine homéotique (HD) très caractéristique par sa séquence et sa capacité de se lier à des sites dimériques d'ADN de façon coopérative [2]. De fait, il a été montré que le PD et le HD se lient de façon synergique à l'ADN [3]. Les protéines PAX sont donc des régulateurs modulaires qui peuvent utiliser un ou plusieurs domaines pour remplir des rôles différents. La meilleure illustration de cette caractéristique est représentée par le gène *Pax6* du nématode *C. elegans*: le même locus est utilisé pour deux fonctions distinctes. Le gène *vab3* qui code pour une protéine Pax6 possédant PD et HD affecte le développement antérieur de l'animal. Le gène *mab18* dont le promoteur se situe entre les séquences codant pour les domaines PD et HD,

code pour une protéine qui contient uniquement le domaine HD. Les mutations qui touchent uniquement l'expression de cette protéine n'affectent qu'une des raies de la queue du mâle et pas du tout le développement antérieur [4]. Des résultats récents indiquent que non seulement le PD et l'HD peuvent être dissociés, mais que les domaines PAI et RED peuvent aussi exister indépendamment l'un de l'autre. *Eyg*, une protéine de drosophile qui est codée par un gène essentiel pour le développement de l'œil, *Eye gone*, contient uniquement un domaine RED et un HD, mais pas de PAI (figure 1) [5]. Dans ce cas, le domaine RED doit être capable d'exister sans le domaine PAI, qui est le plus souvent un partenaire essentiel (il agit certainement avec l'HD, mais il est capable de reconnaître l'ADN en son absence). Il est probable que cette protéine agit de concert avec Pax6 au cours des premières étapes du développement de l'œil en formant un

hétérodimère. En fait, le domaine RED existe dans certaines conditions en l'absence d'un domaine PAI fonctionnel: une isoforme de Pax6, qui est le résultat d'un épissage alternatif conservé chez les vertébrés, possède un domaine PAI qui est inactivé [6]. Cette forme semble être fonctionnelle puis qu'une mutation chez l'homme affecte sa présence dans certains tissus. Une situation similaire existe aussi pour Pax8. Finalement, la séquence récemment terminée du génome du nématode *C. elegans* contient, outre cinq gènes Pax « classiques », cinq gènes qui contiennent uniquement un domaine PAI, et un gène avec seulement un domaine RED (et un HD) (figure 1) [7]. Cette dernière situation est similaire à celle de *Eyg* même si le gène de drosophile et celui du nématode ne sont pas reliés au niveau évolutif. Cela confirme que les domaines PAI et RED peuvent certainement se passer l'un de l'autre dans certaines conditions, peut-être en formant des

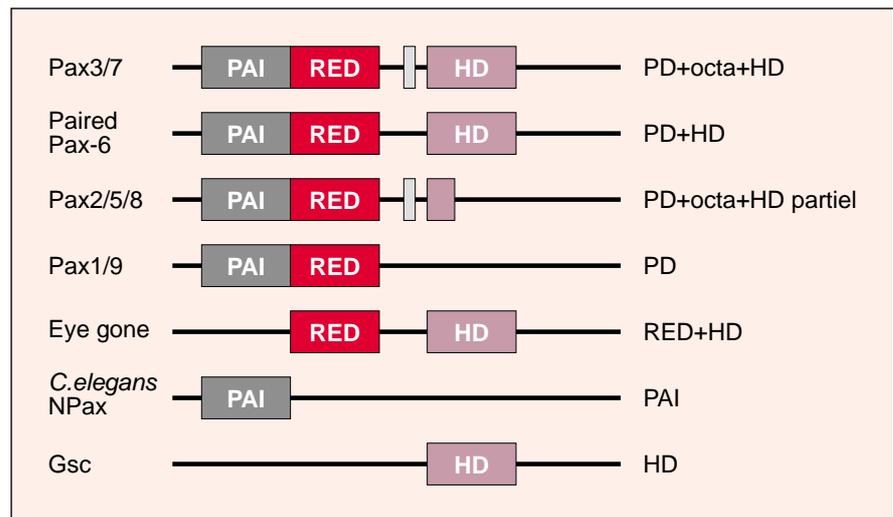


Figure 1. Schéma des protéines PAX selon les différentes combinaisons des domaines PAI, RED et HD.

hétérodimères comme le suggère la synergie *Pax6/eyg*.

Une question qui reste en suspens concerne l'évolution de ces protéines. L'association PD-HD est sûrement survenue après l'apparition indépendante des deux domaines [8, 9]. Pourtant, cette association doit être très ancienne puisque Pax5 et Pax8, des gènes que l'on trouve chez pratiquement toutes les espèces animales, n'ont qu'un PD mais contiennent les restes d'un HD qui a été perdu au cours de l'évolution. L'association PAI-RED est aussi très ancienne, puisque les cnidaires, qui sont des êtres multicellulaires relativement primitifs, contiennent des protéines PAX. En fait, en dépit de leur absence totale d'homologie de séquence en acides aminés, les domaines PAI et RED ont des structures extrêmement ressemblantes et se lient à l'ADN de façon

pratiquement identique et symétrique [10]. Cela suggère que le PD soit en fait un dimère covalent d'un même domaine ancestral. Au cours de l'évolution, ces deux monomères ont évolué indépendamment et ont acquis la capacité à se lier à l'ADN en l'absence de l'autre moitié. Ceci ne fait que renforcer un modèle dans lequel les protéines PAX seraient capables d'avoir de multiples fonctions en utilisant diverses combinaisons de leurs deux ou trois domaines de liaison à l'ADN, chacun de ces domaines étant capable d'interagir avec les autres pour une liaison synergique.

P.B.
A.T.
C.D.

1. Desplan C. Fonction des gènes Pax: synergie de liaison à l'ADN entre le domaine paired et l'homéodomaine. *Med Sci* 1997; 13: 147-55.

2. Wilson DS, Desplan C. Homeodomain Proteins: cooperating to be different. *Curr Biol* 1995; 5: 32-4.
3. Jun S, Desplan C. Cooperative interaction between homeodomain and paired domain. *Development* 1996; 122: 2639-50.
4. Chisholm AD, Horvitz HR. Patterning of the *Caenorhabditis elegans* head region by the Pax-6 family member *vab-3*. *Nature* 1995; 376: 52-5.
5. Jun S, Wallen R, Goriely A, Kalionis B, Desplan C. *Lune/eye gone*, a Pax-like protein, uses a partial paired-domain and a homeodomain for DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13720-5.
6. Epstein JA, Glaser T, Cai J, Jepeal L, Walton DS, Maas RL. Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev* 1994; 8: 2022-34.
7. Hobert O, Ruvkun G. Pax genes in *C. elegans*: a new twist. *Trends Genet* 1999 (sous presse).
8. Galliot B, de Vargas C, Miller D. Evolution of homeobox genes: Q50 paired-like genes founded the paired-class. *Dev Genes Evol* 1999 (sous presse).
9. Noll M. Evolution and role of Pax genes. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 595-605.
10. Xu W, Rould MA, Jun S, Desplan C, Pabo CO. Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 2.5 Å resolution reveals structural basis for Pax developmental mutations. *Cell* 1995; 80: 639-50.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Manipulations chromosomiques chez la souris *in vivo* par la technique TAMERE de recombinaison méiotique ciblée (TARgeted MEiotic REcombination).** Cette méthode permet de produire des remaniements chromosomiques chez la souris en induisant une recombinaison interchromosomique entre des allèles différents. Le contrôle du site de recombinaison s'effectue grâce à l'insertion de sites loxP sur les chromosomes homologues. La recombinaison, encouragée par l'appariement des chromosomes en méiose, permet d'obtenir à la fois la duplication et la délétion de la région située entre les deux sites loxP [1]. Une telle recombinaison entre des locus distants a déjà été décrite *in vitro* en utilisant le système de recombinaison Cre/loxP [2, 3]. Cependant, ces expériences *in vitro* nécessitent la reconstitution d'un gène de sélection positive [4, 5]. Dans ces conditions, la fréquence de recombinaison a été estimée à 10^{-3} clones de cellules ES traitées. Cette faible fréquence est probablement due au fait que l'association mitotique des chromosomes homologues est un événe-

ment rare chez les mammifères, au contraire de ce qui se passe chez la drosophile. Par conséquent, la faible incidence de ces échanges ciblés au cours de la mitose rend cette approche irréaliste chez la souris *in vivo*, chez laquelle des fréquences en dessous de 1/100 sont difficiles à envisager. Dans la méthode TAMERE, l'association des homologues pendant la prophase I de la méiose permet d'augmenter la probabilité d'une recombinaison ciblée entre deux locus en *trans*. En effet à ce stade, l'appariement des chromosomes est déclenché par une structure spécialisée: le complexe synaptonémal, qui est supposé faciliter les *crossing-over* en maintenant les chromosomes alignés. Un transgène exprimant la recombinaison CRE sous le contrôle du promoteur du gène codant pour la protéine SYCP1, un des composants majeurs du complexe synaptonémal [6], a été combiné chez une souris avec deux allèles du complexe *HoxD* qui portent des sites loxP situés de part et d'autre du gène *Hoxd12*. Dans cette expérience-pilote, deux nouveaux allèles ont été obtenus dans la des-

endance par une recombinaison en *trans*, le premier avec une duplication *Hoxd12*, le deuxième avec une délétion de ce même gène. La fréquence de recombinaison *trans*-allélique a été estimée à un peu plus de 10%. La technique TAMERE ne requiert pas d'étapes supplémentaires de cultures cellulaires. Elle est aisément applicable *in vivo* une fois les sites loxP insérés et semble donc utilisable pour induire des remaniements entre chromosomes homologues sans la nécessité d'un grand programme de croisement. Cette technique est applicable à de nombreux problèmes impliquant la construction de constitutions génétiques modifiées chez l'animal.

- [1. Hérault Y, *et al.* *Nat Genet* 1998; 20: 381-4.]
- [2. Viville S. *Med Sci* 1995; 11: 735-46.]
- [3. Babinet C. *Med Sci* 1995; 11: 1154-7.]
- [4. Ramirez-Solis R, *et al.* *Nature* 1995; 378: 720-4.]
- [5. Smith AJ, *et al.* *Nat Genet* 1995; 9: 376-85.]
- [6. Vidal F, *et al.* *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 274-80.]