

Le locus des gènes β -globine et les perspectives de transfert de gènes dans les hémoglobinopathies

Certains types de thalassémie β et de syndrome de persistance de l'hémoglobine fœtale sont dus à des délétions emportant de larges régions d'ADN, dont une partie du « locus β », c'est-à-dire de la portion d'environ 60 kilobases de bases (kpb) comportant tous les gènes de type β [1]: le gène embryonnaire ϵ , exprimé au niveau du sac vitellin; les gènes fœtaux γ (A γ et G γ), exprimés dans le foie fœtal; les gènes adultes δ et β , exprimés dans les érythroblastes adultes; le pseudogène $\psi\beta$, enfin, non exprimé.

Dans deux types de thalassémie $\gamma\beta$ avec délétion, le type anglais et le type hollandais (figure 1) [2, 3], le gène β et ses régions bordantes sont intacts; dans la forme anglaise la délétion s'arrête même à environ 25 kpb en 5' du gène β . Quoique non modifié, le gène β ne s'exprime cependant pas chez ces malades et semble dans une conformation chromatinienne « inactive » (*m/s, suppl. au n° 7, vol. 2, p. 11*). En pratique, la conformation chromatinienne d'un gène est appréciée par son accessibilité à la

DNase I: lorsque la chromatine entourant un gène est dense, l'ADN est peu accessible à la DNase I, une nucléase, et est donc peu digéré par cette enzyme. En revanche, un gène actif est entouré d'une chromatine probablement moins dense qui le protège mal contre la digestion par la DNase I. La formation de complexes nucléoprotéiques dans le voisinage des gènes actifs (*m/s, n° 7, vol. 3, p. 428 et n° 8, vol. 3, p. 487*) crée, de plus, des contraintes dans le double brin, éventuellement la formation de boucles

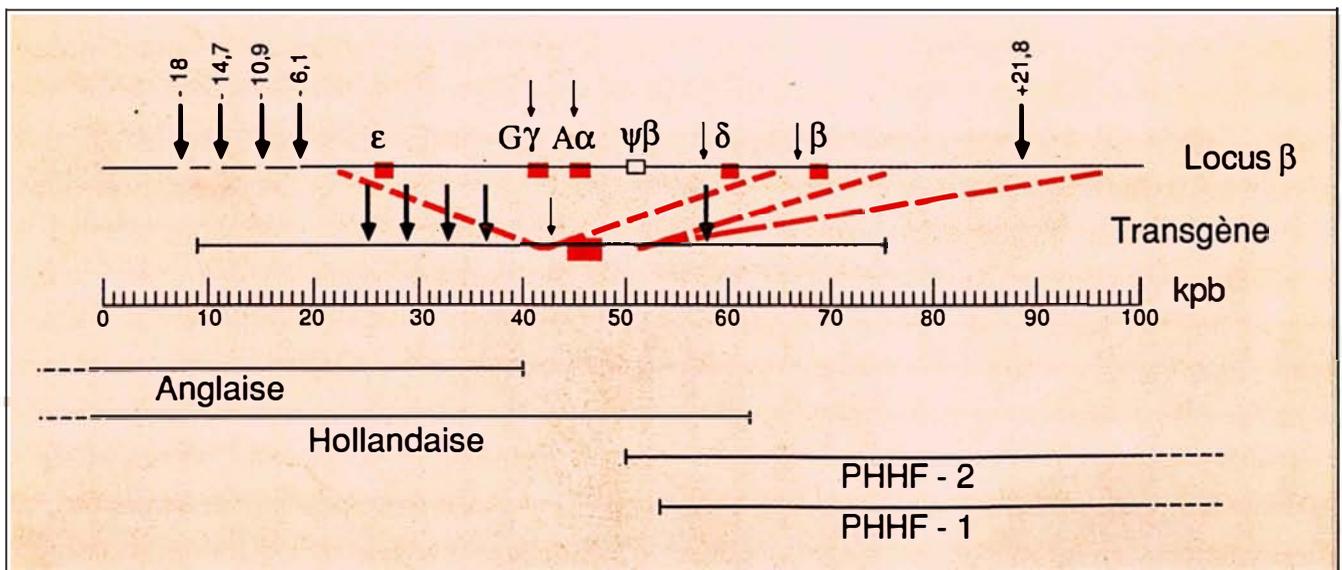


Figure 1. Locus β et mini-locus utilisé comme transgène. Rectangles rouges = gènes actifs; rectangle blanc = pseudogène; zones ombrées = délétions effectuées pour construire le transgène; flèches épaisses = sites d'hypersensibilité à la DNase I spécifiques des cellules érythroïdes mais ne changeant pas au cours du développement; flèches minces = sites d'hypersensibilité à la DNase I spécifiques des cellules érythroïdes et apparaissant parallèlement à l'expression des différents gènes. L'importance de différentes délétions rencontrées dans des syndromes thalassémiques (formes anglaise et hollandaise) et dans des syndromes de persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale (type 1 et 2) est matérialisée par les barres sous l'échelle des tailles en kilobases. Les limites 5' des délétions 5' et 3' des délétions 3' sont hors du locus β . Dans les thalassémies de type anglais et hollandais, les gènes non délétés ne sont pas exprimés et sont dans une conformation chromatinienne « inactive ». Au contraire, dans les persistances héréditaires de l'hémoglobine fœtale, les gènes intacts sont parfaitement actifs.

d'ADN exposant particulièrement une région à la digestion nucléasique ; ceci crée un site hypersensible, dont des exemples sont montrés sur la *figure 1*. Il existe, dans le locus β , différentes classes de sites hypersensibles à la DNase I, spécifiques de la différenciation érythroïde. Certains sont présents dès les premiers stades de l'érythropoïèse embryonnaire et persistent tout au long du développement et de la vie adulte ; ils sont situés entre 6 et 18 kpb en amont du gène ε (soit à plus de 45 kpb en amont du gène β), et à près de 22 kpb en aval du gène β [4, 6]. D'autres sites hypersensibles sont spécifiques du stade développement, apparaissant parallèlement à l'activation des gènes en amont desquels ils sont situés (*figure 1*). Il faut remarquer que dans les thalassémies de type anglais et hollandais, la région contenant les sites situés en 5' du locus β est déletée, les autres sites n'apparaissant plus au cours du développement. Les délétions entraînant les syndromes de persistance héréditaire de l'hémoglobine foetale (PHHF) de type 1 et 2 intéressent les gènes δ et β [7] ; les gènes intacts, particulièrement ceux codant pour les chaînes γ (A γ et G γ) sont en revanche parfaitement actifs, les sites d'hypersensibilité à la DNase I des régions non déletées étant présents et apparaissant selon la chronologie normale. La *figure 1* montre que le site hypersensible à la DNase I situé en aval du gène β , constant au cours du développement, est intéressé par les délétions entraînant les PHHF. Ces résultats suggéraient qu'existaient, loin en amont des gènes β , des régions dont la présence était indispensable à l'expression de tous les gènes du locus au cours de la différenciation érythroïde. Les sites hypersensibles indépendants du développement, décrits tout d'abord par D. Tuan [4], semblaient de bons candidats pour indiquer la localisation précise de ces éléments de contrôle régional.

Par ailleurs, en quelque sorte surajouté aux éléments discutés plus haut, chaque gène actif du locus possède ses propres éléments de contrôle. Le gène β , par exemple, a un promoteur fonctionnant mieux dans les érythroblastes adultes que dans d'autres cellules et un *enhancer* absolument spécifique de la différenciation érythroïde adulte, situé entre 600 et 800 pb en aval du gène. De plus, un motif du troisième exon, encore mal défini, coopérerait avec les éléments précédents pour stimuler l'expression du gène dans les cellules érythroïdes [6, 8]. Quoique ces régions bordantes situées de part et d'autre du gène β permettent, à elles seules, de commander une expression spécifique des cellules érythroïdes adultes, in vitro dans des cellules en culture [9-11] ou in vivo dans des souris transgéniques [6, 8, 11, 12], le niveau d'expression atteint dans les souris transgéniques est souvent très bas par comparaison à l'expression du gène endogène et varie considérablement d'une souris à l'autre, probablement en fonction du site d'intégration. Des concentrations appréciables d'hémoglobine issue du transgène ne sont atteintes que lorsque ce dernier est intégré en de multiples copies (*m/s n° 1, vol. 3, p. 49*). Cette faiblesse d'expression, observée quelque soit le mode de création des animaux transgéniques [13, 14] constitue un obstacle qui semblait insurmontable à la tentative de traiter les malades souffrant d'hémoglobinopathies sévères (principalement de thalassémie) par transfert de gène dans les cellules médullaires.

L'idée est venue à plusieurs laboratoires, associant ces données éparses, que la faiblesse de l'expression des transgènes β globine pouvait être la conséquence de l'absence des éléments de contrôles localisés loin en amont du gène β , au niveau des sites d'hypersensibilité indépendants du développement. Grosveld *et al.* [6] ont donc construit, dans un vecteur acceptant plus de 30 kpb

d'ADN exogène (un cosmide), un « mini locus β » représenté sur la *figure 1* ; les sites hypersensibles amont se trouvent rapprochés, grâce à une délétion, entre 6 et 20 kpb du gène β . Une délétion rapproche aussi le site hypersensible aval. Des souris transgéniques pour cette construction se comportent de façon remarquable : elles expriment toutes le transgène, proportionnellement au nombre de copies intégrées, chaque copie contribuant pour un niveau d'expression identique à celui du gène endogène ; l'expression est indépendante du site d'intégration. Ces résultats s'interprètent en supposant que, comme le suggéraient les thalassémies $\gamma\beta$ de type anglais et hollandais, la région des sites hypersensibles amont est indispensable à l'expression normale des gènes du locus β . Il pourrait s'agir d'un *enhancer* stimulé par des protéines communes à toutes les étapes de la différenciation érythroïde et indispensable à la modification de la chromatine de la région du locus β , modification elle-même requise pour que s'expriment, sous l'effet de protéines transactivatrices caractéristiques des différentes étapes de la différenciation érythroïde, les différents gènes du locus. Chez la drosophile, Gasser et Laemmli [15] ont étudié en détail les relations entre les gènes transcrits et l'association de l'ADN à la matrice nucléaire, c'est-à-dire au « squelette » du noyau. L'ADN semble être attaché à la matrice en des sites disposés environ toutes les 50 kpb ou plus [16], formant ainsi des boucles qui pourraient peut-être correspondre aux unités transcriptionnelles. Les sites d'attachement peuvent coïncider avec la localisation des *enhancers* et d'autres séquences de contrôle de la transcription. On peut donc faire l'hypothèse que les régions de contrôle en amont du locus β globine pourraient fonctionner comme un *enhancer* et (ou) un site de fixation à la matrice nucléaire, ces fonctions étant nécessaires

à l'acquisition par la chromatine d'une conformation permettant l'expression des gènes. Quoiqu'il en soit des mécanismes d'action des séquences activatrices amont du locus β globine, leur découverte ouvre d'importantes perspectives pour la thérapeutique génique des hémoglobinopathies. L'équipe de R.C. Mulligan [14] a montré qu'il était possible de prélever la moelle d'une souris, de l'infecter par un rétrovirus recombinant contenant un gène de β globine humaine, puis de greffer cette moelle à l'animal rendu aplasique par chimiothérapie ou irradiation. Les cellules souches infectées par le rétrovirus recombiné permettent de repeupler la moelle, notamment en cellules de la lignée érythroïde synthétisant de la globine β humaine. Le niveau d'expression obtenu par Mulligan reste faible, mais sa construction ne contenait pas la région des sites hypersensibles amonts. S'il était possible de mieux délimiter les éléments actifs de cette région, et ainsi de les intégrer à proximité d'un gène β dans une construction rétrovirale qui ne peut guère admettre plus de 7 kpb d'ADN exogène..., nous ne serions peut-être pas éloigné des premiers essais thérapeutiques.

Axel Kahn

RÉFÉRENCES

1. Maniatis T, Fritsch EF, Lauer J, Lawn RM. Molecular genetics of human hemoglobins. *Ann Rev Genet* 1981; 14: 145-78.
2. Curtin P, Pirastu M, Kan YW, Gobert-Jones JA, Stephens AD, Lehman H. A distant gene deletion affects β -globin gene function in an atypical $\gamma\delta\beta$ thalassemia. *J Clin Invest* 1985; 76: 1554.
3. Kioussis D, Vanin E, de Lange T, Flavell RA, Grosveld F. β -globin gene inactivation by DNA translocation in $\gamma\beta$ thalassemia. *Nature* 1983; 306: 662-6.
4. Tuan D, Solomon W, Quiliang LS, Irving ML. The « β -like-globin» gene domain in human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 32: 6384-8.
5. Forrester WC, Takeda S, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Groudine M. Evidence for a locus activation region: the formation of developmentally stable hypersensitive sites in globin-expressing hybrids. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 10159-77.
6. Grosveld F, Van Assendelft GB, Greaves DR, Kollias G. Position independent, high level expression of the human β -globin gene in transgenic mice. *Cell* 1987; 51: 975-85.
7. Vanin EF, Henthorn PS, Kioussis D, Grosveld F, Smithies O. Unexpected relationships between four large deletions in the human β -globin gene cluster. *Cell* 1983; 35: 701-9.
8. Behringer RD, Hammer RE, Brinster R, Palmiter RD, Townes TM. Two 3' sequences direct adult erythroid specific expression of human β -globin genes in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7056-60.
9. Charnay P, Treisman R, Mellon P, Chao M, Axel R, Maniatis T. Differences in human α and β -globin gene expression in mouse erythroleukemia cells: the role of intragenic sequences. *Cell* 1984; 38: 251-63.
10. Cone RD, Benarous-Weber A, Baorto D, Mulligan RC. Regulated expression of a complete human β -globin gene encoded by a transmissible retrovirus vector. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 887-97.
11. Wright S, Rosenthal A, Flavell RA, Grosveld F. DNA sequences required for regulated expression of β -globin genes in murine erythroleukemia cells. *Cell* 1984; 38: 265-73.
12. Costantini F, Lacy E. Introduction of a rabbit β -globin gene into the mouse germ line. *Nature* 1981; 294: 92-4.
13. Costantini F, Radice G, Magram J, Stamatoyannopoulos G, Papayannopoulou T, Chada K. Developmental regulation of human globin genes in transgenic mice. Cold Spring Harbor Symposium. *Quant Biol* 1985; 50: 361-70.
14. Dzierzak EA, Papayannopoulou T, Mulligan RC. Lineage-specific expression of a human β -globin gene in murine bone marrow transplant recipients reconstituted with retrovirus transduced stem cells. *Nature* 1988; 331: 35-41.
15. 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.
16. Collins FS, Cole JL, Lockwood WK, Ianuzzi MC. The deletion in both common types of hereditary persistence of fetal hemoglobin is approximately 105 kilobases. *Blood* 1987; 70: 1797-803.

■ ■ ■ BRÈVES ■ ■ ■

■ ■ ■ Le gène *c-myc* peut-il être transcrit à la fois par les ARN-polymérase II et III ? L'oncogène *c-myc* est soumis à un contrôle complexe de son expression, associant des modifications de l'initiation de la transcription, de l'élongation des transcrits et de la stabilité du messenger (*m/s* n° 3, vol. 3, p. 170)). Trois promoteurs utilisant l'ARN polymérase II sont connus pour ce gène : P_0 , promoteur amont faible ; P_1 et P_2 , promoteurs habituellement utilisés, séparés par 160 paires de base et dont l'utilisation respective change dans des observations d'activation anormale du gène au cours de lymphomes de Burkitt. Le laboratoire de Philip Leder (*Harvard Medical School*, Boston, Ma, USA) vient de montrer que l'ARN polymérase III (normalement spécialisée dans la transcription des petits ARN, par exemple des ARN de transfert et les transcrits de la famille répétitive Alu) pouvait transcrire le gène à partir du même site P_2 que l'ARN polymérase II. Les transcrits synthétisés par la polymérase III se terminent normalement en de forts sites d'arrêt situés à la fin du premier exon, proches de la zone au niveau de laquelle l'ARN polymérase II semble elle-même faire une pause dont le degré constitue l'élément de contrôle de l'élongation des transcrits signalés plus haut. Quoique la preuve définitive que ces transcrits dus à l'action de la polymérase III sont accumulés *in vivo* dans les cellules de mammifère n'ait pas été apportée, ces résultats ouvrent une importante perspective : au cours des modifications associées aux translocations des lymphomes de Burkitt, le premier exon est très souvent modifié, délété ou muté. La perte du site d'arrêt de la polymérase III pourrait entraîner l'accumulation non contrôlée de transcrits complets, fonctionnels, intervenant dans la cancérisation cellulaire. [Chung J *et al.* *Cell* 1987; 51: 1001-8.]

■ ■ ■ BRÈVES ■ ■ ■

■ ■ ■ **Un gène qui transforme des fibroblastes en myoblastes!** A l'aide d'une technique assez compliquée et, a priori, incertaine, une équipe américaine de la Côte Ouest (Seattle, Washington) est parvenue à isoler de banques de cellules à différenciation myoblastique un ADNc qui, placé sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire et transfecté dans certaines cellules fibroblastiques, a la propriété d'induire une différenciation myogénique plus ou moins complète. Le criblage des banques a été effectué selon la méthode classique de la « différence ». Des sondes d'ADN complémentaires des messagers de deux lignées à différenciation myogénique ont été épuisées par un excès de messenger de cellules non myogéniques: les ADNc reconnaissant des messagers présents dans les lignées non myogéniques s'hybrident avec eux et peuvent être éliminés par chromatographie sur des colonnes d'hydroxyapatite qui retiennent les acides nucléiques doubles brins. Les ADNc simples brins non retenus sont donc enrichis en séquences caractéristiques des myoblastes. Utilisés comme sondes pour cribler les banques d'ADNc, ces ADNc détectent 92 clones sur 10 000 testés. Les clones qui reconnaissent, par *northern blot* (*m/s suppl. au n° 7, vol. 3, p. 14*), des messagers, présents dans les myoblastes en plus grande quantité que dans les myotubes et absents dans les cellules non myogéniques, sont sélectionnés. Un de ces clones (*myo-D.*) contient une insertion d'ADNc capable, après transfection, d'induire une différenciation myoblastiques de divers types de cellules non myogéniques. Le gène *Myo-D* est supposé coder pour un « différenciateur », analogue au niveau du muscle de la protéine hépatique se liant à l'ADN, HNF (*hepatocyte nuclear factor*), dont nous avons déjà parlé (*brève, m/s n° 2, vol. 4, p. 119*). C'est la toute première

fois, cependant, que l'action d'un tel différenciateur est directement prouvée par transfert de gène. [Davis RL, *et al. Cell* 1987; 51: 987-1000]

■ ■ ■ **Quand un neuropeptide et un neurotransmetteur collaborent!** On sait depuis plusieurs années que certains neuropeptides sont présents dans des terminaisons synaptiques contenant des neurotransmetteurs classiques comme l'acétylcholine ou les monoamines, et qu'ils sont libérés dans l'espace synaptique. On avait souvent interprété de façon spéculative cette « co-localisation » comme l'illustration d'une complexité jusque-là inconnue de l'activité synaptique, les deux substances agissant de façon « additive » — et parfois avec des effets sensiblement différents — sur la polarisation de la cible post-synaptique. L'équipe de Jean-Pierre Changeux [1, 2] vient de démontrer, pour la première fois, les mécanismes synaptiques liés à la co-localisation d'un peptide et d'un neurotransmetteur et, par là même, d'en démontrer le caractère non pas additif mais hautement interactif. L'étude a porté sur le contact réalisé, au niveau de la plaque motrice, par les axones provenant des motoneurons de la moelle épinière et les fibres musculaires. Les motoneurons libèrent à ce niveau, en effet, non seulement de l'acétylcholine mais également un neuropeptide, le CGRP (*calcitonin-gene related peptide*). L'acétylcholine provoque la dépolarisation et la contraction de la fibre musculaire en se fixant au niveau de son récepteur spécifique. Mais Changeux et son équipe avaient observé que l'activité électrique de la fibre musculaire elle-même exerçait une rétroaction en diminuant l'expression du gène codant pour la sous-unité α du récepteur [3]. Ils viennent de démontrer que cet effet paradoxal

est contrebalancé par l'action du CGRP qui favorise l'expression du même gène. Et les circuits intracellulaires (post-synaptiques) impliqués dans les actions antagonistes des deux substances libérées sur l'expression du gène du récepteur sont apparemment différents [4]. La co-localisation et la « co-libération » d'un neuropeptide et d'un neurotransmetteur classique se traduisent donc, ici, par une véritable interaction, le neuropeptide intervenant pour favoriser la réponse de l'élément post-synaptique à la réception du neurotransmetteur. Il n'est bien sûr par évident que le modèle de fonctionnement proposé par l'équipe de J.P. Changeux soit applicable dans les très nombreux cas de co-localisation répertoriés dans le système nerveux central des mammifères, mais cela mérite d'être sérieusement envisagé.

[1. Fontaine B, *et al. J Cell Biol* 1987; 105: 1337-1342]

[2. Klarsfeld A. *Biochimie* 1987; 69: 433-437]

[3. Klarsfeld A, Changeux JP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4558-62]

[4. Laufer R, Changeux JP. *EMBO J* 1987; 6: 901-6]

■ ■ ■ **La colchicine est capable de modifier la répartition de certains antigènes entre les différents domaines de la membrane plasmique hépatocytaire.** En utilisant des anticorps monoclonaux, dirigés contre des antigènes membranaires, Durand-Schneider *et al.* [1] ont observé qu'un antigène normalement uniquement canaliculaire se déplaçait après pré-traitement par la colchicine (un inhibiteur des microtubules), vers la membrane sinusoidale. Un tel déplacement a également été observé après ligature du cholédoque; il pourrait intervenir dans la physiopathologie de la cholestase.

[1. Durand-Schneider AM, *et al Hepatology* 1987; 7: 1239-48]