

Mécanismes de régulation différentielle des gènes de globine

Chez l'homme, comme dans de nombreuses espèces animales, on observe une activation séquentielle des gènes de l'hémoglobine au cours du développement (voir *m/s* n° 7, vol. 4, p. 427). Les cellules érythroïdes se différencient à partir de cellules pluripotentes, mais la nature de la différenciation terminale varie en fonction de la période de la vie. Malgré la difficulté majeure due à la quasi-inaccessibilité des cellules progénitrices, les travaux se poursuivent pour essayer de déterminer le mécanisme du programme de différenciation, en particulier la nature des séquences actives en *cis* qui commandent l'expression des différents gènes de globine et l'interaction en *trans* des protéines nucléaires qui interagissent avec ces séquences (*m/s*, suppl. au n° 1, vol. 5, p. 30-40). Parmi ces facteurs, la majorité n'est pas spécifique, certains présentent une spécificité tissulaire et/ou une spécificité temporelle.

Ces travaux ont fait l'objet d'une conférence (Sixth Conference on Hemoglobin Switching), qui a eu lieu à Airlie House du 24 au 27 septembre 1988, et un symposium consacré aux interactions ADN-protéines dans l'activation des gènes de globine humaine s'est tenu à San Antonio au cours du 30^e Congrès américain d'Hématologie du 3 au 6 décembre 1988.

Quelques travaux ont porté sur des modèles animaux, murin et surtout aviaire. Ils ont permis en particulier de mettre en évidence une séquence *enhancer* située en 3' du gène β -globine chez le poulet, entre les gènes de globine adulte et embryonnaire, et d'isoler un facteur tissu-spécifique Eryf-1 qui se lie à deux séquences adjacentes de cet *enhancer* [1]. Ces

études ont montré que la régulation liée au développement faisait intervenir une interaction entre un facteur de régulation positif, le *enhancer*, et le promoteur du gène β adulte [2]. Cependant, la majorité des travaux a porté sur la globine humaine. Ces travaux ont été facilités par le fait que la commutation hémoglobine foetale \rightarrow hémoglobine adulte se produit à un moment où le phénotype peut être aisément observé et par l'existence de mutants naturels. Ils ont été stimulés par l'intérêt thérapeutique potentiel qu'il y aurait à

agir sur la régulation de l'expression des gènes γ , tant dans le cas de la drépanocytose que dans celui des β -thalassémies, en interférant avec la polymérisation de l'hémoglobine S dans le premier cas, en réduisant l'excès de chaîne α dans le deuxième. Une série de mutations en 5' dans les régions promotrices des gènes γ s'accompagnent d'une activation du gène. Les études de transfection des ADN porteurs de la mutation dans des cellules K562 (lignée de cellules humaines dérivées d'une leucémie myéloïde chronique et se différenciant dans la lignée érythroïde, mais n'exprimant que des chaînes embryonnaires ou foetales) ont montré l'importance des mutations situées en -117 (A γ) et -175 (G γ) à partir du site d'initiation de la transcription des gènes γ , ainsi que d'un ensemble de mutations situées autour de -200 pour les deux gènes γ .

• Les boîtes CCAAT, dont il existe deux copies entre -115 et -111 et entre -98 et -94, sont des éléments essentiels. Elles fixent deux facteurs non spécifiques, un activateur équivalent à CP1 et NF-Y qui se fixe aux deux boîtes (γ CAAT, selon [3] et F.S. Collins, Ann Arbor ; facteur B2, selon [4]), et le facteur CDP analogue au CDP de l'oursin (*CAAT-displacement protein*, facteur déplaçant les protéines se fixant au motif CCAAT) (voir *m/s* n° 9, vol. 3, p. 554) qui se fixe à une région étendue englobant les boîtes. Les boîtes CCAAT fixent aussi deux facteurs spécifiques, NFE-1 et NFE-2, sur des régions adjacentes où existent des séquences consensus (F.S. Collins, Ann Arbor ; K.T. McDonagh, Bethesda). L'étude des mutants a permis d'éclaircir en partie le jeu complexe d'activateurs

GLOSSAIRE

Facteur non spécifiques

CP1 activateur

équivalents :

γ CAAT (β) et F.S. Collins)

facteur B₂ [4]

CDP (analogue de la CCAAT displacement protein de l'oursin)

équivalent : facteur B₁ [4]

γ CAC1 (β)

γ CAC2

γ OBP répresseur

équivalent : facteur B₁ [6]

Facteurs spécifiques

NFE-1 activateur (équivalent de Eryf-1 aviaire)

NFE-2 répresseur

équivalent :

B₃ [4]

EF γ A (β)

B₂ et B₃ [6]

GF-1 (S.H. Orkin, Boston)

(dans ces nomenclatures équivalentes, le caractère activateur ou répresseur n'est pas déterminé de façon précise).

et de répresseurs [5, 6]. Ainsi une mutation à -117 augmente la fixation de facteurs non spécifiques et diminue la fixation d'un facteur répresseur spécifique. Une délétion de 13 pb englobant la boîte distale a permis de montrer le rôle répresseur de NFE-2 et le rôle activateur de NFE-1 [7].

- En amont de la boîte CCAAT se trouvent les séquences de fixation des facteurs γ CAC1 et γ CAC2 qui se fixent au motif CACCC présent dans les promoteurs des gènes de type β -globine [3]. Cette fixation, qui nécessite des cations divalents, a un rôle mal connu.

- L'octamère ATGCAAAT (-182 à -175) joue également un rôle important. Il fixe une protéine à action non spécifique, γ OBP (*gamma octamer binding protein*) [3] agissant comme répresseur (facteur B1 [5]), et probablement le facteur CP1. Dans le voisinage immédiat de l'octamère se lie une/des protéine(s) tissu-spécifique(s) (E γ A) [3]; G γ -1,

S.H. Orkin, Boston; B₂ et B₃ [5 et 6]) qui sont sans doute les mêmes que NFE-1 et NFE-2. La comparaison de la mutation naturelle en -175, dont le phénotype est une persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale (PHHF), et de mutations dirigées, montre qu'il y a à la fois dans ce cas l'inhibition de la fixation d'un répresseur et des modifications de structure secondaire favorisant la fixation d'un facteur de 115 kDa spécifique des cellules érythroïdes et qui joue un rôle majeur dans l'activation des gènes γ au cours du développement et dans la PHHF (S.H. Orkin, Boston). Ce facteur est probablement l'équivalent de NFE-1.

- Des mutations autour de -200 s'accompagnent également de PHHF. Cette zone correspondrait à la fixation d'un autre répresseur qui pourrait être identique ou homologue de NFE-2 (F.S. Collins, Ann Arbor). De ces derniers travaux, il ressort qu'il existe, entre -200 et l'octamère, une zone à laquelle se fixent

plusieurs protéines, interagissant possiblement entre elles, une zone de contrôle positif se situant entre deux zones de contrôle négatif (figure 1).

- Entre -228 et -212 se trouve une séquence qui fixe une protéine inconnue qui exerce un contrôle négatif (K.T. McDonagh, Bethesda). Une délétion de 4 pb dans cette région s'accompagne d'une diminution de l'expression du gène γ [8].

- Entre -291 et -263 se fixe une protéine de 43-44 kDa dont le rôle est inconnu (K.T. McDonagh, Bethesda).

Des études moins poussées ont porté sur d'autres gènes du complexe β . Un *enhancer* en 3' du gène β contrôle la transcription sous l'effet de facteurs spécifiques du tissu et spécifiques du stade de développement [9]. Quatre séquences identifiées dans le *enhancer* peuvent fixer NFE-1 (identique ou homologue du facteur Eryf-1 du poulet) et également des facteurs non spécifiques qui entrent en compétition. On a pu définir une séquence

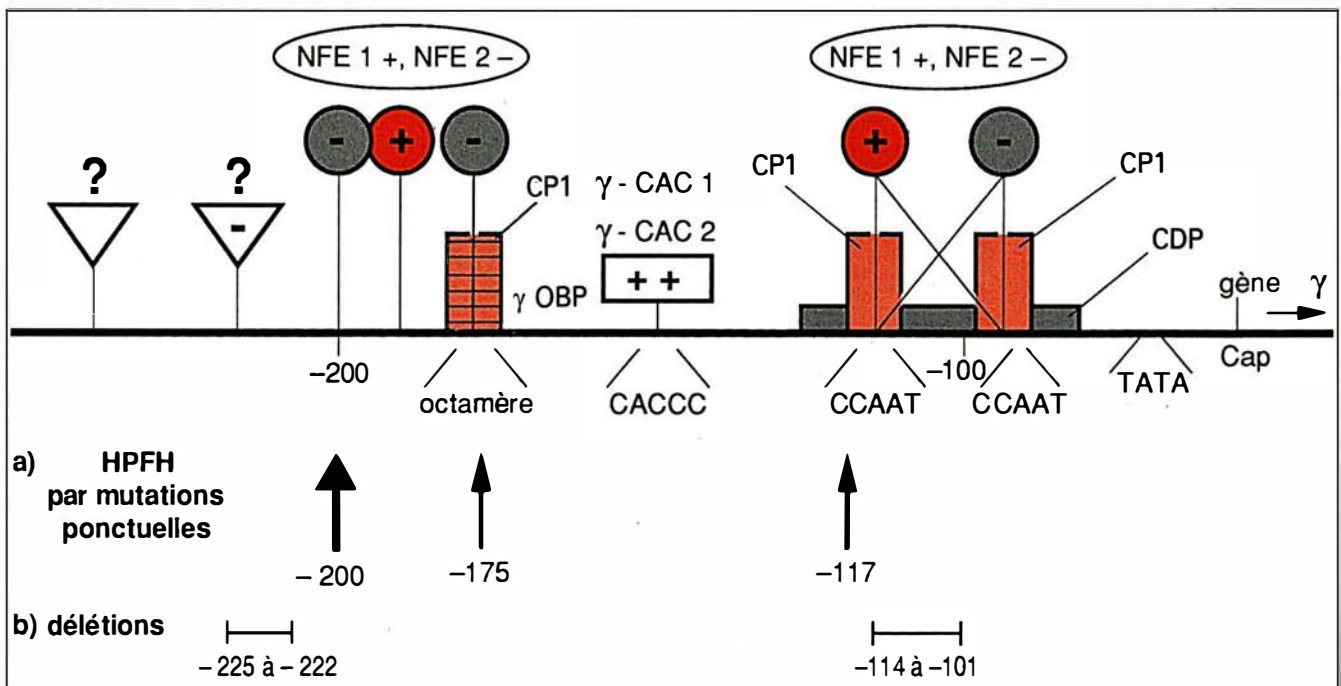


Figure 1. **Site de fixation des facteurs de régulation de la transcription en amont des gènes γ globine.** On a indiqué dans la partie inférieure de la figure celles des mutations naturelles qui ont permis de préciser la localisation des interactions ADN/protéines. (a) Mutations ponctuelles : -117, -175, une série autour de -200. (b) Délétions. NFE 1 (nuclear factor erythroid-specific) : cercles rouges, facteur activateur spécifique des tissus érythroïdes. NFE 2 : cercles gris, facteur inhibiteur spécifique des mêmes tissus. CP1 (CCAAT protein 1) : rectangles roses, facteur activateur, ubiquitaire, se fixant sur des motifs CCAAT. CDP (CCAAT displacing protein) : rectangle gris foncé, facteur probablement spécifique de certains tissus, déplaçant les facteurs CP1. γ OBP (*gamma octamer binding protein*) : rectangle hachuré rose, facteur ubiquitaire de rôle inconnu, peut-être inhibiteur. γ -CAC : rectangle blanc, facteur ubiquitaire se fixant aux motifs CACCC, de rôle inconnu à ce site.

consensus lâche susceptible de fixer NFE-1, également présente au niveau du promoteur de plusieurs gènes de globine.

En amont du promoteur minimal comportant les boîtes CACCC, CCAAT et TATA (-100 à 0) il existe trois zones importantes aux environs de -120, -150, et -200. La première et la troisième lient le facteur spécifique NFE-1, alors que celle du milieu lie le facteur ubiquitaire CP1. L'induction de la transcription semble requérir une combinaison du facteur spécifique et du facteur non spécifique, donc de deux sites, un seul quel qu'il soit ne pouvant induire l'activité du promoteur dans des cellules d'érythroleucémie murine. On est frappé de la similitude entre les facteurs qui se fixent sur le promoteur et ceux qui se fixent sur l'*enhancer*. Une hypothèse tentante est celle d'une interaction entre ces deux régions, les complexes ainsi formés agissant sur le promoteur minimal par l'intermédiaire de la boîte CACCC [10].

Au niveau du promoteur du gène β , les boîtes CACCC présentes en double exemplaire jouent un rôle particulièrement important. La boîte proximale peut fixer un facteur tissu-spécifique, fixation inhibée par les mutations thalassémiques à -87 et -88. Ce facteur se fixe sur le promoteur de β plutôt que sur celui de γ et il pourrait exercer une régulation liée au stade de développement [5, 10]. Des régions *silencer* ont été identifiées en amont : entre -610 et -490, entre -338 et -233. Se liant probablement à un même facteur, elles peuvent diminuer l'expression des gènes. Une mutation à -530 qui augmente l'affinité pour ce facteur négatif expliquerait le syndrome thalassémique qui en résulte (P.E. Berg, Bethesda). On a par ailleurs évoqué un rôle régulateur du deuxième exon (M. Donovan-Peluso, New York).

Le complexe du locus α a fait l'objet de peu de travaux. En système hétérologue, l'expression du gène α , contrairement à celle du gène β , ne met pas en jeu de *enhancer* exogène, ce qui suggère la présence d'un *enhancer* interne. Ceci n'a cependant pas pu être démontré par des méthodes classiques de cotransfec-

tion. Plus récemment, la construction de divers gènes hybrides α/β et β/α a permis de mettre en évidence une séquence régulatrice qui ne fonctionne qu'avec le gène homologue. Cette séquence, le PAE (*promoter activating element*) active son propre promoteur, d'une façon dépendant de sa position et de son orientation, mais rend inactifs les promoteurs des gènes β ou γ [11]. Ces expériences sont encore trop préliminaires pour qu'on puisse savoir si les séquences mises en évidence jouent un rôle *in vivo* et comment est contrôlée au cours du développement une expression spécifique.

Des résultats partiellement divergents ont cependant été trouvés dans une autre étude, où le fait que l'expression du gène α ne dépende pas de la présence d'un *enhancer* a été mis en relation avec la présence en amont d'une zone riche en GC susceptible de fixer le facteur transcriptionnel ubiquitaire SP1 [12]. La transcription du promoteur α dans des cellules non érythroïdes, selon ces auteurs, serait dépendante de la réplication du plasmide et simplement le résultat d'une accumulation du nombre de copies. Un facteur *trans*, ne se liant que faiblement, serait à l'origine de la transcription par effet cumulatif de ces interactions faibles. Les mêmes auteurs insistent sur le fait qu'aucun *enhancer* au sens strict n'est trouvé au voisinage du gène α . L'ensemble de ces données fait ressortir qu'au cours du développement et de façon spécifique du tissu interviennent successivement des ensembles complexes d'interactions protéine-ADN et protéine-protéine activant et inhibant séquentiellement l'expression des gènes de globine du locus β . Un aspect frappant est la similitude des facteurs interagissant avec les régions distales du promoteur et les séquences *enhancer*. Enfin on peut spéculer que la spécificité de la régulation d'un gène résulte de combinaisons spécifiques d'éléments de régulation communs à des gènes d'une même famille ou même à d'autres gènes.

RÉFÉRENCES

1. Emerson BM, Nickol JM, Jackson PD, Felsenfeld G. Analysis of the tissue-specific enhancer at the 3' end of the chicken adult β -globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4786-90.
2. Baik Choi OR, Engel JD. Developmental regulation of β -globin gene switching. *Cell* 1988; 55: 17-26.
3. Gumucio DL, Rood KL, Gray TA, Rioridan MF, Sartor CI, Collins FS. Nuclear proteins that bind the human γ -globin gene promoter: alterations in binding produced by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 5310-22.
4. Superti-Furga G, Barberis A, Schaffner G, Busslinger M. The -117 mutation in greek HPFH affects the binding of three nuclear factor to the CCAAT region of the γ -globin gene. *EMBO J* 1988; 7: 3099-107.
5. Mantovani R, Margaretti N, Nicolis S, et al. An erythroid specific nuclear factor binding to the proximal CACCC box of the β -globin gene promoter. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 4299-313.
6. Mantovani R, Margaretti N, Nicolis S, Ronchi A, Giglioli B, Otolenghi S. The effect of HPFH mutations in the human γ -globin promoter on binding of ubiquitous and erythroid specific nuclear factors. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 7783-97.
7. Gilman JG, Mishima N, Wen XJ, Storming TA, Lobel J, Huisman THJ. Distal CCAAT box deletion in the γ globin gene of two black adolescents with elevated fetal γ globin. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 10635-42.
8. Gilman JG, Johnson ME, Mishima N. Four base-pair DNA deletion in human γ globin-gene promoter associated with low γ expression in adults. *Br J Haematol* 1988; 68: 455-8.
9. Wall L, de Boer E, Grosveld F. The human β -globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev* 1988; 2: 1089-100.
10. De Boer E, Antoniou M, Mignotte V, Wall L, Grosveld F. The human β -globin promoter; nuclear protein factors and erythroid specific induction of transcription. *EMBO J* 1988; 7: 4203-12.
11. Atweh GF, Liv JM, Brickner HE, Zhu XX. A silencer element from the α -globin gene inhibits expression of β -like genes. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 5047-51.
12. Whitelaw E, Hogben P, Hanscombe O, Proudfoot NJ. Transcriptional promiscuity of the human α -globin gene. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 241-51.

Dominique Labie