

## Dynamique des interactions chromatiniennes et commutation de l'expression des gènes $\beta$ -globine

L'ensemble des gènes  $\beta$ -globine est sans doute la plus étudiée des familles multigéniques pour lesquelles ils constituent un modèle exemplaire : organisés dans l'ordre de leur expression au cours du développement, ils sont tous sous le contrôle d'un élément régulateur puissant, le LCR (pour *locus control region*) situé loin en amont, lui-même constitué de cinq sites hypersensibles à la DNase-I (HS) [1]. De nombreux travaux, utilisant diverses constructions exprimées en lignées cellulaires ou chez des souris transgéniques, ont progressivement permis un consensus sur certaines données [2]. Le pouvoir d'activation transcriptionnel du LCR est concentré dans les sites HS2, HS3 et HS4, et dans une région de 200-300 pb de chacun d'eux. Si chacun de ces trois sites a une activité *enhancer*, cette activité n'est cependant que partielle, et chacun des gènes requiert une construction comportant l'ensemble des sites pour sa pleine expression. Par ailleurs, l'expression successive des gènes (le *switch* des Anglo-Saxons) est réglée par un mécanisme de compétition polaire : le gène  $\beta$ , quoique transcriptionnellement compétent à toutes les étapes du développement, n'est cependant pas exprimé dans les cellules embryonnaires ; plus proches du LCR, le gène embryonnaire  $\epsilon$ , puis les gènes foetaux  $^{\gamma}$  et  $^{\delta}$  s'expriment d'abord ; c'est leur extinction autonome qui permettra l'activation du gène  $\beta$ . La nature des interactions chromatiniennes entre sites distants responsables de ces activations successives a fait l'objet d'hypothèses diverses. Une synthèse de J.D. Engel, en particulier, les expliquait par une dissociation du LCR, considéré non comme une entité globale mais comme un ensemble synergique de modules régulateurs doués chacun de propriétés spécifiques et activant simultanément différents gènes [3].

Un travail récent, mené selon une approche originale, visualisant *in vivo* l'activité transcriptionnelle des gènes qui sont en compétition pour une activation, propose un modèle dynamique différent des interactions chromatiniennes et rend sans doute mieux compte des données. Dans ce modèle, les différents éléments du LCR forment un holocomplexe susceptible d'interagir avec les séquences régulatrices proximales de chacun des gènes compétents [4]. Chez des souris transgéniques ayant intégré une seule copie du *locus*  $\beta$ -globine, les auteurs ont pratiqué des hybridations *in situ* des tissus érythroïdes ; l'emploi de sondes introniques  $\gamma$  et  $\beta$  a permis d'hybrider les transcrits primaires intranucléaires dont la demi-vie se compte en minutes ; ils apparaissent sous la forme de deux foyers fluorescents chez les animaux transgéniques homozygotes (un seul chez les hétérozygotes) et sont de ce fait les indicateurs d'une activité transcriptionnelle récente, alors que les ARNm correspondants, détectés tous deux dans le foie foetal mais de demi-vie relativement longue, ne le sont pas. Au jour 12 de la vie embryonnaire (jE12), l'emploi simultané de sondes spécifiques des gènes  $\gamma$  et  $\beta$  montre qu'à côté de cellules ne s'hybridant qu'à l'une des deux sondes (58 % environ à la sonde  $\beta$  et 9 % à la sonde  $\gamma$ ) il existe dans le tiers restant des cellules des transcrits primaires pour les deux gènes ; le double signal peut exister sur le même chromosome, le plus souvent cependant on constate qu'un chromosome est en cours de transcription du gène  $\gamma$  et l'autre du gène  $\beta$ , malgré un environnement transactivateur qui est évidemment le même. Cette activation transcriptionnelle apparemment aléatoire d'un gène ou de l'autre, mais d'un seul, pouvait être le fait d'un déplacement progressif de l'interaction entre LCR et

promoteurs ; il pouvait aussi résulter d'un va-et-vient permanent (*flip-flop*), le double signal témoignant alors d'une brève période de chevauchement qui serait fonction de la demi-vie des transcrits primaires. Les auteurs ont cherché à conforter la seconde hypothèse par une série d'expériences.

1. Une activation alternante des gènes  $\gamma$  et  $\beta$  doit permettre l'accumulation dans le cytoplasme des ARNm correspondants, identifiables par leur hybridation à une sonde exonique. Une sonde exonique  $\beta$  a été ajoutée aux deux sondes introniques précédentes pour l'étude d'un embryon hétérozygote pour le *locus*  $\beta$ -globine humain au jE12,5. Un nombre non négligeable de cellules ont été trouvées, qui montraient une transcription en cours du gène  $\gamma$ , mais pas du gène  $\beta$ , en même temps qu'une accumulation cytoplasmique d'ARNm  $\beta$  synthétisé préalablement. Si on admet la notion classique d'une demi-vie du transcrit primaire de l'ordre de 4-5 minutes, mais qu'il est encore détectable *in situ* pendant deux ou trois demi-vies, le temps de chevauchement devrait être environ 10-15 minutes.

2. Une hypothèse était celle d'un double signal dû à une duplication pendant la mitose, donc en phase G2. Les auteurs l'ont écartée en purifiant les cellules en phase G1 et G2 : aucune différence n'a été observée entre les deux populations.

3. Il restait à situer le phénomène dans le contexte des modifications connues au cours du développement ontogénique ; pour ce faire, les auteurs ont examiné l'état transcriptionnel de cellules individuelles à différentes étapes de ce développement. A jE10, les érythrocytes sont encore embryonnaires et nucléés ; on y retrouve une hétérogénéité des signaux  $\epsilon/\gamma$  avec une proportion relativement élevée de cellules en chevauchement témoignant d'une

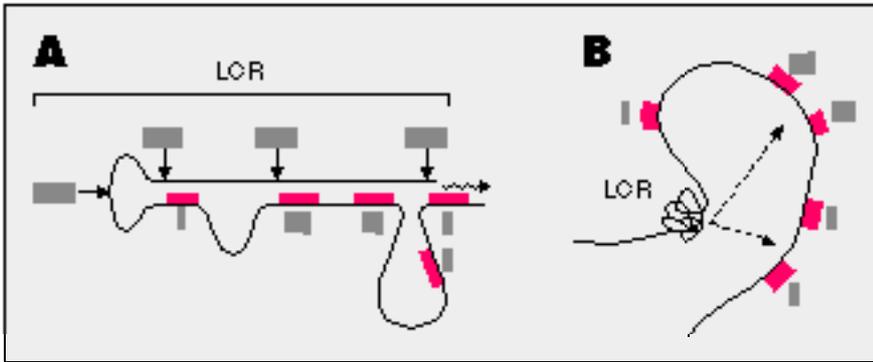


Figure 1. **Représentation schématique des deux modèles proposés par J.D. Engel et le présent travail pour expliquer la modification des interactions chromatiniennes au cours du développement et l'expression successive polaire des différents gènes.** **A.** Dans le modèle de J.D. Engel [3], et dans le présent travail, les différents sites hypersensibles (HS) du LCR interagissent simultanément avec les promoteurs de plusieurs gènes. Avec les gènes embryonnaires et fœtaux la régulation est d'abord positive, puis négative quand intervient la régulation positive du gène  $\beta$ -globine par HS4. **B.** Dans le modèle proposé ici [4], le LCR forme un holocomplexe qui agit alternativement par un mécanisme de flip-flop avec des gènes adultes et fœtaux au moment de la transition; la périodicité de l'alternance, fonction du milieu ambiant et des facteurs transactivateurs, conditionne le changement d'expression des gènes dans la cellule.

Tableau I			
A. HYBRIDATION DES TRANSCRITS PRIMAIRES			
	jE 10	jE 11	jE 12
$\epsilon$ seulement	~ 5%		
$\gamma$ seulement	~ 50%	27%	9%
$\beta$ seulement		35%	58%
B. TEMPS CALCULÉ D'HYBRIDATION D'UN GÈNE DANS LE MÉCANISME FLIP-FLOP			
$\epsilon$	4 min		
$\gamma$	30 min	ND	16 min
$\beta$		45 min	80 min

En I A sont donnés les pourcentages de cellules n'exprimant qu'un seul gène à des étapes successives du développement; toutes les autres cellules expriment donc deux gènes simultanément,  $\epsilon$  et  $\gamma$  à jE10, puis  $\gamma$  et  $\beta$  à partir de jE11. En I B les temps respectifs, calculés, d'hybridation des différents gènes. On constate à jE10 que le complexe formé avec le gène  $\epsilon$  est relativement instable. Par ailleurs, les proportions relatives  $\gamma/\beta$  se modifient entre jE11 et jE12. Au total, on constate au cours du développement une diminution du temps d'interaction avec le gène  $\gamma$  en même temps qu'une augmentation du temps d'interaction avec le gène  $\beta$ . ND: non déterminé.

moins stable du complexe LCR- $\epsilon$ . A jE11, ce sont les gènes  $\gamma$  et  $\beta$  qui sont transcrits, mais les proportions différentes de celles de jE12 démontrent un processus en changement permanent reflétant la modification de composition des facteurs de transcription.

Il y a donc dans ces données expérimentales un faisceau convergent d'arguments en faveur d'un mécanis-

me dynamique de boucle au cours duquel le LCR, unité fonctionnelle unique ou holocomplexe, n'activerait jamais qu'un seul gène à la fois, la distribution étant aléatoire et la proportion fonction des facteurs transactivateurs présents dans le milieu cellulaire (figure 1). Les données obtenues permettent-elles d'apprécier quantitative des temps de *flip-flop* et de comprendre dans quelle mesure ils reflètent le déve-

loppement? On a vu, d'après la demi-vie du transcrite primaire et son temps de décroissance, que la durée d'un chevauchement est de l'ordre de 10-15 minutes et se traduit par un double signal. On peut, par ailleurs, savoir à chaque étape combien de cellules ne transcrivent qu'un gène, combien en transcrivent deux et combien, en particulier, présentent un double signal sur le même chromosome. Le rapport de cette dernière fraction, dont on connaît la durée, à chacune des populations ne transcrivant qu'un seul gène, permet de calculer approximativement par extrapolation la durée d'activation transcriptionnelle d'un gène sur un chromosome; ces durées sont inégales pour les deux gènes en compétition, et se modifient au cours de l'évolution (Tableau I). Ce seraient donc des cycles multiples d'association et de dissociation entre le LCR et chaque gène, dont la périodicité change à chaque étape en fonction du contexte transactivateur cellulaire qui, finalement, expliqueraient l'expression successive des gènes au cours du développement. Ce modèle, validé sur le *locus*  $\beta$ -globine, devrait se retrouver dans d'autres familles multigéniques. Il est intéressant de noter que par une approche totalement différente – délétion du site HS2 *in vitro* chez la souris, et analyse des modifications et expression des gènes de globine – une autre équipe remet également en question le modèle de Engel d'une action individuelle de chaque HS et aboutit à la conclusion d'une action globale de l'ensemble du LCR [5].

D.L.

1. Labie D, Krishnamoorthy R. Du nouveau dans les séquences activatrices des gènes de globine (LCR). *médecine/sciences* 1992; 8: 255-8.
2. Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW. Hemoglobin switching. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H, eds. *The molecular basis of blood diseases*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994: 107-55.
3. Engel JD. Developmental regulation of human  $\beta$ -globin gene transcription: a switch of loyalties? *Trends Genet* 1993; 9: 304-9.
4. Wijgerde M, Grosveld F, Fraser P. Transcription complex stability and chromatin dynamics *in vivo*. *Nature* 1995; 377: 209-13.
5. Fiering S, Epner E, Robinson K, Zhuang Y, Telling A, Hu M, Martin DIK, Enver T, Ley TJ, Groudine M. Targeted deletion of 5' HS2 of the murine  $\beta$ -globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the  $\beta$ -globin locus. *Genes Dev* 1995; 9: 2203-13.