

Rôle du facteur de transcription NF-E2 dans la formation des plaquettes

L'étude des mécanismes de régulation des gènes exprimés spécifiquement lors de l'érythropoïèse a conduit, à la fin des années 1980, à deux découvertes majeures. La première est la caractérisation de la région de contrôle du locus β -globine (LCR) [1]; cet élément activateur en *cis* est capable d'isoler un transgène des influences chromatiniennes extérieures. La seconde est la caractérisation, puis le clonage, de la protéine nucléaire GATA-1 [2-4], qui reconnaît toutes les régions régulatrices érythrocytaires et semble être le déterminant principal de la co-régulation de ces gènes [5, 6]. La caractérisation simultanée d'un second facteur nucléaire érythrocytaire, NF-E2, a suscité beaucoup moins d'engouement [7, 8]. La première raison est sans doute que NF-E2 se fixe sur des séquences d'ADN également reconnues par les complexes de type Jun/Fos (AP1), ce qui a compliqué sa caractérisation. La seconde raison tient au fait que seules quelques régions régulatrices érythrocytaires contiennent des sites NF-E2, comme les promoteurs des gènes de la porphobilinogène désaminase (PBGD) [7] et de la ferrochélatase [9], ainsi que la région HS 2* du LCR [10]. Les clonages des ADNc de la grande sous-unité du complexe NF-E2, p45, puis de la petite sous-unité, p18, ont permis de mieux comprendre la structure de NF-E2 et d'autres complexes apparentés, mais n'ont pas apporté de réponse satisfaisante à la question originelle : A quoi sert NF-E2 ? Quelques éléments de réponse semblent maintenant se dessiner.

Structure de l'hétérodimère NF-E2

NF-E2 est une protéine hétérodimérique constituée d'une sous-unité p45, synthétisée principalement dans les érythroblastes, les mégacaryocytes et les granulocytes [11, 12], et d'une sous-unité synthétisée dans la plupart des tissus, p18 [13, 14]. Ce dimère, associé par une glissière de leucines (*leucine zipper*), se fixe sur un sous-ensemble de sites AP1 (*figure 1*). Alors que les complexes Jun-Fos reconnaissent la séquence TGA^C/_CTCA ou TGACGTCA, NF-E2 reconnaît une séquence plus étendue, TGA^C/_CTCAGC [7]. La sous-unité p45 contacte le motif TGA, et p18 le motif TCAGC [13].

La famille NF-E2

Il a été rapidement clair que p45 et p18 appartiennent à deux familles de protéines. Comme nous le verrons plus loin, cela pourrait permettre de comprendre en partie le résultat de l'inactivation des gènes p45 et p18 chez la souris.

Bien que NF-E2 reconnaisse un sous-ensemble de sites AP1, p45 et p18 ne sont pas apparentées à Jun et Fos. La sous-unité p45 appartient à la famille *Cap'n'collar* (CNC), nommée d'après une protéine de *D. melanogaster*. L'ADNc *p45* a été cloné par l'équipe de S.H. Orkin à Boston [11], mais d'autres laboratoires ont isolé des protéines de structure voisine, comme Nrf-1/LCR-F1 [15, 16], Nrf-2 [17], ECH (l'homologue de Nrf-2 chez le poulet) [18] ou les protéines Bach [19]. Toutes ces protéines sont capables de former des hétérodimères avec p18, de se fixer au motif NF-E2, et d'activer la transcription

[19, 20]. Plusieurs de ces protéines sont généralement co-produites dans un tissu donné. Ainsi, p45, Nrf-1, Nrf-2 et Bach1 sont toutes synthétisées dans des cellules érythroïdes.

Le clonage de l'ADNc *p18* a montré que la sous-unité p18 est identique à MafK, une petite protéine de la

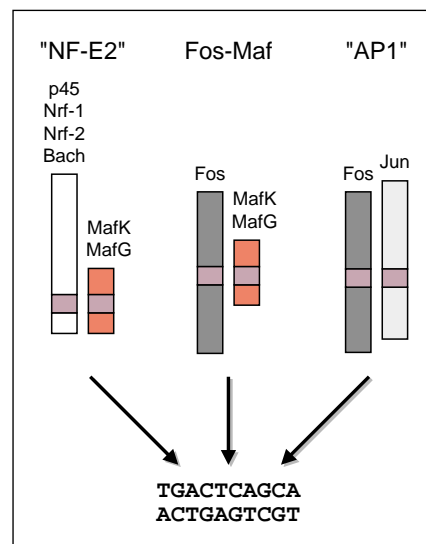


Figure 1. **Compétition entre différents complexes pour la fixation au motif d'ADN NF-E2.** Le motif TGACTCAGCA peut être reconnu par des complexes dimériques de type CNC-Maf (« NF-E2 »), Fos-Maf ou Jun-Fos (AP1). Les différents membres des familles de protéines Bach, Fos et Jun ne sont pas détaillés. De plus, les diverses protéines sont plus ou moins représentées selon les tissus. Enfin, des mutations ponctuelles par rapport à la séquence consensus peuvent amener des variations de l'affinité relative des différents complexes [22, 32]. Les dimères sont associés par une glissière de leucines (trame bistre).

* HS: région d'hypermétabolisme à la DNase I.

famille Maf [13, 14]. D'autres petites protéines Maf comme MafG pourraient également participer à des complexes de type NF-E2 [21]. Enfin, les petites protéines Maf peuvent former des hétérodimères avec Fos capables de réprimer la transcription [22]. En conclusion, la régulation génétique conférée par les sites NF-E2 est la résultante des compétitions entre les complexes de type NF-E2, Maf-Fos et Jun-Fos (figure 1). L'hétérodimère p45-p18 ne constitue donc qu'une des facettes du complexe NF-E2.

Le rôle précis des complexes NF-E2 dans l'érythropoïèse est mal compris. Il est possible que ces protéines servent à assurer une co-régulation des gènes de globines et des gènes des enzymes de la voie biosynthétique de l'hème (PBGD, ferrochelatase), mais cela n'a pas été véritablement démontré [23].

Invalidation des gènes de la famille NF-E2 par recombinaison homologue

L'invalidation par recombinaison homologue du gène *p45* a montré que les souris déficientes ne souffrent pas d'altérations majeures de l'érythropoïèse. La fonction de p45 dans les érythroblastes pourrait donc être assurée par une ou plusieurs autres protéines, comme ECH/Nrf-2 [18]. En revanche, les souris *p45*^{-/-} présentent une absence totale de plaquettes circulantes (thrombopénie) qui provoque la mort périnatale de la plupart d'entre elles: leurs mégacaryocytes présentent des anomalies grossières (distribution aberrante des membranes de démarcation, nombre réduit de granules). Ces mégacaryocytes prolifèrent en présence de thrombopoïétine, mais sont incapables de former des plaquettes [24]. Ainsi, les effets de l'absence de *p45* ne sont sensibles que dans l'une des lignées dans lesquelles ce gène est normalement exprimé, la lignée mégacaryocytaire. L'invalidation du gène *p18/MafK*, pour sa part, ne conduit à aucun phénotype observable [25]. Plus récemment, l'invalidation du gène *Nrf1/LCR-F1* a été réalisée. Les embryons déficients meurent à E 7.0 et ne présentent pas de mésoderme. Toutefois, l'absence de Nrf-1 ne semble pas empêcher

l'activation des gènes des globines dans les érythroblastes de souris chimeriques [26]. Enfin, l'invalidation du gène *Nrf-2* ne produit aucun phénotype [27].

Recherche de gènes cibles mégacaryocytaires de p45

Bien que p45 ait été détectée dans les mégacaryocytes, aucun des gènes spécifiques de cette lignée dont la régulation a été étudiée ne présente de site de fixation pour NF-E2 [28]. L'explication la plus vraisemblable du phénotype des souris *p45*^{-/-} serait pourtant qu'il existe un sous-ensemble de gènes mégacaryocytaires dont l'expression dépend directement de p45 NF-E2. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé une technique d'immunoprécipitation de complexes p45 NF-E2-ADN à partir de chromatine active [29-31]. Schématiquement, des noyaux cellulaires sont isolés à partir d'une lignée continue mégacaryocytaire, les protéines nucléaires sont pontées à l'ADN par la paraformaldéhyde, puis la chromatine est solubilisée par digestion. On immunoprécipite alors des complexes ADN-protéines au moyen d'un sérum anti-p45, puis les fragments d'ADN récupérés sont clonés. Cette méthode a l'avantage de ne pas introduire de biais en faveur de séquences de forte affinité *in vitro*, mais son efficacité d'enrichissement en motifs de fixation est faible. En conséquence, il est nécessaire de séquencer de nombreux clones. De plus, il peut être difficile d'identifier le locus génomique d'où provient un fragment donné.

L'un des clones que nous avons isolés contenait un fragment du second intron du gène de la thromboxane synthétase (TXS). Cette enzyme catalyse la dernière étape de la formation du thromboxane A₂, un messenger essentiel à l'activation plaquettaire. Nous avons pu montrer que NF-E2 contrôle directement la transcription du gène TXS, en se fixant sur son promoteur et dans le second intron. En outre, l'expression de l'ARNm TXS est indétectable dans les mégacaryocytes des souris *p45*^{-/-}, bien que d'autres cellules hématopoïétiques expriment encore ce gène. En conclusion, l'absence de p45 abolit

l'expression mégacaryocytaire de la TXS [32]. Ce gène n'est probablement que le premier exemple d'un ensemble de gènes mégacaryocytaires directement contrôlés par p45, car un déficit en thromboxane synthétase n'est sans doute pas suffisant pour bloquer la plaquetto-genèse [33-37].

Perspectives

L'identification d'une cible directe de p45 dans la mégacaryopoïèse laisse penser que d'autres gènes, plus directement impliqués dans la formation des plaquettes à partir des membranes de démarcation, seront bientôt caractérisés. Cette identification pourra résulter de l'étude d'autres séquences immunoprécipitées, ou bien de l'établissement de banques différentielles d'ADNc qui exploitent les mégacaryocytes de souris *p45*^{-/-}. Le rôle particulier de p45 dans la mégacaryopoïèse conduit également à penser que les partenaires de p45 (protéines Maf, co-activateurs) doivent être recherchés dans ces cellules et non dans la lignée érythroblastique. Enfin, il est possible que certaines thrombopénies humaines liées à un blocage de la maturation mégacaryocytaire puissent être associées à un déficit en p45 NF-E2 ou en l'une des protéines dont NF-E2 contrôle la production. La connaissance du mécanisme de contrôle de la maturation mégacaryocytaire par NF-E2 permettra une approche moléculaire de ces affections ■

Sophie Deveaux
Vincent Mignotte

Inserm U. 91-U. 474, Hôpital Henri-Mondor, 51, avenue du Maréchal-de-Latre-de-Tassigny, 94010 Créteil, France.

RÉFÉRENCES

- Grosveld F, Blom van Assendelft G, Greaves DR, Kollias G. Position-independent, high-level expression of the human β -globin gene in transgenic mice. *Cell* 1987; 51: 975-85.
- Wall L, deBoer E, Grosveld F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev* 1988; 2: 1089-100.
- Evans T, Felsenfeld G. The erythroid-specific transcription factor eryf1: a new finger protein. *Cell* 1989; 58: 877-85.
- Tsai SF, Martin DIK, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH. Cloning of cDNA for the major DNA binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 1989; 339: 446-51.
- Weiss MJ, Orkin SH. GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol* 1995; 23: 99-107.
- Mignotte V, Lemarchandel V, Roméo PH. GATA et Ets : deux familles de déterminants majeurs de la différenciation hématopoïétique. *Hématologie* 1995; 1: 19-30.
- Mignotte V, Wall L, deBoer E, Grosveld F, Roméo PH. Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 37-54.
- Mignotte V, Eléouet JF, Raich N, Roméo PH. *Cis*- and *trans*-acting elements involved in the regulation of the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6548-52.
- Tugores A, Magness ST, Brenner DA. A single promoter directs both housekeeping and erythroid preferential expression of the human ferrochelatase gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 30789-97.
- Ney PA, Sorrentino BP, Lowrey CH, Nienhuis AW. Inducibility of the HS II enhancer depends on binding of an erythroid specific nuclear protein. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6011-7.
- Andrews NC, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempst P, Orkin SH. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* 1993; 362: 722-8.
- Toki T, Itoh J, Arai K, Kitazawa J, Yokoyama M, Igarashi K, Yamamoto M, Ito E. Abundant expression of erythroid transcription factor P45 NF-E2 mRNA in human peripheral granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219: 760-5.
- Andrews NC, Kotkow KJ, Ney PA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Orkin SH. The ubiquitous subunit of erythroid transcription factor NF-E2 is a small basic-leucine zipper protein related to the v-maf oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11488-92.
- Igarashi K, Kataoka K, Itoh K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature* 1994; 367: 568-72.
- Chan JY, Han XL, Kan YW. Cloning of Nrfl, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11371-5.
- Caterina JJ, Donze D, Sun CW, Ciavatta DJ, Townes TM. Cloning and functional characterization of LCR-F1: a bZIP transcription factor that activates erythroid-specific, human globin gene expression. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 2383-91.
- Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9926-30.
- Itoh K, Igarashi K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4184-93.
- Oyake T, Itoh K, Motohashi H, Hayashi N, Hoshino H, Nishizawa M, Yamamoto M, Igarashi K. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 6083-95.
- Johnsen O, Skammelsrud N, Luna L, Nishizawa M, Prydz H, Kolsto AB. Small Maf proteins interact with the human transcription factor TCF11/Nrfl/LCR-F1. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 4289-97.
- Blank V, Kim M, Andrews NC. Human MafG is a functional partner for p45 NF-E2 in activating globin gene expression. *Blood* 1997; 89: 3925-35.
- Kataoka K, Igarashi K, Itoh K, Fujiwara KT, Noda M, Yamamoto M, Nishizawa M. Small Maf proteins heterodimerize with Fos and may act as competitive repressors of the NF-E2 transcription factor. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2180-90.
- Andrews NC. Erythroid transcription factor NF-E2 coordinates hemoglobin synthesis. *Pediatr Res* 1994; 36: 419-23.
- Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, Jackson CW, Hunt P, Saris CJ, Orkin SH. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* 1995; 81: 695-704.
- Kotkow KJ, Orkin SH. Complexity of the erythroid transcription factor NF-E2 as revealed by gene targeting of the mouse p18 NF-E2 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3514-8.
- Farmer SC, Sun CW, Winnier GE, Hogan BL, Townes TM. The bZIP transcription factor LCR-F1 is essential for mesoderm formation in mouse development. *Genes Dev* 1997; 11: 786-98.
- Chan K, Lu R, Chang JC, Kan YW. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13943-8.
- Deveaux S, Filipe A, Lemarchandel V, Ghysdael J, Roméo PH, Mignotte V. Analysis of the thrombopoietin receptor (MPL) promoter implicates GATA and Ets proteins in the co-regulation of megakaryocyte-specific genes. *Blood* 1996; 87: 4678-85.
- Gould AP, Brookman JJ, Strutt DI, White RA. Targets of homeotic gene control in *Drosophila* [published erratum appears in *Nature* 1990; 348: 560]. *Nature* 1990; 348: 308-12.
- Graba Y, Aragnol D, Laurenti P, Garzino V, Charmot D, Berenger H, Pradel J. Homeotic control in *Drosophila*: the *scabrous* gene is an *in vivo* target of ultrathorax proteins. *EMBO J* 1992; 11: 3375-84.
- Tomotsune D, Shoji H, Wakamatsu Y, Kondoh H, Takahashi N. A mouse homologue of the *Drosophila* tumour-suppressor gene *U(2)gl* controlled by Hox-C8 *in vivo*. *Nature* 1993; 365: 69-72.
- Deveaux S, Cohen-Kaminsky S, Shivdasani RA, et al. p45 NF-E2 regulates the expression of thromboxane synthase in megakaryocytes. *EMBO J* 1997; 16: 5654-61.
- Mestel F, Oetliker O, Beck E, Felix R, Imbach P, Wagner HP. Severe bleeding associated with defective thromboxane synthetase. *Lancet* 1980; 1: 157.
- Rao AK, Koike K, Day HJ, Smith JB, Holmsen H. Bleeding disorder associated with albumin-dependent partial deficiency in platelet thromboxane production. Effect of albumin on arachidonate metabolism in platelets. *Am J Clin Pathol* 1985; 83: 687-96.
- Sinzinger H, Reiter S, Peskar BA. Deficiencies of the prostaglandin system: III. A partial thromboxane synthetase defect. *Wien Klin Wochenschr* 1985; 97: 561-5.
- Weiss HJ, Lages BA. Possible congenital defect in platelet thromboxane synthetase [letter]. *Lancet* 1977; 1: 760-1.
- Wu KK, Minkoff IM, Rossi EC, Chen YC. Hereditary bleeding disorder due to a primary defect in platelet release reaction. *Br J Haematol* 1981; 47: 241-9.

TIRÉS À PART

V. Mignotte.