

La souris transgénique : modèle d'étude pour la régulation et la pharmacologie des gènes humains de globines foétales

Comment la synthèse d'hémoglobine dans les globules rouges passe-t-elle, dans la période périnatale, d'un mode fœtal à un mode adulte ? Il s'agit d'un phénomène transcriptionnel, l'activation des gènes β -globine se substituant à celle des gènes γ -globine. L'hypothèse que la réactivation de ces gènes γ -globine serait un abord thérapeutique des hémoglobinopathies majeures s'est d'abord fondée sur des données d'histoire naturelle ; elle a été confortée ces dernières années par des données expérimentales et pharmacologiques. Une avancée majeure est liée à l'utilisation, non plus de gros animaux tels que les babouins, mais de souris transgéniques. Outre la facilité de maniement, ce modèle donne accès au système des gènes humains eux-mêmes et non plus à un système plus ou moins analogue, et permet ainsi l'approche progressive d'une réponse. Parmi les résultats obtenus, il faut citer l'étude de la régulation des différents gènes du *locus* β -globine et, plus récemment, la manipulation pharmacologique de cette régulation. Une première série d'expériences doit être brièvement rappelée. Les gènes β et γ -globine introduits par transgénèse chez la souris ne s'expriment que dans les tissus érythroïdes et, quand ils sont introduits seuls, leur régulation en fonction du développement est également correcte, mais leur expression reste faible et non corrélée au nombre de copies intégrées. Le couplage d'une séquence stimulatrice, le LCR (*locus control region*, initialement appelée LAR ou DCR, ensemble de sites hypersensibles

à la désoxyribonucléase 1 situés en amont du *locus* β -globine et retrouvés à toutes les étapes du développement), à l'un des gènes globine modifie les deux derniers paramètres : l'expression devient stable au cours du développement, mais elle est par ailleurs beaucoup plus élevée, proportionnellement au nombre de copies insérées dans le génome murin et indépendante de la position de ces copies. Si le transgène comprend, outre le LCR, l'ensemble des séquences situées entre les gènes γ -globine et β -globine, une régulation correcte est restaurée. Ces données suggéraient un modèle compétitif pour une interaction mutuellement exclusive avec le LCR de chacun des deux gènes, l'activation du gène adulte éteignant le gène fœtal

(*m/s* n° 6, vol. 6, p. 572). Par opposition, le gène ϵ -globine n'est pas exprimé quand il est injecté seul à la souris ; son couplage au LCR se traduit par une expression limitée aux cellules embryonnaires du sac vitellin. Sa régulation est donc « autonome » [1-3].

Des travaux plus récents ont remis en question le rôle qu'aurait le gène adulte dans l'extinction du gène fœtal. Une régulation autonome de ce dernier gène a, en effet, été obtenue par juxtaposition du LCR, des séquences *enhancer* flanquant le gène γ en 3' et d'un autre site hypersensible qui limite en 3' le *locus* β -globine, le 3'HS-1 [4] (*figure 1*)*. Pour mieux localiser les séquences actives en *ais* impliquées dans ce mécanisme,

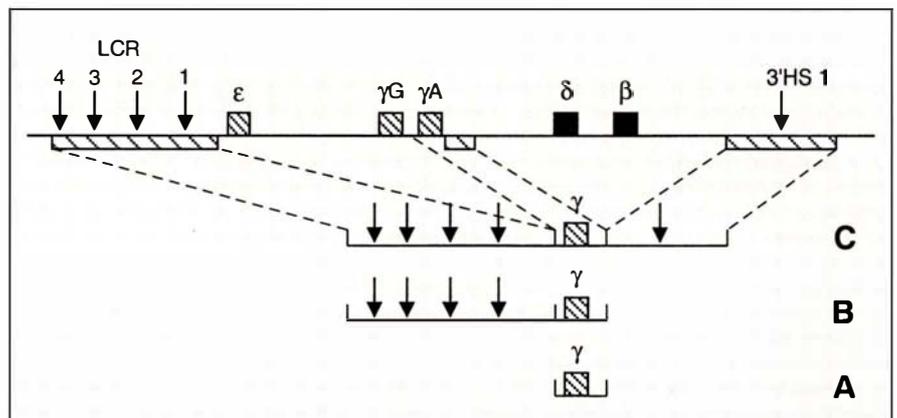


Figure 1. Cette figure montre les différentes constructions qui ont permis d'étudier la régulation du gène γ -globine humaine en souris transgénique. (A) Le gène γ -globine est introduit seul. (B) La construction comporte le LCR et le gène γ -globine. (C) La construction comporte le LCR, la séquence *enhancer* située immédiatement en 3' du gène γ et, de plus, le site 3'HS-1 situé à l'extrémité 3' du *locus* β -globine.

différents auteurs les ont, en quelque sorte, disséquées et introduites dans des constructions variées. On ne peut entrer dans les détails de ces travaux d'analyse. Les différentes fonctions d'ouverture chromatiniennes ou de stimulation ont été partiellement localisées, mais une action complète requiert la totalité des séquences impliquées, et l'effet de position est sans doute important pour une interaction adéquate de ces séquences et des divers facteurs spécifiques ou ubiquitaires [5]*. Cette même importance de l'ensemble des séquences du LCR est confirmée par un abord tout à fait différent. Plusieurs auteurs ont, en effet, mis en évidence une exceptionnelle conservation du LCR au cours de l'évolution phylogénique, conservation qui ne s'explique vraiment que par une importance fonctionnelle majeure [6-8].

L'ensemble de ces connaissances a permis de poser la question d'une utilisation des souris transgéniques pour l'étude pharmacologique des inducteurs de l'hémoglobine fœtale (Hb F). Plusieurs séries de composés ont été démontrées récemment comme susceptibles d'induire l'Hb F chez l'adulte et ont fait l'objet d'études pharmacologiques chez le singe ou même chez des malades (*m/s n° 9, vol. 6, p. 926*). Ces produits agissent, soit au niveau de la méthylation des gènes, soit, plus souvent, au niveau du programme de maturation érythrocytaire, soit, peut-être encore, de façon mixte. Parmi les cytotoxiques, il faut signaler la 5-azacytidine, l'arabincytosine et l'hydroxyurée, ce dernier étant, pour sa facilité de maniment et des raisons de sécurité, le plus employé. Mais on a aussi employé des facteurs de croissance hématopoïétiques, en particulier l'érythropoïétine. Plus récemment encore, l'attention se focalise sur des dérivés de l'acide butyrique, qui seraient des métabolites normaux susceptibles de retarder, ou même d'inverser, la commutation périnatale normale. Tous ces produits ont été expérimentés chez la souris transgénique après qu'on lui a injecté un gène γ -globine seul ou lié au LCR [9]. Les résultats ont été évalués au niveau moléculaire par l'exploration des ARN et des chaînes de globine synthétisées, et au niveau cellulaire

par l'estimation des réticulocytes F récemment différenciés. L'addition des séquences LCR au gène γ , dans tous les cas, induit une réponse très significative tant des ARN que des réticulocytes F. Cette réponse est spécifique du gène fœtal et n'est pas observée chez la souris exprimant le transgène LCR- β -globine. Ces expériences tendraient à démontrer que les séquences impliquées dans cette manipulation pharmacologique se trouvent soit dans le LCR lui-même, soit à proximité des gènes γ -globine. Des modèles, peut-être plus physiologiques, dans lesquels serait lié au LCR l'ensemble des gènes $\gamma\delta\beta$, n'ont pas encore été essayés dans la souris transgénique, mais déjà le modèle disponible devrait grandement faciliter la recherche d'agents pharmacologiques actifs dans les hémoglobino-pathies majeures.

D.L.

* De très récents résultats de l'équipe de F. Grosveld (Londres, GB) indiquent que l'ordre des gènes γ et β par rapport au LCR est essentiel à la commutation correcte de leur expression au cours du développement, la distance entre les promoteurs et le LCR intervenant probablement dans la probabilité de leur interaction, et donc dans la compétition entre plusieurs promoteurs pour interagir avec un même LCR [10].

1. Shih DM, Wall RJ, Shapiro SJ. Developmentally regulated and erythroid-specific expression of the human embryonic β -globin gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 1990 ; 18 : 5465-72.
2. Raich N, Enver T, Nakamoto B, Josephson B, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. Autonomous developmental control of human embryonic globin gene switching in transgenic mice. *Science* 1990 ; 250 : 1147-9.
3. Lindenbaum MH, Grosfeld F. An *in vitro* globin gene switching model based on differentiated embryonic stem cells. *Genes Dev* 1990 ; 4 : 2075-85.
4. Dillon N, Grosfeld F. Human γ -globin genes silenced independently of other genes in the β -globin locus. *Nature* 1991 ; 350 : 252-4.
5. Ley TL. The pharmacology of hemoglobin switching : of mice and men. *Blood* 1991 ; 77 : 1146-52.
6. Moon AM, Ley TJ. Conservation of the primary structure, organization, and function of the human and mouse β -globin locus-activating regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 7693-7.
7. Li Q, Zhou B, Powers P, Enver T, Stamatoyannopoulos G. β -globin locus activating regions : conservation of organization, structure and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 8207-11.
8. Reitman M, Felsenfeld G. Developmental regulation of topoisomerase II sites and DNase I hypersensitive sites in the chicken β -globin locus. *Mol Cell Biol* 1990 ; 10 : 2774-86.
9. Constantoulakis P, Josephson B, Mangahas L, et al. Locus control region- γ transgenic mice : a new model for studying the induction of fetal hemoglobin in the adult. *Blood* 1991 ; 77 : 1326-33.
10. Hanscombe O, Whyatt D, Fraser P, et al. Importance of globin gene order for correct developmental expression. *Genes Dev* 1991 ; 5 : 1387-94.

■■■ BRÈVE ■■■

■■■ A quoi sert la protéine de Tamm-Horsfall ? La glycoprotéine de Tamm-Horsfall (THP) est produite par le rein et excrétée dans l'urine. Cette protéine inhibe l'agrégation des cristaux d'oxalate de calcium monohydraté et pourrait donc jouer un rôle dans la prévention naturelle contre les calculs urinaires. Hess *et al.* (Chicago, IL, USA) ont étudié six hommes ayant une lithiase urinaire très récidivante [1]. La THP de ces malades inhibe moins la cristallisation de l'oxalate de calcium que la THP d'hommes normaux, dans des conditions simulant l'urine

humaine. Cela résulte d'une agrégation accrue de la THP elle-même qui n'est plus disponible pour interagir avec les cristaux d'oxalate de calcium. Dans une famille, le père et l'un de ses fils ont une THP anormale et une lithiase urinaire ; l'autre fils a une THP normale et n'a pas formé de calcul urinaire ; l'action inhibitrice de la THP pourrait être plus faible chez les femmes saines, tout au moins dans la famille étudiée.

[1. Hess B, *et al.* *Am J Physiol* 1991 ; 260 : F 569-78.]