

Un STRING lève le voile sur les mécanismes contrôlant l'expression des gènes *Hox*

François Spitz, Carole Herkenne, Christine Hinard, Denis Duboule

> Au cours de l'évolution, la structure des chromosomes évolue sous l'effet de réarrangements chromosomiques, tels que délétions, duplications, fusion de chromosomes, translocation et inversions. Quand on compare chez différentes espèces l'arrangement relatif des gènes, il est frappant de voir que celui-ci est parfois extrêmement conservé et forme de grands blocs de synténie. Plusieurs études chez les mammifères ainsi que chez d'autres espèces ont montré que les gènes adjacents sont souvent co-exprimés, suggérant un lien fonctionnel entre activité transcriptionnelle et organisation du génome [1].

Un tel lien est illustré de manière extrême par les gènes homéotiques (*Hox*). Ces gènes codent des facteurs de transcription à homéoboîte qui contrôlent l'identification des structures le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon [2]. Cette fonction, cruciale pour la morphogenèse de l'embryon, est intimement liée à la répartition de ces gènes le long des chromosomes. Ils sont en effet regroupés en *clusters* (complexes) et leur profil d'expression est colinéaire à leur position au sein du complexe. Cette organisation a été extrêmement conservée au cours de l'évolution (avec toutefois quelques exceptions [3]) et, chez les vertébrés, 9 à 11 gènes *Hox* sont regroupés dans des régions d'à peu près 100 kb. Il est communément accepté que l'organisation particulière des gènes *Hox* joue un rôle crucial pour coordonner leur expression le long de l'axe antéro-postérieur dans l'espace, mais surtout dans le temps, ainsi que dans d'autres domaines d'expression acquis plus tard au cours de l'évolution, comme le tube diges-

tif, ou les membres et le système urogénital [4]. Cependant, les mécanismes associés ne sont pas encore précisément connus.

Afin de tester directement l'importance du *clustering* pour les gènes *Hox*, de localiser les *enhancers* associés à leurs domaines d'expression et de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la colinéarité axiale de ces gènes, nous avons décidé de séparer un des quatre complexes *Hox* que comporte la souris en deux morceaux indépendants, par le biais d'une inversion chromosomique ciblée [5]. La technique utilisée en général pour produire de tels réarrangements repose sur plusieurs étapes de recombinaison homologue permettant d'introduire dans le génome de cellules ES murines des sites de reconnaissance *loxP*. Puis, l'expression transitoire de la recombinase CRE permet de sélectionner le réarrangement voulu entre ces sites, au terme de longues et délicates manipulations des cellules ES. Comme nous disposons déjà de souris comportant des sites *loxP* dans le *cluster HoxD*, et que des lignées comportant des sites *loxP* à plusieurs cM du complexe avaient été établies par d'autres groupes, nous avons opté pour une approche de recombinaison *in vivo*, ne nécessitant que des croisements successifs. Cette nouvelle stratégie (STRING) nous a permis, en 5 générations et après environ 500 génotypes, d'isoler une souris comportant l'inversion chromosomique de 7 cM souhaitée, entre le locus *HoxD* et la partie 3' du gene *Itga6* (Figure 1).

Nous avons choisi comme point de casure la région entre les gènes *Hoxd10*

F. Spitz, C. Herkenne, D. Duboule : National Research Centre Frontiers in Genetics, Département de Zoologie et de Biologie animale, Université de Genève, Sciences III, quai Ernest Ansermet 30, 1211 Genève 4, Suisse.
C. Hinard : Service de Génétique médicale, Hôpitaux Universitaires de Genève, rue Michel Servet 1, 1211 Genève, Suisse.
Francois.Spitz@zoo.unige.ch

et *Hoxd11*, car ceux-ci présentent des profils d'expression très similaires et qui recouvrent la plupart des sites d'expression des gènes du complexe. Quand ce dernier est « cassé » en deux, on observe une partition de ces domaines d'expression, entre l'un ou l'autre des demi-complexes (Figure 2). Les gènes associés au demi-complexe contenant *Hoxd11* conservent leur expression dans la partie distale du bourgeon de membre (l'autopode) qui formera les doigts, ainsi que dans le bourgeon génital, mais ne sont plus détectés dans la hernie intestinale ou dans la partie proximale des membres. Inversement, *Hoxd10* est exprimé dans ces deux derniers domaines, mais pas dans le bourgeon génital, ni dans l'autopode. Cette ségrégation des différents domaines entre chaque demi-complexe indique que ces domaines sont déterminés par des séquences différentes, localisées soit en 5', soit en 3' du complexe. Nous avons précédemment montré que l'expression dans l'autopode était sous le contrôle d'une séquence appelée GCR (*global control region*), située à 250 kb en 5' du complexe [6]. Ces nouvelles données confortent cette localisation et indiquent que l'élément contrôlant l'activité dans la partie proximale des membres est distincte du GCR,

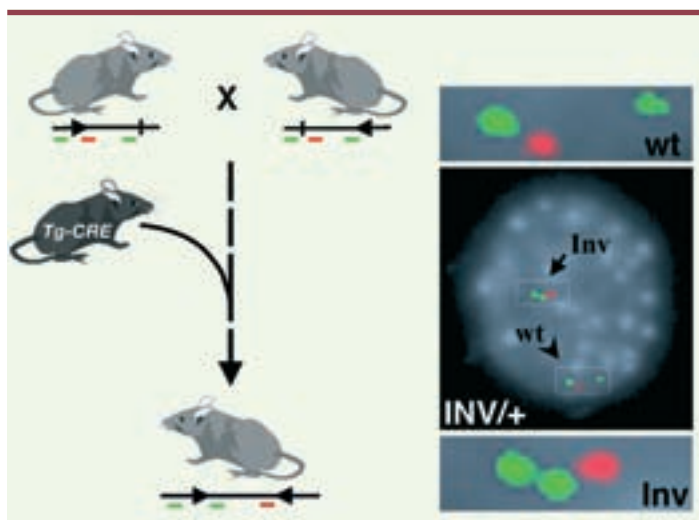


Figure 1. Stratégie STRING. Elle repose une succession de croisements visant à amener les sites *loxP* (triangle) flanquant la région d'intérêt sur un même chromosome (résultat d'un *crossing-over* en méiose), puis à introduire un transgène exprimant la recombinase CRE (Tg-CRE) afin d'induire la recombinaison (produisant une inversion ici) entre les sites *loxP*. Cette inversion peut être mise en évidence par hybridation *in situ* sur chromosomes en interphase à l'aide de sondes fluorescentes (vert ou rouge) correspondant à des BAC placés le long du chromosome. La séquence des signaux correspond à la disposition des sondes le long du chromosome. Dans un noyau de fibroblaste de souris hétérozygote pour l'inversion, on peut voir à la fois la séquence normale vert-rouge-vert (wt, pointe de flèche) et la séquence vert-vert-rouge correspondant à l'inversion du segment *Itga6-Hoxd* (Inv, flèche).

car localisé à l'autre extrémité du complexe. Incidemment, cela conforte le modèle issu de données paléontologiques qui voient dans les doigts une innovation évolutive [7] : les gènes *Hoxd* sont importants pour le développement des différentes parties du membre des tétrapodes, mais leur recrutement s'est effectué de manière indépendante pour l'autopode et le zeugopode, via des éléments régulateurs distincts.

Chez les mammifères, l'expression des gènes du complexe *HoxD* est donc sous le contrôle d'*enhancers* situés en dehors et de part et d'autre du complexe, et qui définissent des domaines de régulation chevauchants. Si cette situation est sans doute apparue tardivement au cours de l'évolution des vertébrés et n'explique peut-être pas à elle seule le maintien de ces gènes en complexe, elle y a vraisemblablement contribué, comme l'indiquent les conséquences des réarrangements chromosomiques à l'intérieur du complexe (notre inversion) ou à proximité : ceux-ci se traduisent par de nombreuses anomalies du développement y compris chez l'homme, selon leur localisation en 5' et 3' [8, 9].

De manière plus générale, de nombreux syndromes humains liés à des « effets de position » associés à des réarrangements chromosomiques sont sans doute la conséquence de la séparation entre un élément régulateur et un gène parfois situé très loin du réar-

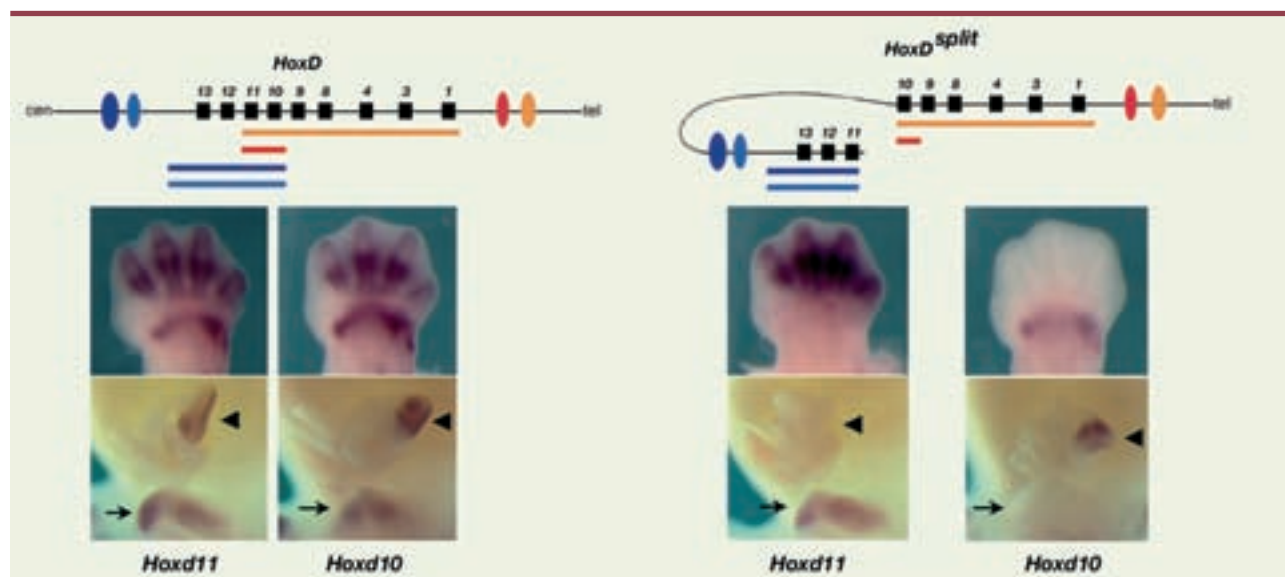


Figure 2. La séparation du complexe *HoxD* en deux entraîne une partition des domaines d'expression. La structure du complexe est indiquée schématiquement, l'inversion cassant le complexe entre *Hoxd11* et *Hoxd10* sépare chaque partie par ~3 Mb. Les domaines de co-expression sont indiqués par des barres de couleur différentes. L'expression des gènes *Hoxd11* et *Hoxd10* est analysée par hybridation *in situ*. Dans un contexte normal, ces deux gènes sont co-exprimés dans des domaines distaux (autopode) et proximaux (zeugopode) des membres, dans le bourgeon génital (flèche) et dans la hernie intestinale (pointe de flèche). Après cassure du complexe, *Hoxd11* est exprimé seulement dans l'autopode et le bourgeon génital, alors qu'à l'inverse *Hoxd10* n'est détecté que dans l'intestin et le zeugopode. Ces expériences permettent de positionner les *enhancers* (ovales de couleur) associés à ces différents domaines d'expression, soit d'un côté, soit d'un autre du complexe.

rangement [10]. L'utilisation du STRING devrait permettre de mettre à nu ces contraintes mécanistiques et de déterminer les bases fonctionnelles qui sous-tendent l'arrangement coordonné de gènes le long des chromosomes. ♦

A STRING lifts the veil on the mechanisms controlling *Hox* genes expression

REMERCIEMENTS

Nous remercions A. Sonnenberg (Netherlands Cancer Institute) pour les souris possédant un site loxP dans le gène *Itga6*. Nos travaux bénéficient du soutien du canton de Genève, des fondations Claraz et Louis-Jeantet, du Fonds National pour la Recherche Suisse, du Pôle National de

Recherche Frontiers in Genetics et des programmes européens Eumorphia et Cells to Organs.

RÉFÉRENCES

1. Hurst LD, Pal C, Lercher MJ. The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nat Rev Genet* 2004 ; 5 : 299-310.
2. Deustch J. Homéogènes. *Med Sci (Paris)* 1999 ; 15 : 401-3.
3. Seo HC, Edvardsen RB, Maeland AD, et al. *Hox* cluster disintegration with persistent anteroposterior order of expression in *Oikopleura dioica*. *Nature* 2004 ; 431 : 67-71.
4. Duboule D. Vertebrate *Hox* gene regulation : clustering and/or colinearity ? *Curr Opin Genet Dev* 1998 ; 8 : 514-8.
5. Spitz F, Herkenne C, Morris MA, Duboule D. Inversion-induced disruption of the *HoxD* cluster leads to the partition of regulatory landscapes. *Nat Genet* 2005 ; 37 : 889-93.
6. Spitz F. Gènes sans frontières : un contrôle global de l'activité transcriptionnelle à l'échelle de plusieurs gènes. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 9-10.
7. Duboule D, Sordino P. Des nageoires aux membres : l'apport de la génétique moléculaire du développement dans l'étude de l'évolution des morphologies chez les vertébrés. *Med Sci (Paris)* 1996 ; 12 : 147-54.
8. Spitz F, Monso-Hinard C, Morris M, et al. A t(2;8) balanced translocation with breakpoints near the human *HoxD* complex causes mesomelic dysplasia and vertebral defects. *Genomics* 2002 ; 79 : 493-8.
9. Dlugaszewska B, Silahatoglu A, Menzel C, et al. Breakpoints around the HOXD cluster result in various limb malformations. *J Med Genet* 2005 online.
10. Kleinjan DA, Van Heyningen V. Long-range control of gene expression : emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet* 2005 ; 76 : 8-32.

NOUVELLE

Hasard ou connivence : le récepteur des glucocorticoïdes et ses coactivateurs au bord de la crise de nerfs

Julien Grenier, Amalia Trousson, Cosima Fonte, Michael Schumacher, Charbel Massaad

Inserm UMR 488,
Faculté de médecine Paris-Sud,
80, rue du Général Leclerc,
94276 le Kremlin-Bicêtre Cedex, France.
massaad@kb.inserm.fr

> Les glucocorticoïdes (GC), hormones stéroïdes synthétisées par les corticosurrénales, sont essentielles pour le système nerveux. Les glucocorticoïdes jouent un rôle important dans le métabolisme des glucides, le stress, la neurotransmission, la survie ou l'apoptose neuronale et même dans la myélinisation. Les GC ont une grande affinité pour le récepteur des minéralocorticoïdes (MR) et une affinité moindre pour le récepteur des glucocorticoïdes (GR). On pense que les effets bénéfiques des GC, à faible dose, sont relayés par le MR alors que les effets délétères, à forte dose (stress, apoptose neuronale) passent par le GR [1]. Les cellules gliales du système nerveux, cibles privilégiées des GC, sont connues pour leur rôle trophique vis-à-vis des

neurones. Elles sont impliquées dans de nombreux processus, comme la neurotransmission, la neurorégénération ou la myélinisation.

Le mode d'action du GR est bien connu : les GC, hydrophobes, pénètrent dans le cytoplasme en traversant passivement la membrane plasmique, interagissent avec le GR et induisent l'activation du récepteur, sa dimérisation et sa translocation nucléaire. Le GR influence l'expression génique en se liant à l'ADN au niveau de séquences spécifiques, les GRE (*GC responsive elements*). Cette étape nécessite l'intervention des coactivateurs de la transcription : le GR interagit avec un des membres de la famille de coactivateurs, les p160 (SRC-1, qui existe sous deux isoformes

SRC-1a et SRC-1e, SRC-2 et SRC-3). Ils constituent une plate-forme d'accueil pour une deuxième famille de coactivateurs, CBP ou p300, qui, par leur activité d'acétylation des histones, modifient la structure chromatinienne pour créer un environnement permissif pour la transcription.

Le mode d'action des GC - mal connu dans le système nerveux - est abondamment documenté dans les organes périphériques (foie, rein, ovaires...). De plus, il semble que les récepteurs stéroïdiens recrutent d'une manière non sélective les coactivateurs de la famille des p160 (SRC-1, SRC-2 et SRC-3) ainsi que CBP et