

## Empreinte parentale : mutations nulles du gène H19

Le développement d'un embryon de mammifère requiert la présence des deux génomes paternel et maternel. La plupart des gènes sont exprimés de façon bi-allélique mais certaines régions chromosomiques portent des gènes dont l'expression est monoallélique et dépend de leur origine parentale. Ces gènes sont marqués par une « empreinte parentale » qui détermine leur expression différentielle au cours du développement embryonnaire [1]. Ce phénomène épigénétique, contrôlant l'expression des gènes qui y sont soumis, est mis en place au cours de la gamétogénèse ou dès les premiers stades de l'embryogenèse. Sa nature est encore mal comprise. Chez la souris, l'une de ces régions chromosomiques (dans la partie distale du chromosome 7) comporte un groupe de six gènes soumis à l'empreinte parentale (figure 1A). Les plus étudiés à ce jour sont les gènes *Igf2* (*insulin-growth factor 2*), exprimé à partir de l'allèle d'origine paternelle et *H19*, exprimé à partir de l'allèle maternel et situé à 90 kb en aval du gène *Igf2*.

Le gène *H19* est exprimé sous la forme d'un ARN non traduit dont la fonction est encore inconnue (*m/s n° 10, vol. 11, p. 1483*). Cet ARN est détecté dès le stade blastocyste de l'embryon puis tout au long de l'embryogenèse. Après la naissance, son expression est réprimée dans la plupart des tissus à l'exception du muscle squelettique. Pour tenter d'élucider le rôle de ce gène, des mutations nulles ont été réalisées par recombinaison homologue. Deux lignées de souris *H19<sup>-/-</sup>* ont été obtenues, appelées *H19Δ13* [2] et *H19Δ3* [3]. La mutation *H19Δ13* comporte une délétion de 13kb couvrant tout le gène (3kb) et 10kb de la région localisée en 5' du gène, la mutation

*H19Δ3* comporte une délétion couvrant le gène seul (3kb). Les souris *H19<sup>-/-</sup>* sont viables et fertiles. Ce résultat suggère que ce gène n'est donc pas indispensable pour le développement normal de l'embryon. Ces animaux présentent un phénotype d'augmentation de poids par rapport aux animaux de type sauvage (*H19<sup>wt</sup>*). Cette augmentation est de 28 % chez les mutants *H19Δ13* et de 8 % chez les mutants *H19Δ3* (Tableau I). L'analyse détaillée des animaux a montré que l'expression des gènes *H19* et *Igf2* était étroitement liée. Un croisement réalisé entre des femelles hétérozygotes pour la mutation *H19* (dont le poids est supérieur aux souris normales) et des mâles hétérozygotes pour la mutation *Igf2* (dont le poids est inférieur aux souris normales) (*m/s n° 10, vol. 11, p. 1483*) a permis d'établir que l'expression du gène *Igf2* devient bi-allélique en absence du gène *H19*. Cette expression bi-allélique est responsable du phénotype de poids observé. On constate donc une perte de l'empreinte parentale du gène *Igf2* aussi bien chez les animaux *H19Δ13* que *H19Δ3*. Cependant le taux d'expression du gène *Igf2* est corrélé au poids des animaux. Chez les animaux *H19Δ13*, l'ARN *Igf2* maternel est transcrit (dans le muscle) à un niveau comparable au transcrit paternel (100%), alors que chez les animaux *H19Δ3*, l'ARN maternel ne représente que 25 % du transcrit paternel (Tableau I).

La comparaison des deux mutations *H19Δ13* et *H19Δ3* a permis d'émettre plusieurs hypothèses concernant le mécanisme d'interaction de ces deux gènes :

- L'ARN *H19* lui-même pourrait réprimer l'expression du gène *Igf2*, en agissant en *cis* sur l'allèle mater-

nel. Cette régulation présenterait une analogie avec le gène *Xist* capable de contrôler en *cis* les gènes présents sur le chromosome X inactif [4]. Cependant, puisque les phénotypes des deux mutations diffèrent, la séquence de 10 kb en 5' de *H19*, délétée dans la mutation *H19Δ13*, serait également impliquée dans la dérégulation de l'expression du gène *Igf2*.

- Le gène *H19* possède une séquence *enhancer* située à 8kb en aval du gène (figure 1B). La délétion de cette séquence *enhancer* par recombinaison homologue [5] a permis de montrer que, sur l'allèle maternel, cet *enhancer* contrôlait l'expression de *H19*, alors que sur l'allèle paternel, cet *enhancer* était utilisé par le gène *Igf2*. C'est ainsi qu'a été proposée l'hypothèse d'une compétition entre les deux promoteurs *H19* et *Igf2* pour ce même *enhancer* (*m/s n° 2, vol. 10, p. 216; n° 10, vol. 11, p. 1483*). Dans les deux mutants *H19Δ13* et *H19Δ3*, le promoteur du gène *H19* a été délété et remplacé par un gène de résistance au G418 (*neo<sup>r</sup>*) sous contrôle de deux promoteurs différents (*Pgk* et *Pytk* respectivement). L'absence du promoteur *H19* sur l'allèle maternel permettrait à l'*enhancer* d'interagir avec le promoteur du gène *Igf2*. La différence des phénotypes observés (100 % et 25 % de transcrits *Igf2* maternels) s'expliquerait par la présence dans les gènes de remplacement *neo<sup>r</sup>* des deux promoteurs différents (*Pgk* et *Pytk*) qui influencerait sur l'efficacité de cet *enhancer* et conduirait à une expression plus ou moins forte du gène *Igf2*.

- La délétion de 13kb ou de 3kb introduite respectivement dans les deux mutations (et remplacée par le gène *neo<sup>r</sup>* de 1kb) pourrait induire une modification importante de la

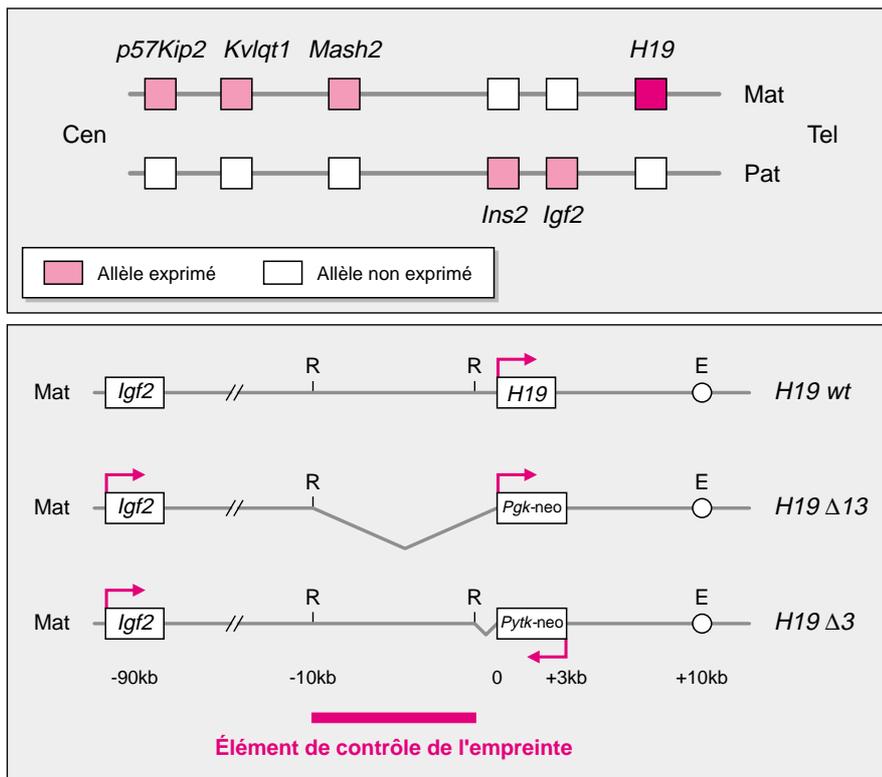


Figure 1. **Région distale du chromosome 7 murin. A. Les gènes soumis à l’empreinte parentale.** Cette région de 600kb contient six gènes soumis à l’empreinte parentale [8] Cen: centromère; Tel: télomère; Mat: allèle d’origine maternelle; Pat: allèle d’origine paternelle. Les allèles exprimés sont indiqués par des carrés rouges, les allèles non exprimés par des carrés blancs. **B. Schéma comparatif des mutations nulles du gène H19.** La région chromosomique d’origine maternelle (Mat) portant les gènes Igf2 et H19 est représentée schématiquement pour les souris de type sauvage (H19wt) et les deux mutations nulles (H19Δ13 et H19Δ3). Les flèches rouges correspondent aux gènes exprimés et indiquent le sens de transcription. E: séquence enhancer commune aux deux gènes. R: site de restriction EcoRI. Les gènes de remplacement sont indiqués: Pgk-neo et Pytk-neo (aussi appelé pMC1-neo). L’élément de contrôle est représenté par la barre rouge.

Tableau I				
PHÉNOTYPES DES MUTATIONS NULLES DU GÈNE H19				
Souris	Poids	Expression Igf2 pat	Expression Igf2 mat	Expression neo'
H19 wt	100%	100%	0%	–
H19Δ13	128%	100%	100%	bi-allélique
H19Δ3	108%	100%	25%	monoallélique

structure de la chromatine. Cela conduirait, par un effet de contrôle à distance, à une expression anormale de l’allèle maternel du gène *Igf2*.

L’analyse détaillée des mutants *H19Δ3* a également permis d’étudier la régulation de l’empreinte de *H19*. Il a été mis en évidence que le gène de remplacement *neo'* est lui-même soumis à l’empreinte parentale: en effet, chez un animal hétérozygote pour la mutation *H19*, lorsque le gène *neo'* est porté par l’allèle maternel, il est exprimé, mais ce gène reste silencieux lorsqu’il est porté par l’allèle paternel (Tableau I et figure 1B). Les mutants *H19Δ13*, en revanche, expriment le gène *neo'* de façon bi-allélique. La comparaison de ces deux mutations a permis de postuler qu’il existe dans la région 5' en amont du gène *H19* (10kb) un élément de contrôle de l’empreinte parentale (figure 1B). Des travaux récents [6] ont mis en évidence une séquence de 2 kb localisée dans cette région 5' présentant une méthylation différentielle (seul l’allèle paternel est méthylé). Cette méthylation est présente dans le spermatozoïde et dans les premiers stades de l’embryogenèse et se maintient tout au long du développement de l’embryon. Les auteurs suggèrent que cette séquence de 2 kb serait un élément-clé de l’empreinte de *H19*.

En parallèle, une expérience intéressante a montré que l’introduction d’une partie de la séquence de 2 kb dans le génome de la drosophile, à proximité du gène *white*, conduit à l’extinction indépendante de l’origine parentale de l’expression de ce gène qui se traduit par une perte de la pigmentation de l’œil de la drosophile transgénique [7]. Cette région de *H19* contiendrait donc un élément capable de rendre silencieux (effet *silencer*) un gène adjacent. L’une des particularités de la drosophile est l’absence de méthylation des séquences CpG de son ADN, à la différence des mammifères. La structure chromatiniennne de cette région en elle-même (ou associée à des protéines spécifiques) serait donc capable de jouer un rôle dans le contrôle de l’expression des gènes. Chez la souris, la présence de cet élément *silencer* déterminerait par

défaut la non-expression de l'allèle paternel. L'expression de l'allèle maternel résulterait donc d'un mécanisme actif. La méthylation différentielle observée sur cette séquence chez la souris semblerait donc représenter un mécanisme additionnel (par rapport à la drosophile) de verrouillage de l'expression des gènes. Ces expériences confirment que la méthylation chez les mammifères est impliquée dans le maintien de l'empreinte (*m/s n° 2, vol. 10, p. 216*). En conclusion, l'étude des mutations nulles du gène *H19* a permis d'identifier un élément de contrôle de l'empreinte parentale. Cet élément de contrôle présente une méthylation différentielle détectable dans le

spermatozoïde et au cours des premiers stades embryonnaires chez la souris. Chez la drosophile, cet élément possède une activité *silencer*, suggérant une structure chromatinienne particulière. Ces données récentes devraient permettre d'approfondir le mécanisme d'action et le rôle de cet élément de contrôle dans le phénomène de l'empreinte parentale.

L.D.

1. Babinet C. L'empreinte génomique parentale. *Med Sci* 1992; 8: 65-70.
2. Leighton PA, Ingram RS, Eggenschwiler J, Efstratiadis A, Tilghman SM. Disruption of

- imprinting caused by deletion of the *H19* gene region in mice. *Nature* 1995; 375: 34-9.
3. Ripoché MA, Kress C, Poirier F, Dandolo L. Deletion of the *H19* transcription unit reveals the existence of a putative imprinting control element. *Genes Dev* 1997; 11: 1596-604.
  4. Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. The *Xist* gene is required in cis for X chromosome inactivation. *Nature* 1996; 379: 131-7.
  5. Leighton PA, Saam JR, Ingram RS, Stewart CL, Tilghman SM. An enhancer deletion affects both *H19* and *Igf2* expression. *Genes Dev* 1995; 9: 2079-89.
  6. Tremblay K, Duran K, Bartolomei M. A 5' 2-kilobase-pair region of the imprinted mouse *H19* gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4322-9.
  7. Lyko F, Brenton JD, Surani MA, Paro R. An imprinting element from the mouse *H19* locus functions as a silencer in *Drosophila*. *Nature Genet* 1997; 16: 171-3.
  8. Reik W, Maher ER. Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* 1997; 13: 330-4.



## Thérapie génique et maladies du sang

chimie,  
biologie

Responsables scientifiques  
Paul-Henri ROMEO, École polytechnique  
Daniel SCHERMAN, Cnrs, École polytechnique  
Rhône-Poulenc RORER

Le transfert de gènes dans des cellules humaines a pu être envisagé, lorsque les mécanismes moléculaires de l'induction de certains cancers par des virus ont été découverts. Ce transfert semble être une des voies les plus prometteuses dans le traitement des maladies génétiques et des maladies acquises comme le Sida, les cancers solides, ou les leucémies.

De plus, le renouvellement extrêmement dynamique des cellules du sang, via les cellules hématopoïétiques, est souvent compromis lors des chimiothérapies lourdes employées dans le traitement de certains cancers. Dans ce cas, la thérapie génique permet de rendre ces cellules résistantes à la chimiothérapie.

Les progrès dans les domaines de la biologie cellulaire des cellules hématopoïétiques, de l'étude moléculaire de l'expression des gènes spécifiques de ces cellules, et du transfert de gènes annoncent des révolutions thérapeutiques majeures.

### Intervenants

Patrice DENEFFLE, Directeur de Recherches, Division Thérapie Génique et Cellulaire, RHÔNE-POULENC RORER  
Anne DUBART, Institut Gustave-Roussy  
Paul-Henri ROMEO, Maître de Conférences à l'École polytechnique, Directeur de l'Unité Génétique Moléculaire et Hématologie, Inserm  
Daniel SCHERMAN, Directeur de Recherches Cnrs, Maître de Conférence à l'École polytechnique, Directeur de l'unité mixte Cnrs - Rhône Poulenc Rorer « vectorologie moléculaire »  
Frédéric TRIEBEL, Professeur, Directeur de l'Unité Système Immunitaire et Cancers, Inserm  
William VAINCHENKER, Directeur de Recherches, Directeur de l'Unité Hématopoïèse et Cellules Souches, Inserm

### Objectifs

- exposer les bases cellulaires et moléculaires du transfert de gènes en général, dans les cellules hématopoïétiques en particulier
- présenter les différentes stratégies de modification du patrimoine génétique de ces cellules
- montrer les bénéfices que la santé humaine peut trouver dans le développement de ces nouvelles technologies

### Public

Médecins, pharmaciens, ingénieurs, cadres et chercheurs en chimie, pharmacologie et biologie

### Programme

#### Introduction à la thérapie génique

- Transfert de gènes dans les cellules somatiques
- Maladies susceptibles de bénéficier d'une thérapie génique

#### Biologie cellulaire de l'hématopoïèse

- Les cellules souches hématopoïétiques
- Régulation de la production des cellules différenciées par les facteurs de croissance
- La thérapie génique du système hématopoïétique est-elle possible ?

#### Biologie moléculaire de l'hématopoïèse

- Du gène à la protéine : les mécanismes de l'expression génétique
- Les différentes catégories de cellules sanguines expriment des gènes différents

- Comment assurer l'expression d'un gène correcteur ?

#### Thérapie génique et immunologie

- Les acteurs de la réponse immunitaire chez l'individu sain
- Le traitement des déficits immunitaires primitifs par thérapie génique
- Les modificateurs de la réponse biologique et leur emploi dans les maladies acquises du système immunitaire : maladies auto-immunes, cancers, Sida.

#### Quels vecteurs pour la thérapie génique ?

- Vecteurs viraux et non viraux : leurs avantages spécifiques
- Du transfert de gène expérimental à la réalité clinique, les étapes à franchir
- Les vecteurs de demain

1 jour  
16 janvier 1998

École polytechnique, Palaiseau  
3 000 F HT

7.2

COLLÈGE DE POLYTECHNIQUE  
CNIT

2, place de la Défense BP 230, F-92053 PARIS LA DÉFENSE, Tél. : 01 46 92 21 49 Fax : 01 46 92 21 60