

Une thérapeutique génique pour des souris stériles

Une équipe américaine menée par A.J. Mason, de Genentech, vient d'élucider le mécanisme moléculaire d'un hypogonadisme de la souris et, dans la foulée, de le guérir par une thérapeutique génique.

La régulation centrale de la fonction de reproduction chez les mammifères est médiée par l'hypothalamus. Elle repose sur l'expression correcte d'un seul gène, dont le produit primaire est protéolysé et donne deux peptides : un décapeptide, l'hormone de libération de la gonadotropine (*gonadotropin releasing hormone, GnRH*), et son peptide associé de 56 acides aminés (*GnRH associated peptide, GAP*), dont l'action freine la sécrétion de la prolactine.

Les auteurs ont isolé et cloné le gène de la GnRH de la souris. Ils ont analysé la séquence de ses 5054 nucléotides, dont seulement 270 sont utilisés pour le codage des 90 acides aminés que compte son produit protéique primaire. Le gène contient quatre exons, dont le premier est non codant. L'exon 2 code pour la séquence signal de 21 acides aminés, le décapeptide GnRH, les trois acides aminés destinés à être excisés lors de la maturation, et les 11 premiers du GAP. Le reste de ce dernier provient des exons 3 et 4 (*figure 1*).

On connaît depuis dix ans un mutant hypogonadique *hpg* [1], dont la sécrétion de gonadotropine est déficiente et dont les organes génitaux ne se développent pas ; la transmission de la tare est autosomique récessive. L'analyse de l'ADN génomique de souris *hpg* [2] a montré que le gène de ces souris est normal jusqu'au nucléotide 2700. Au delà, il est délété et cette délétion, dont la limite en 3' n'a pas encore été précisée, s'étend sur plus de 33 kb. Elle englobe donc les exons 3

et 4 mais respecte l'exon 2 : est présente, par conséquent, la partie du gène qui code pour la séquence signal, le décapeptide GnRH et les 11 premiers acides aminés du GAP (*figure 1*). Les études d'expression montrent que le gène tronqué est transcrit et qu'un messager peut être mis en évidence, bien qu'en quantité moindre. Rien ne s'oppose donc en principe à ce que le décapeptide soit synthétisé. Cependant ni sur le plan physiologique (absence de développement des gonades) ni par des tests immunologiques, on ne peut détecter la présence de GnRH, pas plus que de la partie N-terminale du GAP. La raison de cette absence de synthèse n'est pas encore élucidée.

Mason et al. [3] ont alors entrepris de doter les souris *hpg* d'un gène GnRH correct. Ces souris étant stériles, il a fallu employer une méthode génétique assez complexe. On utilise un fragment de 13,5 kb contenant le gène et les séquences flanquantes des deux côtés. Deux sondes qui, combi-

nées, distinguent gène normal, transgène et *hpg*, ont été préparées. Dans un premier temps, le transgène est introduit dans des souris normales ; celles-ci sont croisées avec des hétérozygotes *hpg/+*. Les souris identifiées comme étant à la fois hétérozygotes *hpg/+* et transgéniques sont enfin accouplées, donnant naissance à des animaux dont certains sont homozygotes *hpg* et porteurs du transgène.

Il devient alors possible d'analyser les effets du gène transféré. On constate que la guérison est totale. La fonction de reproduction est restaurée dans les deux sexes ; le développement des gonades est correct, tant au niveau macro que microscopique. Le taux sérique de FSH est normal, celui de LH reste un peu abaissé. La distribution tissulaire et le taux des peptides GnRH et GAP sont très voisins de ceux des témoins ; la répartition des neurones cérébraux contenant ces deux peptides est presque identique. Le résultat le plus remarquable est

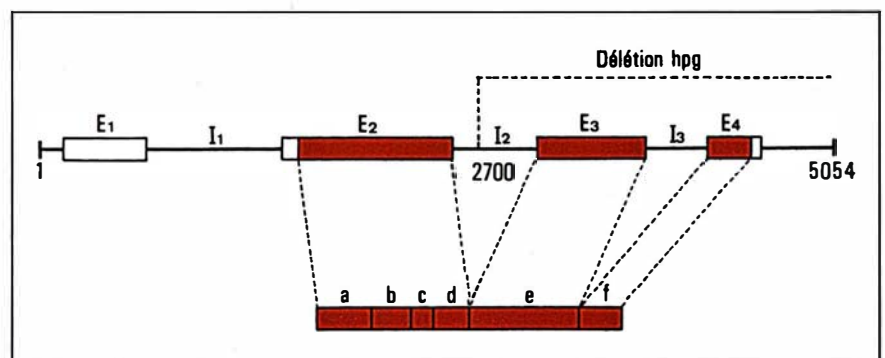


Figure 1. Le gène GnRH et sa traduction protéique. a : peptide signal, 21 acides aminés ; b : GnRH, 10 acides aminés ; c : zone d'excision, 3 acides aminés ; d, e, f : GAP, 11 + 32 + 13 = 56 acides aminés. La longueur des exons par rapport aux introns n'est pas respectée. 2700 : début de la délétion chez les souris *hpg* ; elle s'étend ensuite vers la droite.

donc une régulation presque parfaite de la sécrétion des peptides, respectant la localisation et le rythme pulsatile de celle-ci. Ce succès contraste avec les effets des greffes de tissu foetal préoptique [4] : les greffes, faites il est vrai chez l'adulte, restaurent le phénotype normal, mais ne restaurent ni des cycles convenables chez la femelle ni la fertilité chez le mâle. Le travail très brillant que nous venons de résumer ouvre la voie à d'importants développements : définition précise des rôles des peptides GnRH et GAP, et surtout production d'animaux hpg transgéniques contenant des mutations dans la partie qui code pour GnRH ou GAP. J.-C.D.

1. Cattanach BM, Iddon CA, Charlton HM, Chiappa SA, Fink G. Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature* 1977 ; 269 : 338-40.
2. Mason AJ, Haylick JS, Zoeller RT, et al. A deletion truncating the gonadotrophin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 1986 ; 234 : 1366-71.
3. Mason AJ, Pitts SL, Nikolics K, et al. The hypogonadal mouse : reproductive functions restored by gene therapy. *Science* 1986 ; 234 : 1372-8.
4. Gibson MJ, Krieger DT, Charlton HM, et al. Mating and pregnancy can occur in genetically hypogonadal mice with preoptic area brain grafts. *Science* 1984 ; 225 : 949-51.

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ La surinfection par le virus herpès de lymphocytes T CD₄(+) infectés par HIV (agent du SIDA) peut induire la transcription du génome rétroviral, et donc activer une infection latente par HIV. Le mécanisme en serait la stimulation de séquences régulatrices du LTR rétroviral intégré dans l'ADN de la cellule infectée par une protéine « active en trans » codée par le virus herpès. Un tel mécanisme indique qu'une infection par un virus herpès d'un porteur sain d'HIV peut déclencher l'entrée dans la maladie. [Mosca et al. *Nature* 1986 ; 325 : 67-70.]

m/s n° 4 vol. 3, avril 87

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ L'hyperexpression d'oncogènes cellulaires dans des souris transgéniques peut provoquer des anomalies du développement et de la maturation de certains tissus. c-fos est l'oncogène cellulaire homologue du gène transformant de plusieurs espèces de rétrovirus murins responsables du développement d'ostéosarcomes.

Lorsqu'une cellule est stimulée, c-fos se met rapidement à proliférer, le contrôle de son expression étant transcriptionnel (par l'intermédiaire d'un « enhancer » régulé par les facteurs de croissance du sérum) et post-transcriptionnel, via la possible destabilisation du messenger due à la reconnaissance par des protéines d'un élément situé dans la région 3' non codante. Des souris transgéniques exprimant le gène c-fos sous le contrôle de différents types de promoteurs ont été créées ; le messenger du transgène est délété dans sa partie 3' et est donc stable. L'hyperexpression de c-fos dans différents organes des animaux transgéniques et de leur descendance n'entraîne aucune tumeur, mais des malformations osseuses combinant une augmentation de la résorption ostéoclastique et l'apposition d'os nouveau en rapport avec une stimulation ostéoblastique [1]. Voici quelques mois, une autre équipe avait montré que l'hyperexpression de c-myc dans les lymphocytes B d'animaux transgéniques créés par l'injection du gène c-myc placé sous le contrôle du « enhancer » des chaînes lourdes d'immunoglobuline, entraînait des perturbations du développement des lignées lymphocytaires B [2]. Tous ces résultats démontrent que les oncogènes cellulaires sont impliqués in vivo dans le développement normal des tissus.

[1. Rüther U et al. *Nature* 1987 ; 325 : 412-6.]

[2. Langdon WY et al. *Cell* 1986, 47 : 11-8.]

■■■ Le facteur VIII ou anti-hémophilique A est une molécule de très grande taille. Ses 2332 acides aminés sont répartis en trois types de domaines A,B,C ; le domaine B, hautement glycosylé, disparaît lors de l'activation protéolytique du facteur VIII par la thrombine. Les chercheurs de Genentech, qui avaient déjà réalisé son clonage, ont obtenu par les méthodes de recombinaison de l'ADN une construction dans laquelle la plus grande partie du domaine B est délétée, puisqu'il passe de 909 à 142 acides aminés. Exprimé dans des cellules de mammifères, ce facteur VIII *racourci* est activé par la thrombine et se fixe sur le facteur Willebrand comme son homologue « normal ». C'est la première étape vers la fabrication du « minifacteur VIII » recombinant actif, objectif que nous annoncions dès le n° 1, vol. 1, p. 50 de m/s.

[Eaton DA, et al. *Biochemistry* 1986 ; 25 : 8343-7.]

■■■ Probablement du fait des nombreuses anomalies génétiques qui lui sont rattachées, le chromosome X a fait récemment l'objet d'études multiples pour détecter des polymorphismes de restriction à l'aide de sondes appropriées. On a pu en tirer l'impression que sa variabilité génétique était plus grande que celle des autosomes. On a donc comparé le nombre de polymorphismes de restriction trouvés sur 17 autosomes et sur l'X en employant des sondes digérées par six enzymes de restriction. En réalité, la fréquence des polymorphismes s'est montrée trois fois moindre sur le chromosome X que sur l'ensemble des autosomes, et les auteurs vont jusqu'à suggérer que l'X serait en fait une « niche de mutation basse ».

[Hofker MH, et al. *Am J Hum Genet* 1986 ; 39 : 438-51.]