

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

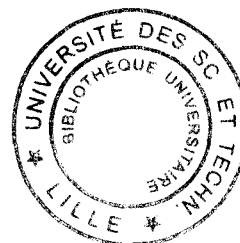
UFR DE BIOLOGIE

## THESE

*POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR D'UNIVERSITE  
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

PRESENTEE PAR

**Eric ADRIAENSSENS**



**Modulations de l'expression du gène *H19* au cours du développement de la glande mammaire et de l'utérus et dans les cancers du sein.**

Présentée le 16 Décembre 1998 devant la commission d'examen:

Président	Professeur B. BOILLY
Rapporteurs	Docteur L. DANDOLO Professeur Y. DE LAUNOIT
Examineurs	Docteur J. COLL Professeur D. STEHELIN Professeur J.J. CURGY

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie M. le Professeur Bénoni Boilly d'avoir bien voulu présider mon jury de thèse. Je le remercie, en outre, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir ainsi permis de réaliser les travaux ici présentés. Je garde en mémoire les discussions, parfois vives, qui ont jalonné mon séjour dans le laboratoire et qui ont aiguillé mes recherches.

Je remercie vivement Mme Luisa Dandolo et M. le Professeur Yvan De Launoit d'avoir accepté de juger et de critiquer ce mémoire. J'espère que cette tâche ne leur a pas été trop pénible. Je leur suis reconnaissant pour les commentaires et suggestions apportés à ce travail.

Je remercie M. le Professeur Dominique Stéhelin d'avoir bien voulu honorer de sa présence mon jury de thèse.

Je remercie M. le Professeur Jean Jacques Curgy qui m'a accompagné et guidé pendant quatre années, me communiquant sa passion pour la recherche. Qu'il soit remercié pour avoir encadré et orienté les recherches effectuées, pour ces plaisanteries grivoises, mais surtout pour la confiance qu'il accorde aux membres de son groupe et pour avoir su maintenir une excellente ambiance au sein de l'équipe quel que soit les tensions extérieures.

Je remercie M. Jean Coll pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux durant toute ma thèse, pour m'avoir permis d'effectuer certaines expériences dans son laboratoire. Ses conseils avisés et son aide ont largement contribué à l'obtention des résultats décrits dans ce mémoire. Qu'il soit remercié aussi pour la confiance qu'il m'a témoignée dernièrement.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe *H19* sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Thierry Dugimont qui m'a initié à de nombreuses techniques et qui m'a accompagné durant toute cette thèse, Lionel Dumont dont le trop court séjour reste inoubliable et Séverine Lottin qui a apporté à notre groupe une touche féminine et dont l'aide précieuse a été essentielle. Je garderai un excellent souvenir de cette équipe joviale.

Je remercie enfin toutes les personnes qui à un moment ou un autre sont intervenues et ont contribué à l'obtention des résultats : l'ensemble du laboratoire de « Biologie du Développement » en particulier Céline Soulié, William Fauquette, Ikram ElYazidi, Valérie Lambrecht, Hubert Hondermark, Simon Descamps, Anne-Sophie Vercoutter, Xu-Fen Dong Le Bouhris, Xavier Desbiens, Isabelle Pollet et Sylviane Derache ; Les membres du groupe « *in situ* » de l'IPL dirigé par M. Bernard Vandebunder : Frédéric Gilles, Virginie Mattot, Christelle Huget et Fatima Bouali. Je remercie aussi M. le professeur Jean Paul Dupouy et Mme Alice Delobelle pour leur aide inestimable.

## SOMMAIRE

<b>Résumé</b>	<b>p. 1</b>
<b>Introduction</b>	<b>p. 2</b>
Structure du gène <i>H19</i>	p.2
Non-traduction de l'ARNm <i>H19</i>	p.3
Empreinte génomique	p.5
Mécanismes de la mise en place de l'empreinte	p.8
Expression du gène <i>H19</i> et tumorigenèse	p.10
Modulations de l'expression du gène <i>H19</i> dans les cellules en culture	p.12
Rôle du gène <i>H19</i>	p.14
Objectifs de notre recherche	p.16
<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>p. 18</b>
Animaux	p.18
Action systémique des hormones stéroïdes	p.18
Dosages des hormones circulantes	p.19
Adénocarcinomes du sein	p.19
Cellules	p.20
- Cellules épithéliales mammaires humaines	p.20
- Souche CEMN	p.20
- Souche HBL-100	p.20
- Souche MCF-7	p.21
- Souche MDA-MB-231	p.21
- Autres types cellulaires	p.21
- Souche MRC-5	p.21
- Souche Calu-6	p.21
- Souche HeLa	p.21
Culture des cellules épithéliales mammaires	p.22
Culture Tridimensionnelle des cellules épithéliales mammaires	p.23
Transfections	p.23



Hybridation moléculaire <i>in situ</i> (HIS)	p.25
- Préparation des coupes histologiques et des différentes cultures	p.25
- Synthèse des ribosondes: sens et antisens	p.25
- Hybridation moléculaire <i>in situ</i>	p.26
- Autoradiographie	p.27
Technique du “ Northern blot ”	p.28
- Extraction des ARN totaux	p.28
- Electrophorèse en gel d’agarose dénaturant	p.28
- Transfert des ARN	p.28
- Elaboration de la sonde	p.29
- Hybridation et lavages	p.29
<b>Résultats</b>	<b>p.30</b>
<b>Premier chapitre:</b> Expression du gène <i>H19</i> au cours du développement de la glande mammaire.	p.30
<b>Deuxième chapitre:</b> Expression du gène <i>H19</i> dans des carcinomes mammaires.	p.32
<b>Troisième chapitre:</b> Modulation <i>in vivo</i> du gène <i>H19</i> .	p.36
<b>Quatrième chapitre:</b> Modulation <i>in vitro</i> du gène <i>H19</i>	p.39
<b>Cinquième chapitre:</b> Régulation du promoteur du gène <i>H19</i> .	p.42
<b>Discussion</b>	<b>p.44</b>
<b>Conclusion</b>	<b>p.58</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>p.60</b>
<b>Publications</b>	<b>p.79</b>
- Dugimont T. et al., 1998. The <i>H19</i> TATA-less promoter is efficiently repressed by the wild type tumor suppressor gene product p53. <i>Oncogene</i> , <b>16</b> , 2395-2401.	

- **Adriaenssens E.** et al., 1998. *H19* overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumor values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression. *Am. J. Pathol.*, **153**, 1597-1607.
- **Adriaenssens E.** et al., 1998. Steroid hormones modulate *H19* gene expression in both mammary gland and uterus. *Oncogene*, soumis.

## RESUME

Le gène *H19* est co-régulé avec celui de l' $\alpha$ -fœto-protéine au cours de la vie intra-utérine. Fortement exprimé avant la naissance, *H19* est réprimé dans une période néonatale; mais chez l'adulte son expression conserve un niveau basal dans la glande mammaire, les muscles squelettiques et le cœur. Cette activité pérenne dans la glande mammaire a motivé notre intérêt pour cet organe dans le but d'élucider dans le temps et dans l'espace le devenir des transcrits *H19*, les modalités de la transcription du gène et des aspects de sa régulation *via* son promoteur.

Ce projet a été envisagé dans des états physiologiques normaux ou pathologiques. Notre travail est centré sur la glande mammaire. Mais le cours de notre recherche nous a conduit à considérer, avec intérêt, d'autres modèles, par exemple l'action des hormones stéroïdes sur *H19* a aussi été étudiée dans l'utérus et les cellules HeLa ou Calu 6, originelles du col utérin et du poumon respectivement, ont permis de déterminer des éléments de la régulation du promoteur de *H19*. Nos principaux résultats sont résumés ci-dessous.

1) *H19* est fortement exprimé dans les ébauches mammaires du fœtus de souris; réprimé à la naissance; il est fortement activé à la puberté de l'animal. Il subit alors une répression qui persiste jusqu'à une gestation, au cours de laquelle il est à nouveau surexprimé. *H19* est inhibé pendant l'allaitement et il recouvre une activité basale après le sevrage des souriceaux.

2) Dans l'utérus de souris, au cours du cycle oestrien *H19* est fortement exprimé lors de l'oestrus et du metoestrus, faiblement transcrit en prooestrus et inhibé en dioestrus.

3) Une étude statistique sur 102 adénocarcinomes humains de types variés nous a conduit aux données suivantes: a) *H19* est surexprimé dans 72% des cancers; b) cette surexpression survient le plus fréquemment dans le stroma (92% des cas), rarement dans les seules cellules cancéreuses (3% des cas); c) les transcrits *H19* sont abondants à l'interface épithélium/mésenchyme; cette situation pourrait les impliquer dans le dialogue des deux types de tissus; d) la surexpression de *H19* est significativement corrélée au facteur T (classification TNM) et à la présence des récepteurs aux hormones stéroïdes; en revanche, nous n'avons pu corréliser significativement l'expression de *H19* au grade de la tumeur, à l'âge des patients, au statut ménopausal, à la survie cinq ans après tumorectomie, à la présence de p53 et à celle d'une protéine marqueur du cycle cellulaire, Ki67.

4) Dans le but d'éprouver l'hypothèse du rôle des stéroïdes dans la régulation de *H19*, nous avons recherché leur action en mode systémique sur des souris pré- ou post-pubères ovariectomisées et surrénalectomisées. Des injections d'une ou de plusieurs hormones ont permis de conclure que dans l'utérus le 17- $\beta$ -oestradiol (E2) et la corticostérone (B) régulent positivement *H19*, alors que la progestérone (P) seule n'a aucune action et en association elle contrarie celles de E et C.

5) Après avoir accumulé des résultats sur le mode d'expression du gène *H19* dans les cellules *in situ*, nous avons tenté d'affiner notre approche par des stratégies *in vitro* (culture de cellules mammaires). Les résultats se résument ainsi: a) *H19* est stimulé par E2 et cette stimulation est inhibée par le tamoxifène; b) *H19* est réprimé par le TGF $\beta$ ; c) la culture des cellules dans une matrice de collagène (en 3-dimensions) active *H19* et ce phénomène est amplifié par l'ajout de milieu conditionné par des fibroblastes. Des co-transfections de cellules mammaires par un vecteur contenant le promoteur de *H19* et un gène rapporteur et un vecteur recombiné par le récepteur à P (RP) ou à E2 (RE) sauvage ou muté, nous ont permis de proposer que RP inhibe *H19*, alors que E2 et RE régulent positivement le gène. L'action de RE en absence de ligand (E2) et celle de mutants RE nous font conclure à une régulation possible du gène *via* la zone ligand-indépendante de RE.

6) La protéine p53 sauvage régule négativement le gène *H19*. Cette propriété a été bien établie, en particulier, grâce au phénotype exprimé par un mutant thermosensible cultivé en situation permissive ou non-permissive (*trans*-dominant négatif).

En conclusion, nous avons mis en évidence de nombreuses modulations du gène *H19* dans des situations normales ou pathologiques. Il apparaît que le gène est fortement exprimé lors de remodelages conséquents d'un organe; cette surexpression s'accompagne de phénomènes de différenciation et/ou de prolifération cellulaires, mais probablement que les phases finales de ces deux mécanismes n'impliquent pas *H19*. Ce dernier est probablement concerné par le dialogue épithélium/mésenchyme au sein de la glande mammaire normale, cancéreuse ou lors de cultures dites en 3-dimensions. La fréquente absence d'expression du gène *H19* dans les cellules épithéliales cancéreuses et la corrélation de la surexpression du gène avec les récepteurs aux hormones dans les cancers font tendre à attribuer à *H19* un rôle de suppresseur de tumeurs.

## INTRODUCTION

## Structure du gène *H19*

Au début des années 80, l'équipe de Shirley Tilghman à Princeton (USA) étudiait chez la souris le taux d'alpha-fœtoprotéine (AFP) dans le sang et découvrait que ce taux est régulé par deux *loci* non liés *raf* et *Rif*. Le premier détermine le taux basal de l'ARNm de l'AFP chez la souris adulte ; le second contrôle l'induction du gène *AFP* dans le foie en régénération. L'équipe de Tilghman se pose alors la question de l'éventuelle existence d'autres gènes régulés par *raf* et *Rif*. Par criblage de banques d'ADN complémentaire de foie fœtal de souris un clone est découvert, nommé pH19, dont la quantité d'ARNm correspondant chute dramatiquement après la naissance des animaux. Les deux gènes s'expriment dans les mêmes tissus chez le fœtus, mais une caractéristique distingue immédiatement la régulation de *H19* (nommé ainsi actuellement) de celle de l'*AFP* ; il s'agit du maintien de l'expression du premier dans le cœur et dans les muscles squelettiques ; cela conduit les auteurs à proposer que dans ces organes, *H19* est indépendant de *raf* (Pachnis *et al.*, 1984). L'équipe de Tilghman précise que le gène *H19* est localisé sur le chromosome 7, et n'est lié à aucun des gènes *raf*, *Rif* ou *AFP*. Le transcrit mesure 2,5 kb.

Tilghman et ses collaborateurs poursuivent leur travail en clonant *H19* et en déterminant sa séquence nucléotidique (Pachnis *et al.*, 1988). La structure de ce gène présente la caractéristique peu fréquente de l'existence de petits introns (quatre de 53 à 82 pb) qui séparent les exons de 1307, 137, 119, 127 et 560 pb de 5' en 3'. En parallèle, Yoo-Warren *et al.* (1988) rapportent des informations sur le promoteur et sur deux « enhancers » situés à 5 et 6,5 kpb du site de polyadénylation.

C'est encore l'équipe de Tilghman qui clone et séquence l'homologue humain de *H19* (Brannan *et al.*, 1990). Il en existe une copie par génome haploïde, localisée sur le

bras court du chromosome 11 en p15.5 (Glaser *et al.*, 1989 ; voir Figure 1). Des analogies sont établies entre les structures des gènes murin et humain (Figure 2). Les gènes présentent une identité sur 77% du total des nucléotides, avec des séquences plus ou moins bien conservées : 85% d'homologie pour la partie 3' de l'exon 1 et l'exon 2 ; 65, 80 et 72% d'homologie pour les exons 3, 4 et 5 respectivement ; 69% d'homologie dans les introns. Les séquences les plus conservées sont régulatrices : 80% dans le promoteur et 90% dans les « enhancers ». Une autre séquence de *H19* humain a été déterminée au début des années 1990 par Jean Coll (communication personnelle). Cette séquence est très semblable à celle publiée par Brannan *et al.* (1990). Un homologue de *H19* a été découvert chez le macaque rhésus, le rat, et le poulet (Brannan *et al.*, 1990), puis chez le lapin (Han et Liau, 1992) et plus récemment chez les marsupiaux (Toder *et al.*, 1996). Sa conservation chez les mammifères, voire chez les oiseaux (un seul exemple à ce jour) et chez les différents isolats humains est un argument en faveur d'un rôle important joué par ce gène.

### **Non-traduction de l'ARNm *H19***

Bien que transcrit par l'ARN polymérase II et possédant les propriétés caractéristiques des ARN messagers classiques (tel que la mise en place d'une « coiffe », l'épissage et une polyadénylation), le gène *H19* n'est apparemment pas traduit. En effet, l'absence de conservation des cadres de lecture ouverts (les codons d'initiation (AUG) et les codons STOP, ne sont pas conservés) entre l'Homme et la souris, la faible homologie entre les séquences protéiques putatives et enfin la localisation du transcrit mature dans des particules cytoplasmiques non associées avec la machinerie de traduction ont conduit Brannan *et al.* (1990) à considérer le produit du gène *H19* comme actif en tant qu'ARN,

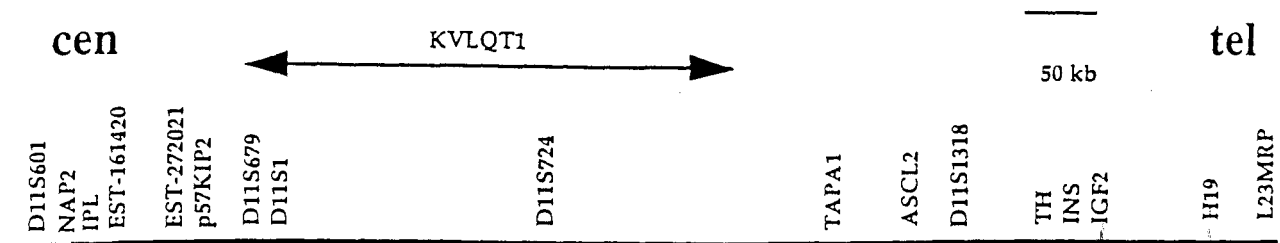
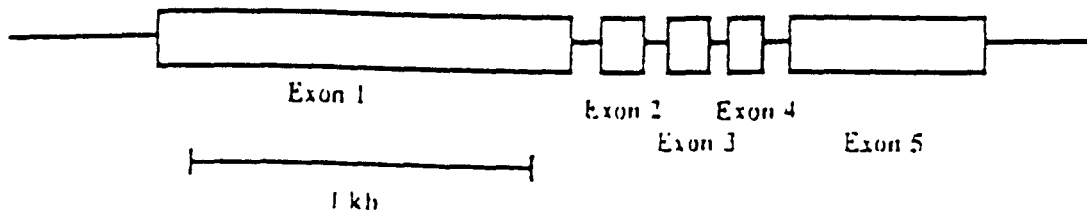


Figure 1: Localisation du gène *H19* sur le chromosome 11 humain.

Le gène *H19* est situé près de l'extrémité télomérique. Il est lié à *IGF-2*, distant de 90 kpb. (d'après Cooper *et al.*, 1998).



**Figure 2:** Structure du gène *H19* humain.

Le gène *H19* humain est composé de 5 exons (1328, 135, 113, et 123 pb) séparés par 4 petits introns (96, 90, 81, et 80 pb). Chez la souris le gène présente la même structure: 5 exons (1307, 135, 119, et 127 pb) et 4 introns (81, 53, 76, et 60 pb) d'après Pachnis *et al.*, 1988 et Brannan *et al.*, 1990. Chez la souris deux « enhancers » ont été mis en évidence à 5 et 6,5 kpb du site de polyadénylation (Yoo-Warren *et al.*, 1988). Ces « enhancers » existent dans l'espèce humaine (Kopf *et al.*, 1998 ; C. Montpellier , communication personnelle) bien qu'ils n'ont pas encore été décrits.



appelé « riborégulateur ». Néanmoins, en 1998, Li *et al.* ont montré l'association du gène *H19* avec les polysomes et émis l'hypothèse qu'il pourrait réguler la traduction du gène *IGF2*. Seuls Leibovitch et ses collaborateurs (1991), après avoir caractérisé un gène humain nommé ASM pour « Adult Skeletal Muscle » montrant une forte homologie avec *H19*, ont détecté *in vivo* une protéine de 29 kDa appelée ASM1. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés et restent hypothétiques.

Dans le travail de Pachnis *et al.* (1988), qui rapporte des essais répétés et infructueux de traduction en milieu acellulaire (extraits de germes de blé) d'ARN *H19*, les auteurs mettent déjà en cause la longueur (680 bases) de la séquence se trouvant en amont du plus long ORF (le 5<sup>ème</sup>, ouvrant la possibilité de traduction d'une protéine de 14kDa) pour expliquer l'absence de traduction de l'ARN *H19*. En effet, une régulation stricte par une longue séquence non traduite en amont d'un ATG (UTR-5'), possédant plusieurs uORF (« unknown ORF »), a été rapportée pour plusieurs gènes : le facteur de transcription, GCN4, chez la levure (Hinnebusch, 1990 ; Abastado *et al.*, 1991), la ferritine, protéine intracellulaire de stockage du fer (Hirling *et al.*, 1992 ; Klausner *et al.*, 1989), les facteurs de croissance TGF- $\beta$ 1 (Romeo *et al.*, 1993) et TGF- $\beta$ 3 (Arrick *et al.*, 1991), le récepteur à l'acide rétinoïque, RAR-  $\beta$ 2 (Zimmer *et al.*, 1994), le facteur d'initiation de la traduction, eIF-4E (Koromilas *et al.*, 1992). Dans tous les exemples précédents, le long UTR-5', caractérisé par de nombreux uORF, contrôle finement dans l'espace et/ou le temps la traduction de la protéine codée par le gène, mais cette dernière ne reste pas hypothétique et il existe toujours un moment ou un lieu où il est possible de la mettre en évidence. En ce qui concerne la protéine « naturelle » putative H19, les différentes recherches *in vivo* se sont soldées, à notre connaissance, par des échecs (Jean-

Jacques Cury, communication personnelle) ; il ne reste que le résultat positif déjà indiqué de Leibovitch *et al.* (1991). La mise en cause du long UTR-5', comprenant plusieurs uORF, dans l'inhibition totale de la traduction de l'ARN *H19* a été apportée par les délétions et/ou les mutations ponctuelles au niveau de l'UTR-5' du gène humain (délétions partielles ou presque totales, mutation du 5<sup>ème</sup> ORF précédant l'ouverture de la plus longue phase de lecture par le 6<sup>ème</sup> ORF) ; Joubel *et al.* (1996) ont ainsi obtenu une protéine H19 de 26 kDa en milieu acellulaire (lysate de réticulocytes de lapin) ou après transfection transitoire de cellules dépourvues de gène *H19* (cellules COS-1). La non-traduction du gène *H19* sauvage donne un caractère exceptionnel à ce gène car la propriété « d'ARN *trans*-régulateur » est peu partagée ; elle a été attribuée au gène *Xist* invoqué dans l'inactivation du chromosome X (Brown *et al.*, 1992) et à l'ARN *His-1* associé à la leucémie myéloïde murine (Askew *et al.*, 1992).

### **Empreinte génomique**

Une autre propriété, qui a retenu l'attention de nombreuses équipes, est celle de subir ce qu'il est convenu de nommer aujourd'hui l'empreinte génomique. Or *H19*, situé en p15.5, se trouve dans une zone à ce titre exceptionnelle au sein du chromosome 11. L'empreinte génomique correspond à une expression différentielle et monoallélique : l'allèle exprimé se trouve sur le chromosome d'origine paternelle ou sur le chromosome hérité de la mère. Cette propriété est partagée par peu de gènes (Tableau 1). La région 11p15.5 est riche en gènes subissant l'empreinte génomique, on peut citer selon la direction télomère vers centromère : *H19*, *IGF-2* (Insuline-like Growth Factor 2), *INS* (Insuline), *p57<sup>kip2</sup>*, *IPL* sur une longueur d'environ 800 kpb. Chez la souris 6 gènes sont

Locus	Active allele	Gene function	Special features imprinting/(other)	References
WT1	(h) Mat	Tumour repressor	Tissue-specific & polymorphic	Jinno et al, 1993
Mash2	(m) Mat	Spongiotrophoblast formation (transcription factor ?)	Possibly autoregulatory	Guillemot et al, 1995
Ins1	(m) Pat	Yolk sac-specific growth factor ?	Tissue-specific	Giddings et al, 1994
Ins2	(m) Pat	Yolk sac-specific growth factor ?	Tissue-specific	Giddings et al, 1994
Igf2	(m) Pat	Growth factor ?	Tissue-specific	De Chiara et al, 1991
IGF2	(h) Pat	Growth factor ?	Tissue-specific	Ohlsson et al, 1993; Gianoukakis et al, 1993; Ogawa et al, 1993; Rainer et al, 1993; Ohlsson et al, 1994
H19	(m) Mat	Tumour suppressor ?	Contains imprinting centre : (no protein produced)	Bartolomei et al, 1991; Walsh et al, 1994
H19	(h) Mat	Tumour suppressor	(No protein produced) and tissue-specific	Leighton et al, 1995
IGF2R	(h) Mat	IGF-II antagonist ?	Polymorphic	Zhang et al, 1993; Rainer et al, 1993; Walsh et al, 1995; Adam et al, 1995
Igf2r	(m) Mat	Igf2 antagonist		Xu et al, 1993; Ogawa et al, 1993; Kalscheuer et al, 1993
Mas	(m) Pat	Angiotensin receptor	Temporal and tissue-specific	Barlow et al, 1993
U2as or U2afbp	(m) Pat	Spliceosome component ?	Not imprinted in inbred mouse strains	Villar and Pedersen, 1994
Snrpn	(m) Mat	Spliceosome component ?		Hatada et al, 1993; Cattanaach, Barr and Jones, 1995
SNRPN	(h) Mat	Spliceosome component ?	Contains imprinting centre :	Hayashizaki et al, 1994
PARI	(h) Pat	Unknown	(No protein produced)	Leff et al, 1992; Cattanaach et al, 1992
PAR5	(h) Pat	Unknown	(No protein produced)	Reed and Leff, 1993
IWP	(h) Pat	Unknown	(No protein produced)	Sutcliffe et al, 1994
ZNF127	(h) Pat	Transcription factor ?	Tissue-specific	Weyrick et al, 1994
Znt127	(m) Pat	Transcription factor ?	Tissue-specific	Cited in Ohlsson, Barlow and Surani, 1994
P57 <sup>kip2</sup>	(m) Mat	Cell-cycle regulation		Nicholls et al, 1994
Peg1/Mest	(m) Pat	Hydrolytic enzyme?		Hatada and Mukai, 1995
				Kaneko et al, 1995

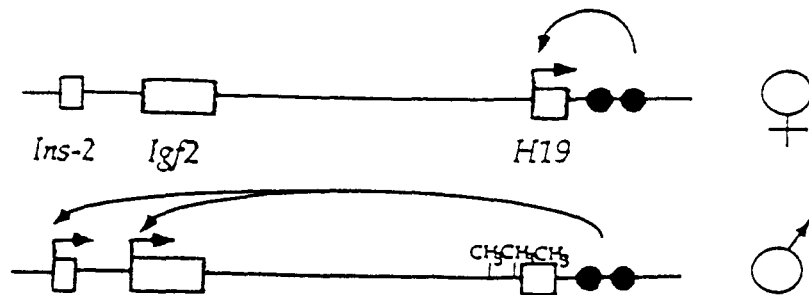
**Tableau 1:** Principaux gènes connus pour être soumis à l’empreinte génomique (d’après Franklin *et al.*, 1996).

(h) : humain. (m) : souris.

Mat : expression de l’allèle maternel. Pat : expression de l’allèle paternel.

« imprimés » sur 1 Mpb environ *H19*, *Igf-2*, *Ins-2*, *Mash-2*, *Kvlqt1*, *p57<sup>kip2</sup>* (Searle et Beechey, 1978 ; Bartolomei et Tilghman, 1992 ; Cooper *et al.*, 1998 ; Webber et Tilghman, 1998). Seul l'allèle maternel de *H19* s'exprime chez la souris (Bartolomei *et al.*, 1991) et chez l'homme (Zhang et Tycko, 1992 ; Rachmilewitz *et al.*, 1992a). *H19* se situe à environ 90 kbp d'*IGF-2*, qui code un facteur de croissance fœtal (Zemel *et al.*, 1992), et qui chez la souris comme chez l'homme subit une empreinte inverse, puisque c'est le seul allèle d'origine paternel qui s'exprime (DeChiara *et al.*, 1991). Dans le but de montrer l'importance de l'empreinte génomique dans cette région, Leighton *et al.* (1995a) ont effectué la délétion par recombinaison homologue du gène *H19*, une séquence connue pour avoir un rôle de prédisposition à des cancers (BWS pour Beckwith-Wiedemann Syndrome). Cette délétion induit une perte d'empreinte des gènes *Igf-2* et *Ins-2*. Les travaux de Leighton *et al.* (1995a) impliquent une région délétée de 13 kpb dans laquelle les auteurs focalisent leur attention sur le gène *H19* et suggèrent que ce dernier joue un rôle dans la mise en place de l'empreinte des autres gènes de la région. L'équipe de Luisa Dandolo, (Ripoche *et al.*, 1997) affinait le protocole expérimental en réduisant à 3 kpb la séquence concernée par la recombinaison homologue (comprenant le gène *H19* seul, environ 2,5 kpb, et quelques centaines de bases flanquantes). Les animaux *H19* nul montraient une expression biallélique du gène *Igf2* confirmant le rôle joué par *H19* dans la mise en place de l'empreinte. De plus, les auteurs ont découvert un élément de contrôle de l'empreinte dans les 10 kpb impliquées dans les expériences de Leighton *et al.* (1995a). Cette séquence contient des éléments responsables de l'empreinte du locus *H19*. Pfeifer *et al.* (1996) ont de plus démontré que des transgènes multicopies *H19* possèdent une empreinte identique à celle de l'endogène,

contrairement aux transgènes simple copie, et ils en ont déduit que la structure intrinsèque du gène *H19* suffisait à conditionner l’empreinte. Cette dernière nécessite la séquence du gène *H19*, mais non pas les séquences flanquantes. Enfin, le transgène ne peut réverser une perte d’empreinte d’*Igf-2* suite à une délétion du gène *H19* endogène, ce qui semble indiquer que le gène *H19* ne pourrait gouverner la mise en place de l’empreinte de toute la région chromosomique qu’en agissant en *cis*. Ainscough *et al.* (1997) ont obtenu des résultats similaires en utilisant des transgènes dérivés de YAC et contenant *Igf2*, *H19* ainsi que les « enhancers ». Ils ont constaté que le gène *H19* ectopique subissait l’empreinte génomique. Par ailleurs, le rôle des « enhancers » a été étudié (Leighton *et al.*, 1995b). La délétion de ces « enhancers » entraîne une perte d’expression de *H19* ou d’*Igf-2*, selon que la délétion a lieu sur l’allèle maternel ou sur l’allèle paternel respectivement. Ainsi ces « enhancers » contrôlent l’expression de l’allèle maternel du gène *H19* et celle de l’allèle paternel d’*Igf-2*. L’ensemble de ces travaux a abouti à un modèle du mécanisme de l’empreinte génomique de cette région (Eden *et al.*, 1995 ; Leighton *et al.*, 1996) dans lequel l’empreinte inverse des deux gènes (*Igf-2* et *H19*) est expliquée par une compétition vis-à-vis de leurs « enhancers » communs en 3’ (Figure 3). Cependant, ce modèle a été remis en cause en 1998 par Webber *et al.*, qui ont obtenu une expression du seul gène *Igf-2* après qu’une translocation des « enhancers » communs ait été réalisée entre *H19* et *Igf-2*. Cela semble indiquer que les positions des « enhancers » par rapport aux deux gènes et leur position relative par rapport à une marque épigénétique (méthylation) sont cruciales. Enfin, Jones *et al.* (1998) ont prouvé que l’expression d’*Igf-2* ne nécessite pas une répression du gène *H19*, comme le modèle de compétition d’« enhancers » le laisse supposer. En effet, en remplaçant le gène *H19* par celui de la *luciférase*, ils constatent que l’expression de ce dernier porté par le



**Figure 3:** Modèle de compétition vis-à-vis de deux « enhancers » communs en 3'.

Au niveau de l'allèle maternel les « enhancers » sont engagés dans la transcription du gène *H19*, alors qu' au niveau de l'allèle paternel ils sont engagés dans la transcription des gènes *Igf2* et *ins-2* (d'après Leighton *et al.*, 1996).

chromosome d'origine paternel n'empêche nullement l'expression du gène *Igf-2* en *cis*. L'empreinte d'*Igf-2* ne semble donc pas corrélée strictement à l'expression du gène *H19* en *cis*, comme certains travaux le laissaient supposer.

### **Mécanismes de la mise en place de l'empreinte**

D'autres publications ont mis en évidence l'existence d'éléments de contrôle de l'empreinte situés à proximité du gène *H19*. Lyko *et al.* (1997) ont étudié chez la drosophile, dont on sait que le génome n'est pas méthylé, le rôle des séquences flanquantes du gène *H19*. Par délétions successives d'une partie de ces éléments, ils ont montré l'existence d'une séquence de 1,2 kpb agissant en *cis*, située à 2 kpb environ en amont du gène *H19* et permettant la répression de l'expression de manière indépendante de la méthylation. De même, un autre élément de maintien de l'empreinte, situé entre *Ins-2* et *Igf-2*, participe à la mise en place de l'empreinte du deuxième gène, et intervient aussi dans la régulation de celle du gène *H19*, peut être en stabilisant la région chromosomique contenant *H19/Igf-2* (Hu *et al.*, 1997a). Le promoteur, les « enhancers » et les éléments de régulation de l'empreinte participent à la régulation stricte de *H19* et de *Igf-2* et conditionnent aussi les phénomènes épigénétiques responsables, en partie, de la mise en place de l'empreinte. La méthylation est l'un de ces phénomènes. Il a été montré que l'allèle paternel est fortement méthylé dans la région *H19/Igf-2* (Bartolomei *et al.*, 1992 ; Koide *et al.*, 1994 ; Feil *et al.*, 1994) en de nombreux sites CpG, tandis que l'allèle d'origine maternel actif (pour *H19*) est hypométhylé. De plus, l'utilisation de souris mutantes déficientes en hémi-méthyl-transférase a permis de déterminer le rôle de ce phénomène dans l'empreinte (Li *et al.*, 1993), ces mutantes souffrant d'une perte d'expression monoallélique des gènes *H19*, *Igf-2* et *Igf-2R*. De même, l'inhibition de la

méthylation de l'ADN par des traitements par la 5-azacytidine ou la 2 déoxy-5-azacytidine conduit à une expression biallélique du gène *Igf-2* (Hu *et al.*, 1997b ; Barletta *et al.*, 1997). Néanmoins, les résultats obtenus par Lyko chez la drosophile démontrent que la méthylation n'est pas le seul mécanisme conduisant à l'empreinte. La mise en place de celle-ci dans l'embryon et sa transmission à la descendance restent des points encore non complètement élucidés à ce jour. Elle dépend du gène impliqué, de l'organe considéré (par exemple, le gène *H19* après l'implantation subit l'empreinte génomique dans l'embryon mais non dans le placenta), ainsi que du stade de développement. Pour *Snrpn*, Szabo et Mann (1995) ont montré une mise en place de l'empreinte dans l'embryon de souris dès le stade 4 blastomères. En revanche, pour *Igf-2*, *Igf-2R* et *H19* une expression biallélique a été découverte au cours du développement précédant l'implantation, alors que l'expression d'un seul allèle persiste après l'implantation (Latham *et al.*, 1994). Cependant, Tremblay *et al.* (1995) rapportent une expression monoallélique du gène *H19* dans un embryon de 3,5 jours p.c., donc avant l'implantation. Le passage d'une expression biallélique à une expression monoallélique semble dû à une activation ou une dé-répression de l'un des deux allèles faiblement transcrits et/ou à une répression sélective de l'un des deux allèles fortement transcrits (Franklin *et al.*, 1996). D'après de nombreux auteurs, il semble que la mise en place de l'empreinte s'effectue selon le schéma fonctionnel suivant : la méthylation, comme l'empreinte, est abolie durant la gamétogenèse (Brandeis *et al.*, 1993 ; Villar *et al.*, 1993) ; puis des différences de méthylation sont réintroduites dans l'un des deux gamètes (Brandeis *et al.*, 1993) ; il n'existe pas de méthylation lors du développement précoce (*morula*) d'après Kafri *et al.* (1992), mais celle-ci est rétablie dans la *blastula* après l'implantation. Il apparaît que seuls certains sites privilégiés sont toujours méthylés,



même pendant le développement précoce, et que ceux-ci servent de « marqueurs d'empreinte ». Ils peuvent fixer des protéines et conditionnent la mise en place de la méthylation et donc de l'empreinte au cours du développement tardif de l'embryon, puis de l'adulte (Brandeis *et al.*, 1993). En revanche, Olek *et al.* (1997) affirment qu'il existe une méthylation spécifique de l'allèle, en amont du gène *H19*, même avant l'implantation. Celle-ci consiste en une méthylation *de novo* de l'allèle paternel et une déméthylation de l'allèle maternel. Ces différentes analyses rendent compte des difficultés à établir de façon définitive la causalité de la mise en place de l'empreinte.

Les gènes subissant l'empreinte génomique sont regroupés dans des régions chromosomiques particulières (par exemple *SNRPN*, *IPW*, *PAR1*, *PAR5* et *ZNF127* sont regroupés sur le chromosome 15 humain et *H19*, *Igf-2*, *Ins-2* et *Mash2* sur le chromosome 7 murin) qui sont répliquées de manière asynchrone (Kitsberg *et al.*, 1993). Ces données suggèrent qu'il existe un contrôle régional pouvant être déployé sur de grandes distances. Il est aussi bien connu que la structure de la chromatine peut contrôler, en partie, l'expression génique. Les changements de structure de la chromatine, au même titre que la méthylation, peuvent donc intervenir dans le contrôle de l'expression des gènes subissant l'empreinte (Franklin *et al.*, 1996).

### **Expression du gène *H19* et tumorigénèse**

Le gène *H19* s'exprime chez le fœtus dans tous les organes étudiés, sauf dans le thymus et le système nerveux (Pachnis *et al.*, 1988 ; Poirier *et al.*, 1991 ; Lustig *et al.*, 1994) ; néanmoins des travaux récents indiquent une expression du gène *H19* dans des tissus fœtaux dérivés du système nerveux (Hemberger *et al.*, 1998). Pour illustrer cette expression fœtale, nous rapportons dans la figure 4 l'expression du gène *H19*, observée

**Figure 4:** Expression du gène *H19* dans un embryon humain.

A: Hoechst

B: Hybridation moléculaire *in situ* avec une sonde *H19* antisens

L'expression du gène *H19* est forte et ubiquitaire dans l'embryon humain âgé de deux mois. Ce document illustre la partie distale d'un membre antérieur, dans lequel le marquage est particulièrement élevé au niveau des phalanges et de l'épiderme.

Les lames ont été mises en autoradiographie durant 15 jours.

La barre en B représente 62,5  $\mu\text{m}$ .

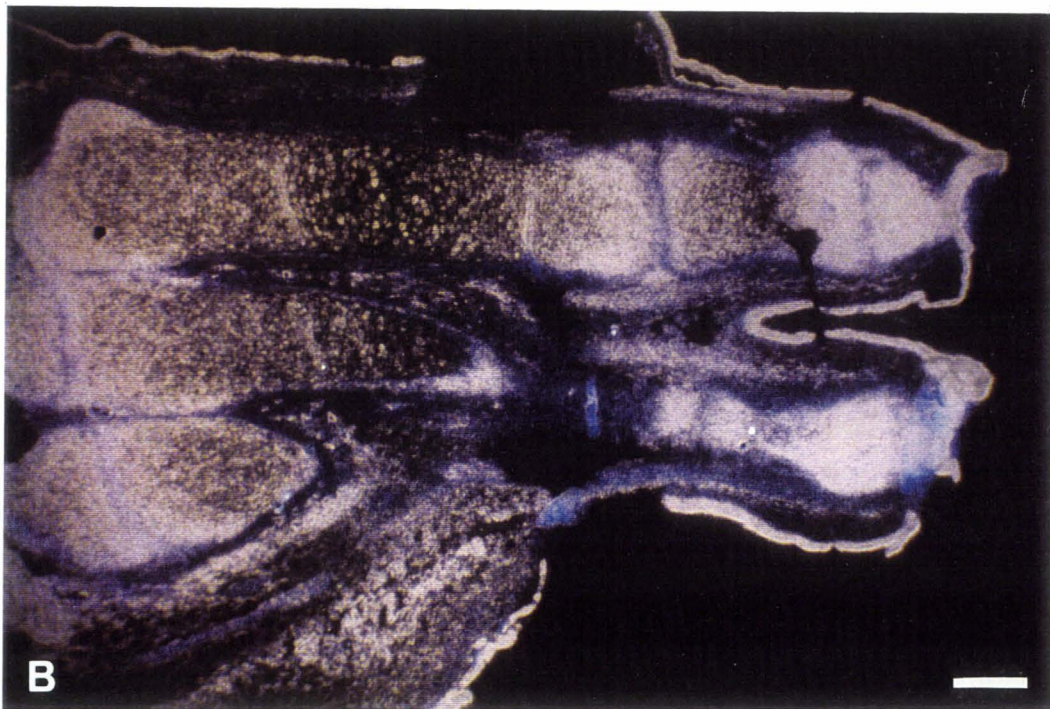
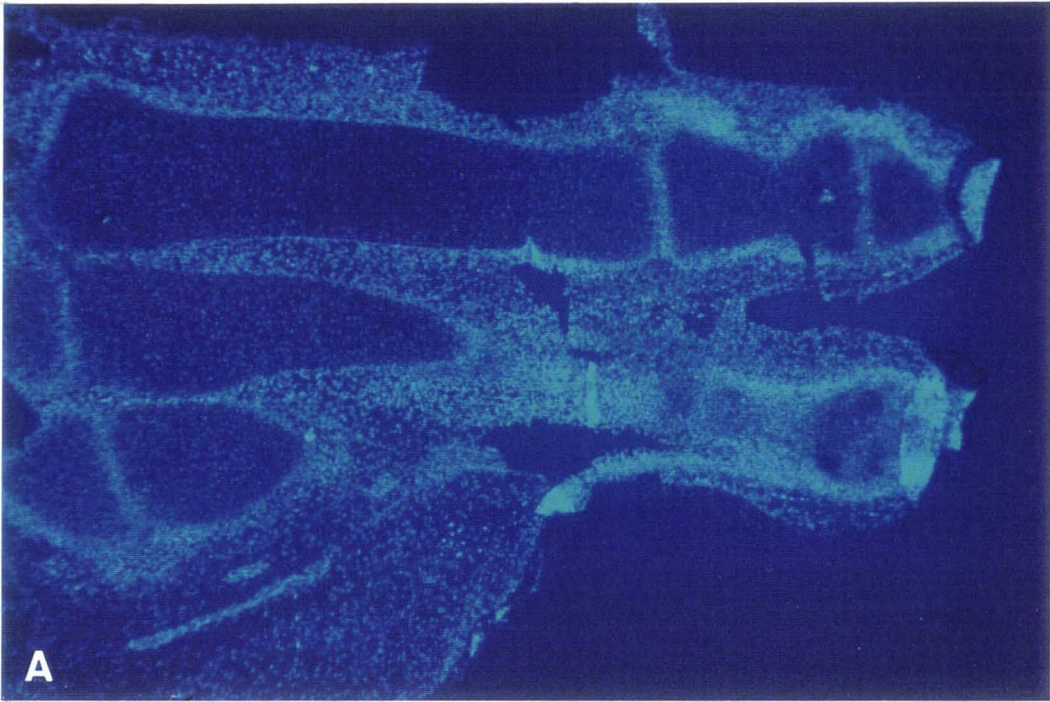


Fig. 4

par hybridation moléculaire *in situ*, chez un embryon humain au cours du deuxième mois de gestation. Les ARN *H19* y sont abondants et de répartition ubiquitaire. Le gène est fortement réprimé à la naissance dans tous les organes, exceptés le cœur et les muscles squelettiques (Pachnis *et al.*, 1984 ; Leibovitch *et al.*, 1991) ; un taux basal plutôt faible persiste dans la glande mammaire (Douc-Rasy *et al.*, 1993 ; Dugimont *et al.*, 1995), l'utérus (Ariel *et al.*, 1997), les reins, les poumons et les glandes surrénales (Zhang et Tycko, 1992 ; Liu *et al.*, 1995). Ce patron d'expression semble indiquer que *H19* pourrait jouer un rôle important, comme la plupart des gènes subissant l'empreinte, au cours du développement normal.

Par ailleurs, de nombreux auteurs se sont attachés à rechercher le statut d'expression du gène *H19* au cours d'une tumorigenèse. Selon l'organe considéré, ils ont montré une surexpression fréquente du gène *H19*, accompagnée ou non, d'une perte d'empreinte ou d'une perte d'hétérozygotie. La perte d'hétérozygotie dans la région p15.5 du chromosome 11 a été décrite dans de nombreux types de tumeurs, notamment dans les tumeurs de Wilms où *H19* est silencieux après méthylation de l'ADN maternel et activation de l'expression d'*IGF-2* maternel (Reeve *et al.*, 1989 ; Tycko 1994), les tumeurs du poumon (Skinner *et al.*, 1990) et du foie (Fujimori *et al.*, 1991), et celles de la glande mammaire où la région 11 p15.5 est délétée dans 30 à 40% des cas de tumeurs primitives (Theillet *et al.*, 1986 ; MacKay *et al.*, 1988 ; Garcia *et al.*, 1989 ; Takura *et al.*, 1992 ; Deng *et al.*, 1994).

Le gène *H19* est réexprimé ou surexprimé dans une grande variété de carcinomes : carcinomes mammaires (Douc-Rasy *et al.*, 1993 ; Dugimont *et al.*, 1995), sphère ORL et col de l'utérus (Douc-Rasy *et al.*, 1993, 1996), vessie (Ariel *et al.*, 1994 ; Cooper *et al.*, 1996), glandes surrénales (Liu *et al.*, 1995), poumons (Kondo *et al.*,

1995) et trophoblaste (Walsh *et al.*, 1995). Cette surexpression peut également s'accompagner d'une perte d'empreinte. Un tel phénomène a été décrit pour *H19* et/ou *IGF-2* dans de nombreux cancers (revue de Rainier *et al.*, 1993 ; Feinberg, 1994) : rhabdomyosarcomes (Zhan *et al.*, 1994 ; Casola *et al.*, 1997), carcinomes pulmonaires (Kondo *et al.*, 1995), hépatoblastomes (Rainier *et al.*, 1995), tumeurs du col de l'utérus (Douc-Rasy *et al.*, 1996), cancers de la vessie (Elkin *et al.*, 1995) de l'œsophage (Hibi *et al.*, 1996) et ceux des cellules germinales testiculaires (Van Gurp *et al.*, 1994). En revanche dans certains cancers, la surexpression du gène *H19* semble indépendante de ce phénomène : le maintien d'une empreinte normale a été observé dans des tumeurs colorectales (Hibi *et al.*, 1996), dans des neuroblastomes (Wada *et al.*, 1995), dans des gliomes (Uyeno *et al.*, 1996) et des carcinomes mammaires (Yballe *et al.*, 1996).

### **Modulations de l'expression du gène *H19* dans des cellules en culture**

En 1994, Voutilainen et ses collaborateurs ont étudié la régulation des gènes *H19* et *IGF-2* dans des cellules fœtales de glandes surrénales humaines. Ils ont constaté que les deux gènes étaient co-régulés et que leur expression était modulée par un grand nombre de cytokines : le  $\text{TNF}\alpha$ , l' $\text{IFN}\gamma$  et le  $\text{TGF}\beta 1$  diminuent fortement l'expression des deux gènes, alors que les IGFs l'augmentent. De plus, dans ce modèle l'expression du gène *H19* semble dépendre de l'équilibre entre les voies de la PKA et celles de la PKC : l'ACTH, des activateurs de la PKA ou des inhibiteurs de la PKC augmentent l'expression du gène *H19*, alors que des activateurs de la PKC diminuent cette expression. Ces travaux ont été confirmés par Liu *et al.* (1995, 1997). Ces derniers

auteurs ont également démontré une co-régulation entre *H19* et *p57<sup>kip2</sup>*, un inhibiteur de cyclines dépendantes de kinases.

Dans un autre modèle, le muscle, l'un des tissus où la répression néonatale n'est pas totale, l'équipe de Leibovitch (1995) a rapporté, au cours de la différenciation myogénique chez le rat, une corrélation entre l'expression de *H19* et celle de *c-mos*. Une surexpression de *c-mos* s'accompagne d'une augmentation de la synthèse des ARN *H19* et d'une différenciation musculaire, alors qu'une diminution de l'activité de *c-mos* entraîne une diminution de l'expression de *H19* et un défaut de différenciation. Dans les cellules musculaires lisses de vaisseaux sanguins, *F31*, l'homologue du gène *H19* chez le lapin, est exprimé comme *Igf-2* dans le fœtus, puis réprimé à la naissance et reste indétectable chez l'adulte (Han et Liau, 1992). Par ailleurs, l'expression de *F31* dans des cultures de cellules musculaires lisses fœtales devient indétectable lorsque ces cellules parviennent à la confluence. L'ajout de sérum ou d'insuline a pour conséquence une réexpression de *F31* (Han et Liau, 1992). Enfin, la même équipe a montré que *F31* est sensible à l'EGF, aux IGF1 et 2, au FGF1 et à la thrombine. L'expression de *F31* semble corrélée à des phénomènes de différenciation : absente dans les cellules en prolifération, elle devient importante dans les cellules différenciées (Han *et al.*, 1996).

En 1992, l'équipe d'Abraham Hochberg indique une expression du gène *H19* dans le placenta et les cellules du cytotrophoblaste, deux tissus d'origine ectodermique (Rachmilewitz *et al.*, 1992b). Dans cet article, les auteurs envisagent l'implication du gène *H19* dans la différenciation de ces deux tissus. D'autres travaux ont examiné l'expression du gène *H19* dans des lignées cellulaires issues de choriocarcinomes (cellules JAr et JEG-3). *H19* s'exprime très fortement dans les JEG-3 ; mais les JAr expriment le gène à un niveau inférieur à celui existant dans le tissu normal. Les cellules

JEG-3, injectées dans des souris *nude*, induisent une tumeur ; les cellules de cette dernière, remises en culture, surexpriment *H19*. Les résultats semblent indiquer que le gène interviendrait dans la tumorigenèse induite par ces cellules (Rachmilewitz *et al.*, 1992b ; Lustig-Yariv *et al.*, 1997). En 1998, Kopf et ses collaborateurs démontrent que l'acide rétinoïque régule positivement le gène *H19*. Cette régulation nécessite, outre le promoteur, la présence des enhancers en 3'. L'absence d'élément de réponse de l'acide rétinoïque dans le promoteur de *H19* ont incité Kopf à suggérer que cette régulation pourrait être indirecte et due à AP2 (Kopf *et al.*, 1998).

Il apparaît donc que la régulation du gène *H19* est complexe et varie selon le modèle considéré. Cependant, un consensus s'est dégagé pour affirmer que ce gène serait surexprimé lors d'un arrêt de la croissance et/ou lors d'une différenciation (Hayashida *et al.*, 1997). Les travaux de Rogers *et al.* (1990) vont dans ce sens car ils ont montré une surexpression du gène *H19* lors de la différenciation de cellules embryonnaires sous l'influence de l'acide rétinoïque.

### **Rôle du gène *H19***

Depuis les travaux originels de Pachnis *et al.* (1984, 1988) et malgré des publications de plus en plus nombreuses, en particulier depuis le début des années 90, le rôle du gène *H19* reste à ce jour encore largement méconnu. Plusieurs hypothèses ont été formulées dans les années qui ont suivi sa découverte, mais elles ont toutes été plus ou moins infirmées par des travaux ultérieurs. En 1991, Brunkow et Tilghman ont introduit des copies supplémentaires du gène *H19* dans des ovocytes fécondés de souris. Le développement des embryons transgéniques s'est interrompu au 14<sup>ème</sup> jour de gestation. Ce résultat, qui suggérait l'importance d'un dosage génique, s'est en fait

révéle être dû à un artéfact ; en effet, en 1996 Pfeifer *et al.* ont démontré que la mort des embryons était due aux 20 pb ajoutées par les auteurs précédents pour leur permettre d'identifier les séquences exogènes. En 1991, Dowdy *et al.* découvrent l'existence d'un ou de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs dans la région p15.5-14 du chromosome 11, région qui réintroduite dans des cellules dérivant d'une tumeur de Wilms provoque une perte de tumorigénicité de ces dernières. Un an plus tard, Hao *et al.* améliorent ce travail en introduisant dans ces mêmes cellules (G401) et dans une autre lignée (RD) le gène *H19*. Ces deux lignées manifestent alors un retard de croissance, une perte de la capacité à se développer en agar mou, et une perte de tumorigénicité dans des souris *nude* pour les seules cellules G401. Un phénotype de suppresseur de tumeur est alors proposé pour *H19*. Cependant, la surexpression de ce gène dans de nombreux carcinomes et l'absence de reproduction des expériences de Hao *et al.* (Reid *et al.*, 1996) ont conduit certains auteurs à remettre en cause ce phénotype. La corrélation observée entre la surexpression du gène et le grade histopronostique de certaines tumeurs (vessie : Cooper *et al.*, 1996 ; cancers urothéliaux : Biran *et al.*, 1994) a incité les auteurs à considérer, au contraire, *H19* comme un marqueur de tumeur. De plus, le patron d'expression du gène *H19*, fortement exprimé chez le fœtus et dans les tumeurs, a conduit Ariel *et al.* (1997a) à considérer le produit du gène *H19* comme un ARN oncofœtal. Enfin, Leighton *et al.* (1995a) ont proposé que *H19* jouerait un rôle dans la mise en place et le maintien de l'empreinte du gène *IGF-2* et de son propre locus. Néanmoins, Ripoche *et al.* ont montré que ni la séquence, ni l'expression du gène *H19* n'étaient nécessaires à l'empreinte de son locus. L'abrogation physiologique du gène *H19* par recombinaison homologue a simplement conduit à l'obtention de souris plus grosses d'environ 1/3 du poids de leurs parents (Leighton *et al.*, 1995a), sans doute à



cause d'une surexpression du gène *IGF-2*. Plus récemment, Ripoche *et al.* (1997) en utilisant, pour la recombinaison homologe, une séquence plus petite ont obtenu des souris dont le poids dépassait de 8% celui de leurs parents.

### **Objectifs de notre recherche**

Au cours de notre travail de thèse, nous avons voulu déterminer le mode d'expression du gène *H19* dans la glande mammaire normale ou cancéreuse. Nous avons choisi de travailler sur ce modèle pour les raisons suivantes : 1) la glande mammaire est l'un des rares organes dans lequel la répression du gène dans la période néonatale n'est pas totale et un faible, mais significatif, taux basal d'expression subsiste chez l'adulte (Douc-Rasy *et al.*, 1993 ; Dugimont *et al.*, 1995) ; 2) il a été montré que les tumeurs mammaires surexpriment très souvent le gène *H19* (Douc-Rasy *et al.*, 1993) ; 3) la glande mammaire présente la particularité intéressante d'être le seul organe dont le développement s'effectue principalement chez l'adulte et ce phénomène peut se renouveler plusieurs fois au cours de l'activité sexuelle, ce qui facilite son étude ; 4) le développement de cet organe nécessite des interactions entre l'épithélium et le mésenchyme et avec la matrice extracellulaire, des stimulations hormonales diverses relayées par des facteurs paracrines, comme lors d'une tumorigenèse. En conséquence nous avons suivi les modulations de l'expression du gène *H19* au cours des différentes phases de la vie d'un animal, la souris. Nous avons également recherché à définir l'action positive ou négative de certains facteurs sur l'expression du gène. Nous avons étudié l'accumulation des transcrits *H19* dans des adénocarcinomes du sein et nous avons recherché des corrélations statistiquement significatives entre la surexpression du gène et différents facteurs clinicopathologiques usuellement envisagés dans les laboratoires

d'anatomo-pathologie. Enfin, nous avons poursuivi notre projet en envisageant dans des lignées cellulaires la régulation de ce gène en impliquant directement le promoteur naturel du gène d'intérêt.

## MATERIELS ET METHODES

## **Animaux**

Toutes les souris utilisées au cours de ce travail sont de souche Swiss 3T3.

L'étude de l'expression du gène *H19* au cours du développement de la glande mammaire a été réalisée à partir d'organes prélevés aux stades suivants : fœtus de 14,5 jours, nouveau-nés (DO), souris prépubères (D25), pubères (D35), souris nullipares (âgées de 12 semaines), souris gestantes (14<sup>ème</sup> jour), en lactation (10<sup>ème</sup> jour), souris en post-lactation (5<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> ou 15<sup>ème</sup> jour d'involution). Après le sacrifice des animaux, les glandes mammaires inguinales, paires n° 4 et 5, sont disséquées, rincées dans du PBS stérile, puis fixées dans une solution de paraformaldéhyde (PBS + 4% PAF + 5mM MgCl<sub>2</sub>) pendant 16 h à 4°C. Les organes sont ensuite déshydratés au cours de passages successifs dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (30, 70, 95, 100 %), puis inclus dans la paraffine (16 h à 55°C) après un bain dans le butanol. Des coupes sériées de 7 microns d'épaisseur sont fixées sur des lames recouvertes par le 3 amino-propyl triéthoxysilane (TESPA, Aldrich). Après une semaine à 37°C, les lames sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

L'étude de l'expression du gène *H19* au cours du cycle œstrien a été réalisée sur des animaux dont la phase du cycle a été déterminée par examen de frottis vaginaux. Après le sacrifice des animaux, les glandes mammaires 4 et 5, ainsi que les utérus sont prélevés et traités comme cela est décrit précédemment.

## **Action systémique des hormones stéroïdes**

L'action des stéroïdes sur la synthèse des ARN *H19* a été suivie chez des souris nullipares âgées de 12 semaines, ovariectomisées et surrénalectomisées par une double laparotomie sous anesthésie à l'éther. Une semaine après l'opération, les animaux sont traités par un ou plusieurs stéroïdes en injections sous-cutanées : 20 µg/kg/j de 17-β-œstradiol ou 1 mg/kg/j de progestérone, ou les deux dans 10 µl d'huile de sésame.

Certaines souris ont été traitées à la corticostérone (0,3 mg/kg/j) dissous dans un mélange éthanol absolu/ 0,9 % NaCl (1:49 v/v). Cette dernière a été injectée seule ou combinée aux deux hormones précédentes. Deux lots témoins traités par 10 µl de solvant ont été réalisés, l'un d'animaux dit " pseudo-opérés ", c'est à dire d'animaux opérés n'ayant subi aucune ablation, et l'autre d'animaux opérés. Après 15 jours de traitement, les animaux sont sacrifiés, les organes (glande mammaire et utérus) sont prélevés et traités comme décrit précédemment. Lors du sacrifice, le sang est récupéré afin de doser dans le plasma le taux d'hormones circulantes. L'utérus est pesé afin d'évaluer les conséquences des différents traitements.

### **Dosage des hormones circulantes**

Les taux d'hormones circulantes ont été évalués par *radio-immuno assay*, selon le protocole décrit par Bernet *et al.* (1994) pour la corticostérone et par Lesage *et al.* (1996) pour le 17-β-œstradiol. La progestérone a été dosée en utilisant le kit PROG-CTR1A (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette).

### **Adénocarcinomes du sein**

Les tumeurs ont pour origine la tumorothèque du Centre anti-cancéreux Oscar Lambret de Lille (COL) et ont été aimablement fournies par le Docteur Alice Delobelle. 102 tumeurs de types histologiques variés (carcinome canalaire invasif, lobulaire invasif, sarcomatoïde avec métaplasie, papillaire, avec métaplasie épidermoïde, lobulaire *in situ*, tubuleux, colloïde muqueux, apocrine, intracanales *in situ*) ont été sélectionnées dans l'ensemble des résections pratiquées en 1990 au COL. Sept coupes sériées de 5 µm ont été réalisées afin de réunir et superposer différentes informations. Une coloration histologique (Hématoxyline, Phloxine, Safran) a permis un examen de la tumeur et la détermination du grade histopronostique. Une hybridation moléculaire *in situ* (HIS) a été réalisée afin de détecter la présence des transcrits *H19*. Afin de localiser précisément ces

derniers, des immunocytochimies nous permettant de distinguer le compartiment stromal du compartiment épithélial ont été effectuées. Le compartiment épithélial est mis en évidence grâce à un anticorps dirigé contre une cytokératine (anticorps anti-KL1, dilution 1:200, Immunotech, Marseille) et le compartiment stromal est détecté grâce à un anticorps qui reconnaît les cellules myoépithéliales, les myofibroblastes et les cellules musculaires des vaisseaux sanguins (anticorps anti- $\alpha$ -actine lisse, dilution 1:2000, Sigma chemical Co., St Louis MO). Par ailleurs, nous avons recherché la protéine p53, suppresseur de tumeurs, (anticorps DO-1, prédilué, Immunotech) , et la protéine Ki-67, marqueur des cellules en cycle (anticorps anti-MIB-1, prédilué, Immunotech). Les réactions immunologiques ont été révélées par le chromogène DAB (diaminobenzidine, DAKO, Glostrup, Denmark). En parallèle, diverses données clinicopathologiques ont été réunies : âge des patients, statut ménopausal, invasion des ganglions, grade histopronostique, facteur T (T0 à T4), survie des patients cinq ans après l'opération, présence des récepteurs hormonaux (récepteurs aux œstrogènes RE et récepteurs à la progestérone RP) mesurée en fentomoles/mg de protéines cytosoliques et considérée comme positive pour des valeurs supérieur à 15. Des échantillons de tissus sains provenant de mammoplastie ont été utilisés comme témoin (don gracieux du Dr Pellerin, CHR, Lille).

## **Cellules**

*Cellules épithéliales mammaires humaines.*

Souche CEMN: cellules épithéliales mammaires normales issues de réduction mammaires (chirurgie esthétique), obtenues par entretien de cultures primaires.

Souche HBL-100: cellules provenant d'une mère allaitante, qui ne présentait ni lésion du sein, ni antécédents familiaux de cancer, mais dont le caryotype était anormal dès le 7<sup>ème</sup> passage. Cette lignée immortalisée par le virus SV40 a été initialement décrite comme "non tumorigène" chez les souris "*nude*", bien que capables de former des

colonies en agar mou. Néanmoins, certains clones de HBL-100 se sont révélés tumorigènes chez ces souris "*nude*".

Souche MCF-7: cellules issues d'effusions pleurales d'un adénocarcinome mammaire. Ces cellules sont hormono-dépendantes et ont conservé plusieurs propriétés de l'épithélium mammaire normal, dont l'aptitude à répondre à certaines hormones (œstradiol) grâce à des récepteurs spécifiques et la capacité de former des dômes en culture.

Souche MDA-MB-231: lignée provenant d'effusions pleurales d'adénocarcinome de glande mammaire isolée en 1973. Considérée comme lignée établie, elle se caractérise par sa croissance rapide et uniforme, son pouvoir invasif et son hormono-indépendance. Chez des souris "*nude*", elle provoque l'apparition d'adénocarcinomes de "type mammaire peu différencié".

#### *Autres types cellulaires.*

Souche MRC-5: fibroblastes pulmonaires normaux d'un foetus humain âgé de 14 semaines. Les cellules sont capables de se diviser de 42 à 46 fois avant de perdre leur aptitude à proliférer. Cette lignée est connue pour stimuler la tubulogenèse rénale en culture tridimensionnelle (Montesano *et al.*, 1991). Les cellules MRC-5 produisent de nombreux facteurs de croissance, dont l'*Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor* (HGF/SF : facteur d'essaimage et de tubulogenèse).

Souche Calu 6: cellules épithéliales pulmonaires cancéreuses humaines, dépourvues de *p53* endogène, aimablement fournies par le Dr Jean-François Cajot.

Souche HeLa: cellules épithéliales cancéreuses isolées d'un adénocarcinome du col de l'utérus. Les cellules HeLa ont un taux faible de *p53* endogène car elles contiennent le papillomavirus humain (HPV18) dont la protéine E6 entraîne la destruction de la protéine *p53*.

## Culture des cellules épithéliales mammaires

Les différentes lignées utilisées sont entretenues dans un milieu complet adapté à leur croissance (voir composition en annexe). L'incubation est réalisée en atmosphère humide dans une étuve réglée à 37°C, en présence de 5% de CO<sub>2</sub> et de 95% d'air. Le milieu de culture est remplacé tous les deux jours. A confluence, les cellules sont repiquées après leur décollement par une solution de trypsine-EDTA (0,25%), préchauffée à 37°C. Les cellules mammaires normales sont cultivées dans un milieu complet dépourvu de calcium (B2) empêchant l'adhésion et ainsi sont récupérées par simple centrifugation (15 mn à 300 x g).

Pour l'hybridation moléculaire *in situ*, on utilise des lames Lab-Tek à 8 puits (Nunc). Les lames sont préalablement recouvertes de collagène qui fournit un support matriciel aux cellules. Le collagène est préparé selon la méthode de Bornstein (1958) à partir de queue de rat. La densité d'ensemencement varie selon le type cellulaire et est évaluée en nombre de cellules par ml: MDA-MB-231 (10 000), HBL-100 (15 000), MCF-7 et CEMN (20 000). Ces densités sont choisies en fonction du taux de croissance de chaque lignée. Les cellules prolifèrent pendant 3 j avant d'être sevrées 24 h, c'est à dire d'être soustraites aux stimulations du sérum. Une partie de la culture est alors traitée soit par le TGFβ<sub>1</sub>, soit par le butyrate de sodium (NaB) pendant 24 h, l'autre servant de témoin, est remplacé en milieu complet. En fin d'expérience, les cellules sont fixées au PAF (paraformaldéhyde 4% dans du PBS), rincées au PBS, puis déshydratées. Les lames sont alors stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

L'action des hormones sur l'expression du gène *H19* dans les MCF-7 a été étudiée sur des cellules ensemencées en milieu complet, puis rincées et cultivées 48h en milieu dépourvu d'hormones (MEM sans rouge de phénol supplémenté avec de la transferrine humaine: 10 mg/l, de l'insuline: 5 mg/l, de la serumalbumine bovine: 2 g/l, des acides aminés non essentiels et de la glutamine). Les cellules sont ensuite traitées 24h par le 17-



$\beta$ -oestradiol ( $10^{-8}$  M) seul ou en présence de tamoxifène ( $10^{-6}$  M), avant d'être lysées dans du tampon guanidium.

### **Culture tridimensionnelle des cellules épithéliales mammaires**

Les cultures en trois dimensions sont réalisées en gel de collagène, selon la technique décrite par Montesano *et al.* (1991), en mélangeant, à 4°C, 8 volumes d'une solution de collagène à 1,5 mg/ml, 1 volume de milieu MEM additionné de sels de Earle 10X et 1 volume de bicarbonate de sodium à 22,2 g/l. Pour ces cultures, 300  $\mu$ l de gel de collagène, obtenu selon le procédé décrit ci-dessus, sont répandus au fond des puits (plaque 24 puits). Après solidification du gel inférieur, on dépose au centre du gel, 10  $\mu$ l d'une suspension contenant environ 25 000 cellules épithéliales mammaires. On recouvre le tout par 300  $\mu$ l de gel de collagène et on cultive les cellules dans 500  $\mu$ l de milieu complet adapté à la lignée cultivée. Les cellules épithéliales mammaires cultivées dans le milieu précédent servent de témoin à l'expérience consistant à ajouter à ce milieu du milieu conditionné 48h par des MRC-5, de façon à mimer une stimulation éventuelle des cellules épithéliales par les fibroblastes et à reproduire ainsi, en partie, les interactions épithélium-mésenchyme existantes *in vivo*. Les cultures incubent 7 j (à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% d'air), le milieu étant renouvelé tous les 2 j. Après ce délai, les gels sont décollés, puis préparés pour l'hybridation moléculaire *in situ*, comme cela a été décrit précédemment pour les glandes mammaires.

### **Transfections**

Les MCF-7 ont été transfectées transitoirement avec le plasmide pGL2 contenant le promoteur minimal de *H19* (823 pb) couplé au gène de la *luciférase* et un plasmide contenant les séquences des récepteurs nucléaires testés. Nous avons utilisé le plasmide pCMV5 contenant différentes formes du gène du récepteur aux œstrogènes: soit la forme sauvage (RE), soit l'une des trois formes mutantes de RE. La première résulte d'un

déplacement du cadre de lecture (ER S554fs), la deuxième est due à une mutation ponctuelle (L540Q) et la dernière est un récepteur tronqué (ER1-530) dû à l'introduction d'un codon STOP. Enfin, nous avons utilisé le plasmide pKSV 10 contenant une séquence codant le récepteur sauvage de la progestérone (PR). Toutes les informations relatives à la séquence et au clonage de ces plasmides sont disponibles dans Dugimont *et al.* (1998) pour le plasmide recombiné pGL2, dans Reese *et al.* (1991) et Guiochon-Mantel *et al.* (1988) pour les plasmides contenant les séquences des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone respectivement. Les transfections ont été réalisées avec du FuGENE™6 (Boehringer Mannheim, USA). Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits (Greiner) à raison de 200 000 cellules par puits et sont transfectées le lendemain avec 1,75 µg de plasmide H19-Luc et 0,35 µg du plasmide à tester. Le contrôle négatif a été réalisé en utilisant les plasmides non recombinés (pGL2, pCMV5, pKSV10). Un témoin positif correspondant à la transfection du plasmide pSVLuc nous a permis de nous assurer de l'efficacité de la transfection. Les cellules sont incubées 6h à 37°C avec le mélange de transfection, puis le milieu est remplacé. 48h après transfection, les cellules sont lysées dans le tampon approprié "reporter lysis buffer" (Promega, Madison, WI, USA). L'activité luciférase est ensuite mesurée grâce à un luminomètre (Lumat LB 9501, Berthold) en utilisant le kit *luciferase assay system* (Promega). Cette activité est normalisée par rapport à la concentration en protéines déterminée par densitométrie (spectrophotomètre Du<sup>R64</sup>, Beckman) à la longueur d'onde de 595 nm. Toutes les expériences réalisées en double ont été répétées trois fois.

Lors de l'étude de la régulation du gène *H19* par p53, les cellules Calu 6 ont été cultivées dans du milieu α-MEM (Gibco BRL, Life Technologies inc.) supplémenté avec 10% de SVF et 1% de sodium pyruvate. Les cellules sont transfectées en utilisant la lipofectamine (Gibco BRL). Le plasmide rapporteur (*H19-luc*) déjà décrit a été co-transfecté avec le plasmide pL15TK contenant différentes séquences de *p53* : *p53* sens, *p53* antisens, mutant thermosensible 143 ala (remplacement de la valine 143 en alanine).

Tous les renseignements sur ces constructions sont disponibles dans Dugimont *et al.* (1998). 0,5  $\mu\text{g}$  de plasmide rapporteur et 2,5  $\mu\text{g}$  de plasmide contenant les différentes séquences de *p53* sont incubés en présence de 10  $\mu\text{l}$  de lipofectamine 6h dans un milieu dépourvu de sérum (Optimem 1, Gibco BRL), puis ce milieu est remplacé par du milieu complet. Après 48h, les cellules sont lysées et l'activité luciférase est dosée selon le protocole décrit ci-dessus. Les contrôles ont été réalisés en utilisant les vecteurs non recombinés (témoin négatif) et le plasmide pSVluc comme témoin positif de la transfection. Toutes les expériences réalisées en double ont été répétées trois fois.

### **Hybridation moléculaire *in situ* (HIS).**

#### *Préparation des coupes histologiques et des différentes cultures.*

Les lames sont préparées selon le protocole déjà décrit pour les glandes mammaires de souris.

#### *Synthèse des ribosondes: sondes sens et antisens.*

La sonde antisens, complémentaire des ARN *H19* à détecter, et la sonde sens utilisée comme témoin sont produites à partir d'un ADNc de 1,3 kpb, cloné dans le site *Sma* I du site de multiclonaage du vecteur d'expression pSP65 (Promega Biotec). Les deux sondes sont synthétisées sous le contrôle du promoteur du bactériophage SP6, après linéarisation du vecteur par *Hind* III.

Les bactéries, transformées par le plasmide sont mises en culture une nuit à 37°C dans des boîtes contenant du milieu LB à 1,5% d'agar, additionné d'ampicilline à 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Un clone est prélevé et amplifié une nuit à 37°C, sous agitation en milieu liquide LB. Les bactéries sont récupérées par centrifugation, et les plasmides sont isolés et purifiés sur colonne Nucléobond (Macherey-Nagel), précipités à l'isopropanol, puis repris dans l'eau.

Les sondes sont élaborées en utilisant 2  $\mu\text{g}$  de plasmide linéarisé, 165  $\mu\text{Ci}$  de  $^{35}\text{S}$  CTP, un mélange ATP, UTP et GTP (10 mM), DTT 0,1 M, 20 U de RNasin (inhibiteur de RNases), 5  $\mu\text{g}$  d'ARNt d'*E. coli*, 8 U d'ARN polymérase SP6. La synthèse s'effectue pendant 2 h à 39°C. L'ADN est ensuite digéré par 5 U de Dnase RQ1 (DNase RNase free) pendant 30 mn à 39°C dans un tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,9, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM. Après un traitement au phénol/chloroforme (v/v), les sondes sont précipitées en présence d'ARNt d'*E. coli*, utilisé comme entraîneur. Le culot est repris dans le mélange suivant: eau, DTT 0,1 M, ARNt (100  $\mu\text{g}$ ). Les sondes sont alors réduites à une longueur moyenne de 150 pb par hydrolyse alcaline ménagée, afin de leur permettre de mieux pénétrer dans les cellules fixées; puis elles sont purifiées sur colonne de filtration sur gel G-50 Séphadex (Quick Spin Column) qui élimine les nucléotides libres. La radioactivité émise par les sondes est évaluée sur deux aliquots par un compteur  $\beta$  à scintillation liquide.

#### *Hybridation moléculaire in situ.*

Les lames sont déparaffinées dans le toluène et réhydratées. Afin de bloquer les groupements réactifs du paraformaldéhyde qui peuvent inactiver la protéinase K, les lames subissent un bain de 10 mn dans un tampon glycine 0,1 M, Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4. Après le rinçage des lames pendant 5 mn en Tris-HCl 100 mM, pH 8, EDTA 50 mM, une digestion à la protéinase K (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pendant 15 mn) est réalisée pour rendre les ARN *in situ* plus accessibles. Afin d'assurer une bonne fixation des coupes ou des cellules sur les lames, un nouveau traitement au paraformaldéhyde à 4% est nécessaire, il est suivi d'un rinçage au PBS. La saturation des sites aspécifiques est assurée par une acétylation au triéthanolamine 0,1 M, pH 8 et à l'anhydride acétique 0,25 % pendant 10 mn. Les lames sont lavées dans du SSC 2X, puis dans l'eau. Finalement, les coupes sont déshydratées et séchées.

On dépose sur chaque lame de 40 à 80  $\mu\text{l}$  d'une solution composée de 5/10<sup>ème</sup> de formamide désionisé, de 4/10<sup>ème</sup> d'un mélange d'hybridation et d'1/10<sup>ème</sup> de sonde. Le

mélange d'hybridation est composé de: NaCl 0,3 M, Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 5 mM, sulfate de dextran 1X, solution de Denhardt 1X, ARNt d'*E. coli* 0,5 mg/ml et de DTT 100 mM. On dépose environ 20 000 cpm/ $\mu$ l de solution sur chaque lame. Le dépôt est recouvert d'une lamelle hydrophobe afin d'éviter la rétention artéfactuelle de la sonde et l'évaporation du mélange dans lequel elle se trouve. L'hybridation est réalisée pendant 16 h à 50-55°C, en atmosphère saturée par un mélange de formamide 50 % et de SSC 4X. Les lames sont lavées dans une solution de SSC 4X et de DTT 10 mM pendant 2 h afin de décoller les lamelles, puis elles sont lavées de façon plus stringente 30 mn à 60-65°C dans une solution de formamide 50 %, NaCl 0,15 M, Tris-HCl 20 mM, pH 8, EDTA 5 mM. Une digestion par la RNase A (20  $\mu$ g/ml) à 37°C dans un tampon (NaCl 0,4 M, Tris pH 7,5 10 mM, EDTA 0,05 M) permet l'élimination des hybrides aspécifiques. Lavées dans ce dernier tampon 5 mn, puis 15 mn en SSC 2X à 60°C et 15 mn en SSC 0,1X à 60°C, les coupes sont finalement déshydratées et séchées.

#### *Autoradiographie.*

En chambre noire, les lames sont plongées dans l'émulsion NTB2 (Kodak) à 45°C, diluée au demi par une solution d'acétate d'ammonium 0,6 M. Le temps d'autoradiographie pour les tumeurs est de 15 jours, pour les glandes mammaires et les utérus de 21 jours et pour les cellules en culture de 28 jours. L'exposition s'effectue à 4°C, à l'obscurité et en présence de dessiccateur. Les lames sont révélées à 12°C (révélateur D19) et fixées sur la glace (fixateur Unifix, Kodak). Les noyaux sont rendus visibles par un marqueur fluorescent, le Hoechst 33258 (Bis benzimidine, Serva) qui se fixe de manière covalente à l'ADN. Excité par une lumière U.V. ( $\lambda$  340 nm), il fluoresce à 450 nm. Les lames sont montées à l'aide du Glycergel (Dako), examinées sous U.V. pour observer les noyaux et en fond noir pour observer les grains d'argent (microscope Olympus BH2).

## **Technique du "Northern blot".**

### *Extraction des ARN totaux.*

Les cellules en culture sont rincées par du PBS, puis lysées par du tampon guanidium (4,7 M guanidine isothiocyanate, 0,02 M acétate de sodium, 0,5% SDS, 0,05 M Tris-HCl, 0,1 M  $\beta$ -mercaptoéthanol) préchauffé à 60°C. Ce tampon libère les différents constituants cellulaires. Les tumeurs sont broyées en présence d'azote liquide et de tampon guanidium. Les ARN totaux sont extraits par ultracentrifugation sur coussin de CsCl (CsCl 4,9 M, acétate de sodium 0,1 M) à 28 000 tours/min (rotor Beckman SW41) pendant 18 h à 18°C. Le culot d'ARN est repris dans l'eau, puis subit une extraction phénol/chloroforme (v/v). La phase aqueuse est à nouveau traitée par du chloroforme, puis les ARN sont précipités par 0,2 M d'acétate de sodium et 3 volumes d'éthanol absolu froid. Après centrifugation (1 h, 4°C, 13 000 x g), les ARN sont repris dans l'eau et on évalue leur concentration.

### *Electrophorèse en gel d'agarose dénaturant.*

Les ARN (20  $\mu$ g dans 40  $\mu$ l de tampon dénaturant composé de formamide 50%, formaldéhyde 2,2 M, MOPS 1X) sont déposés dans un gel d'agarose à 1,2% contenant du formaldéhyde désionisé 2,2 M et du MOPS 1X. Avant le dépôt, les ARN sont dénaturés 5 mn à 68°C, placés sur de la glace et sont additionnés de "bleu de charge". La migration s'effectue dans du MOPS 1X durant 12 à 16 h sous une tension constante de 20V.

### *Transfert des ARN.*

Le gel est rincé 3 à 4 h à l'eau courante puis les ARN sont transférés pendant 16 h sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C-extra, Amersham) dans du SSC 20X, puis fixés de façon irréversible par cuisson de la membrane pendant 2h à 80°C.

### *Elaboration de la sonde.*

Le fragment utilisé pour synthétiser la sonde est issu du pSP65 déjà décrit; une digestion par *Pst* I permet l'obtention d'un insert de 1,2 kpb. Le fragment de 1,2 kpb est récupéré après une électrophorèse préparative en gel d'agarose à 1%. Lors de la migration du plasmide digéré, un gel d'agarose à 0,3 % est coulé dans une fenêtre découpée sous la bande désirée. Le fragment de gel contenant l'insert est récupéré et subit des cycles successifs de congélation/décongélation. Après élimination de l'agarose par centrifugation (ultracentrifugeuse TL100, Beckman), l'ADN contenu dans le surnageant est précipité, puis repris dans l'eau.

L'insert est marqué par "amorces multiples" (Megaprime DNA labeling system, kit Amersham). Les deux brins d'ADN sont dénaturés par chauffage et s'hybrident avec des oligonucléotides aléatoires. L'enzyme de Klenow restaure l'intégrité des brins en incorporant des nucléotides dont l'un est radiomarqué ( $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP + dXTP). La sonde est ensuite purifiée par passage sur colonne G-50 Séphadex. Une sonde GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphatedéshydrogénase) est synthétisée, puis hybridée selon le mode décrit pour la sonde *H19*. Ce témoin sert à vérifier la charge équilibrée en ARN des différents puits.

### *Hybridation et lavages.*

La préhybridation et l'hybridation sont réalisées à 42°C en formamide 50 %, solution de Denhardt 1X, SSC 3X, Hépès 10 mM, pH 7 et ADN de sperme de saumon (150 mg/l). Après 16 h d'hybridation, les membranes sont lavées à 55°C en SSC 2X, SDS 0,1 % deux fois 30 mn, puis 10 mn en SSC 0,1X et SDS 0,1 %. Les membranes sont alors mises en autoradiographie.

## RESULTATS



## Premier chapitre

### Expression du gène *H19* au cours du développement de la glande mammaire.

Une forte expression du gène *H19* chez le fœtus humain ou murin, et sa répression à la naissance dans la plupart des organes ont été décrites par Pachnis *et al.* (1984) et Poirier *et al.* (1991). Ce patron d'expression suggère que le gène, comme la plupart des gènes subissant l'empreinte génomique, contribue au développement normal des organes dans lesquels il s'exprime.

Dans l'introduction de ce mémoire, nous avons justifié le choix de notre modèle privilégié, la glande mammaire. Il nous a donc semblé logique d'asseoir notre projet sur le suivi de l'expression du gène *H19* au cours du développement normal de cette glande, depuis un stade fœtal jusqu'à l'âge adulte et au cours des différentes étapes de la vie sexuelle d'un animal, la souris. Cette étude comprend donc successivement la détection des transcrits par HIS dans le bourgeon mammaire et les tissus adjacents d'un fœtus, dans les ébauches mammaires de jeunes prépubères et dans la glande mammaire de souris pubères, en gestation, en lactation et au cours de l'involution après le sevrage des jeunes (Figure 5). Chez le fœtus, *H19* s'exprime fortement dans le bourgeon mammaire et dans les tissus adjacents (Figure 5, ligne 1). A la naissance et jusqu'à la puberté, le gène est et reste réprimé (Figure 5, lignes 2 et 3). Lors de la puberté, il s'exprime fortement dans les cellules épithéliales, en particulier à l'extrémité des tubules en croissance (Figure 5, ligne 4). Après les changements morphologiques et physiologiques consécutifs de la puberté, le niveau d'expression du gène redevient faible; mais chez la femelle gravide, on observe à nouveau la présence de nombreux transcrits *H19* dans les cellules épithéliales

**Figure 5:**

Expression du gène *H19* au cours du développement de la glande mammaire.

I: coloration histologique (Picro Indigo Carmin)

II: Hoechst

III: Hybridation moléculaire *in situ* avec une sonde *H19* antisens

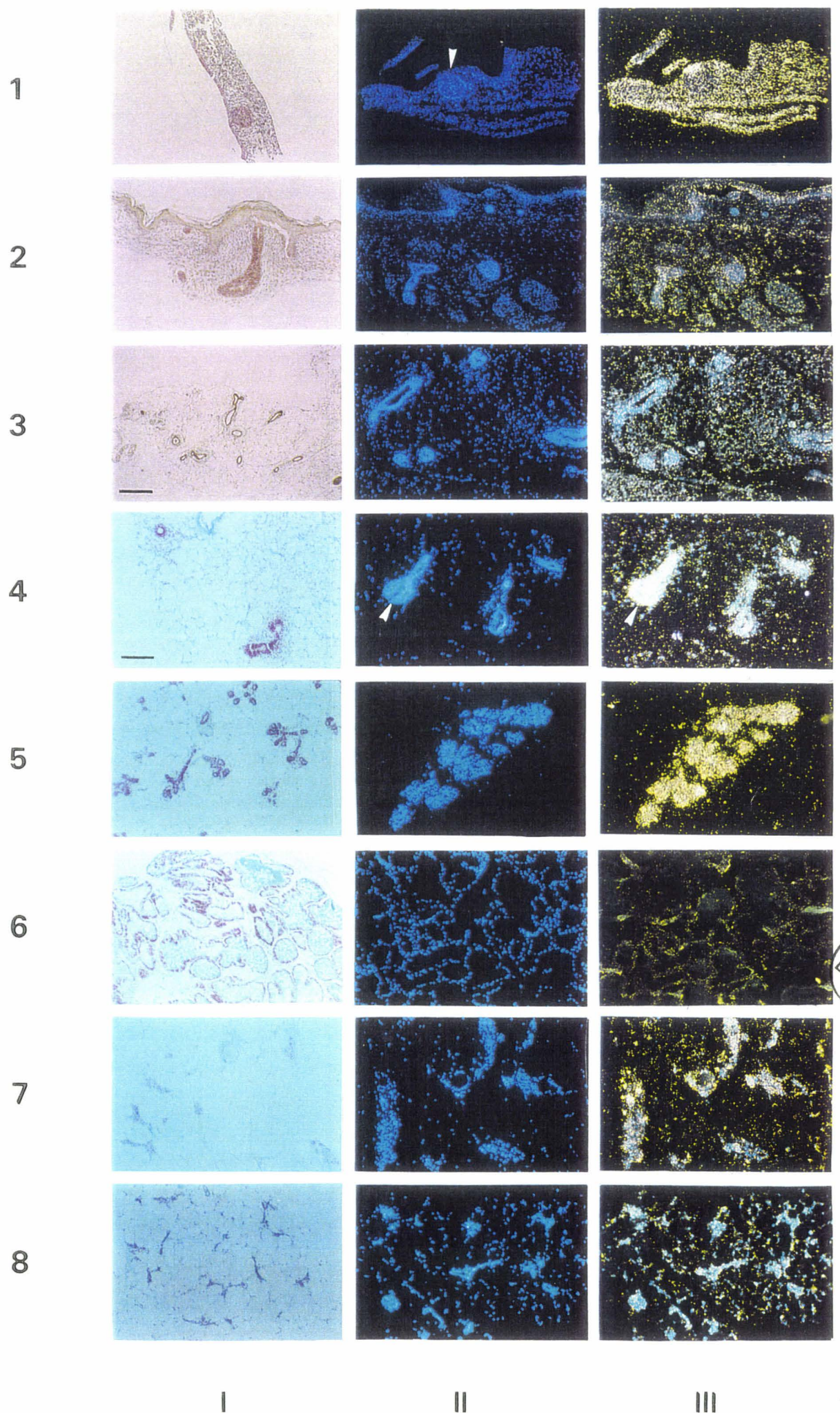
Glande mammaire à différents stades du développement:

1) Bourgeon mammaire (flèche) d'un embryon de souris (E14,5) ; 2) cordon mammaire d'un souriceau nouveau-né (D0) ; 3 et 4) glandes mammaires de souris avant (D25) ou pendant la puberté (D35) respectivement ; 5 et 6) glandes mammaires de souris en gestation et en lactation respectivement ; 7 et 8) glandes mammaires au cours de l'involution, 5<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> jours après le sevrage des souriceaux respectivement.

*H19* est fortement exprimé dans le foetus (1), pendant la puberté (4) particulièrement dans les bourgeons terminaux (flèche) et dans les *acini* pendant la gestation (5). Cette expression est réduite dans tous les autres stades et nulle au cours de la lactation dans les structures lobulo-alvéolaires.

Les lames ont été mises en autoradiographie durant 21 jours.

Pour les lignes 1 et 2 et la photographie I-3 le grossissement est défini par la barre en I-3 qui représente 250 µm. Pour les lignes 4 à 8 et les photographies II-3 et III-3 le grossissement est défini par la barre en I-4 qui représente 120 µm.



BU  
LILLE I

Fig.5

regroupées en acini (Figure 5, ligne 5). Après la parturition, la synthèse des ARN *H19* diminue rapidement et ils sont difficilement détectables au cours de la lactation (Figure 5, ligne 6). Dans la période qui suit le sevrage des petits, la glande mammaire recouvre l'état morphologique et physiologique qu'elle présentait avant la gestation et cet état initial s'accompagne d'un retour à un faible niveau (niveau de base) d'expression du gène (Figure 5, lignes 7 et 8). Le tableau 2 récapitule les variations, en données semi-quantitatives, de l'expression du gène *H19* au cours des différentes phases de la vie de l'animal choisi. Il est intéressant de noter que ces variations se manifestent essentiellement au niveau des cellules épithéliales, alors que les cellules mésenchymateuses semblent peu concernées par ce phénomène. Ceci suggère que *H19* pourrait être impliqué dans le développement physiologique de la glande mammaire. Les travaux de Pachnis *et al.* (1984) et de Douc-Rasy *et al.* (1993) signalaient déjà que la répression du gène *H19* dans une période néonatale survient dans la plupart des organes, sauf dans la glande mammaire, les muscles squelettiques et le cœur. Nous apportons ici une évidente démonstration de la pérennité de l'expression du gène chez l'adulte, mais celle-ci subit des variations, variations que nous avons également détectées dans différents échantillons de sein normal, résections issues de mammoplastie en chirurgie esthétique (Figure 6). Chez la femme, le gène *H19* s'exprime dans les cellules épithéliales, myoépithéliales, et dans certaines cellules du tissu palléal (le tissu palléal, d'origine mésenchymateuse, est le tissu très sensibles aux variations hormonales jouxtant les cellules épithéliales). Les variations de l'intensité du marquage, observées d'un échantillon à l'autre, pourraient être attribuées aux différentes périodes du cycle menstruel.



Stade du développement	Cellules épithéliales	Cellules mésenchymateuses
Fœtus	Forte	Forte
Nouveau-né	Basale	Faible <sup>1</sup>
Puberté	Forte dans les bourgeons terminaux en croissance	Faible <sup>1</sup>
Adulte	Basale	Faible <sup>1</sup>
Gestation	Très forte dans les <i>acini</i>	Faible <sup>1</sup>
Lactation	Non significative	- <sup>2</sup>
Involution	Basale	Faible <sup>1</sup>

**Tableau 2:** Evaluation semi-quantitative de l'expression du gène *H19* dans la glande mammaire en fonction du stade de développement.

(1) L'expression dépend des types cellulaires: moyenne dans les adipocytes et les cellules endothéliales, non ubiquitaire dans les autres cellules.

(2) A ce stade, les cellules mésenchymateuses sont très rares.

**Figure 6:** Expression du gène *H19* dans la glande mammaire normale humaine.

A et B: Hybridation moléculaire *in situ* avec une sonde *H19* antisens

Les transcrits *H19* sont présents dans les cellules épithéliales, myoépithéliales et dans le mésenchyme, en particulier dans le tissu palléal. De légères variations d'expression du gène *H19* sont fréquemment observées d'un échantillon à un autre, ce qui pourrait s'expliquer par la période du cycle menstruel dans laquelle se trouve la donneuse lors de la résection.

Les lames ont été mises en autoradiographie durant 15 jours.

La barre en A représente 100  $\mu\text{m}$ . La barre en B représente 40  $\mu\text{m}$ .

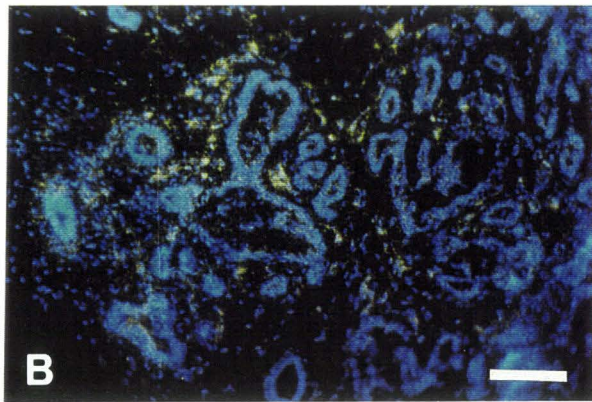
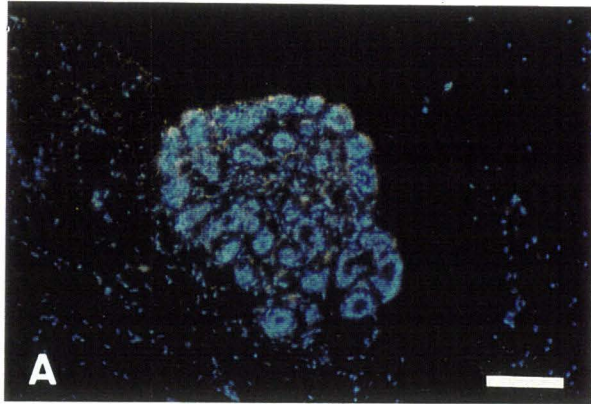


Fig. 6

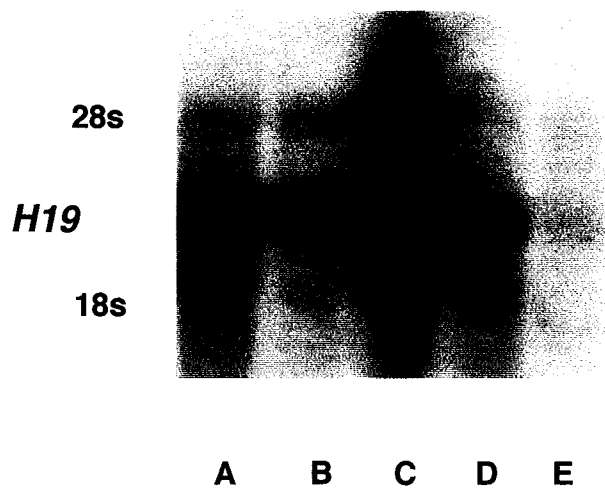
## Deuxième chapitre

### Expression du gène *H19* dans des carcinomes mammaires.

Après avoir reconnu des modulations de l'expression du gène *H19* dans la glande mammaire saine, mais se trouvant en différents états physiologiques, il était intéressant de préciser le mode d'expression de ce gène dans les carcinomes mammaires. En effet, au début de notre stage plusieurs articles indiquaient déjà que *H19* est surexprimé dans de nombreuses tumeurs (vessie : Ariel *et al.*, 1994 ; Cooper *et al.*, 1996 ; poumon : Kondo *et al.*, 1995 ; œsophage : Hibi *et al.*, 1996 ; trophoblaste : Walsh *et al.*, 1995) et celles du sein en particulier ; cette fréquence a incité Douc-Rasy et ses collaborateurs, en 1993, a nommé *H19, BAC* pour “ *Breast AdenoCarcinomas* ”. La plupart des travaux précédents rapportaient des résultats de “ Northern-blot ”, et nous avons effectivement détecté, par cette technique, un message *H19* souvent intense dans différentes tumeurs ou cellules cancéreuses en culture (tumeurs du sein et du rein, neuroblastome, cellules HeLa, Figure 7). Les résultats obtenus par cette technique ne donnent évidemment aucune indication sur l'expression du gène à l'échelle cellulaire, ni au niveau du type de tissu concerné. La seule approche par HIS, dont nous disposions au début de notre stage, était préliminaire; en effet, notre groupe n'avait étudié qu'un fibroadénome et treize adénocarcinomes mammaires humains, et il mettait l'accent sur la surexpression du gène dans ces tumeurs et l'accumulation fréquente d'ARN *H19* à l'interface cellules épithéliales/cellules mésenchymateuses (Dugimont *et al.*, 1995).

Notre projet était donc d'approfondir cette étude et d'accumuler des résultats pouvant ainsi prétendre à une étude statistique de la localisation précise de la surexpression du gène *H19* dans les adénocarcinomes du sein. Par ailleurs, notre souhait





**Figure 7 :** Expression du gène *H19* dans différentes tumeurs et dans une lignée cellulaire.

A: neuroblastome d'un enfant

B: tumeur de rein

C: cellules HeLa

D et E: tumeurs du sein

Le gène *H19* est souvent exprimé dans les tumeurs quelle que soit leur origine. Il existe cependant des variations selon les échantillons (D et E).

Type histologique des tumeurs		Localisation des transcrits <i>H19</i>					
Carcinome	Nombre	Stromale (S)		Epithéliale (E)		E + S	
		n	%	n	%	n	%
Canalaire invasif	55	51	92.73	1	1.82	3	5.45
Lobulaire invasif	15	15	100	0	0	0	0
Sarcomatoïde	1	1	100	0	0	0	0
Avec métaplasie épidermoïde	2	1	50	1	50	0	0
Tubuleux	2	2	100	0	0	0	0
Colloïde muqueux	5	5	100	0	0	0	0
Papillaire	1	0	0	1	100	0	0
Apocrine	12	11	91.67	0	0	1	8.33
Intracanalair <i>in situ</i>	8	7	87.50	0	0	1	12.50
Lobulaire <i>in situ</i>	1	1	100	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>102</b>	<b>94</b>	<b>92.16</b>	<b>3</b>	<b>2.94</b>	<b>5</b>	<b>4.90</b>

Tableau 3 : Localisation des ARN *H19* en fonction des différents types de tumeurs.  
S : Localisation stromale; E : Localisation epithéliale.

**Figure 8:** Expression du gène *H19* dans un carcinome canalaire invasif.

Sur cette planche sont représentées les différentes techniques mises en œuvre pour chaque échantillon: A) coloration histologique (HES), B) marquage spécifique des cellules épithéliales par un anticorps dirigé contre une cytokératine (anti-KL1), C) détection spécifique des myofibroblastes, grâce à un anticorps anti- $\alpha$ -actine lisse, D) Hoechst, E) hybridation moléculaire *in situ* avec une sonde *H19* antisens, autoradiographie durant 15 jours, F) détection immunologique de la protéine suppresseur de tumeurs p53, G) détection de la protéine Ki-67, marqueur des cellules en cycle. Dans cette tumeur, la surexpression du gène *H19* est localisée à la fois dans les compartiments stromal et épithélial. Aucune co-localisation entre *H19* et p53 d'une part et entre *H19* et Ki-67 d'autre part n'a été observée.

La barre en G représente 40  $\mu$ m.

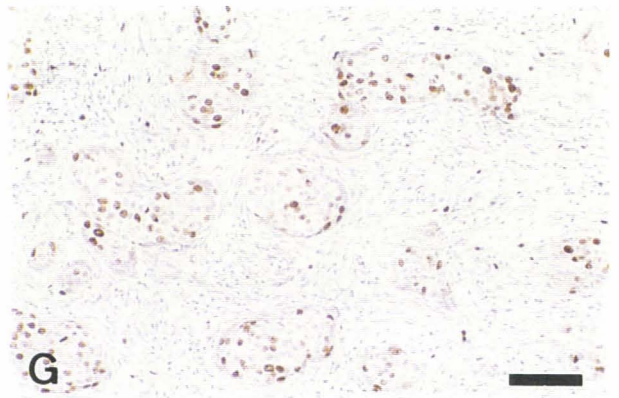
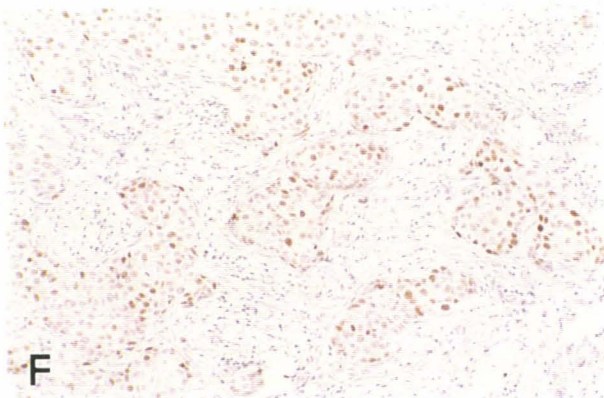
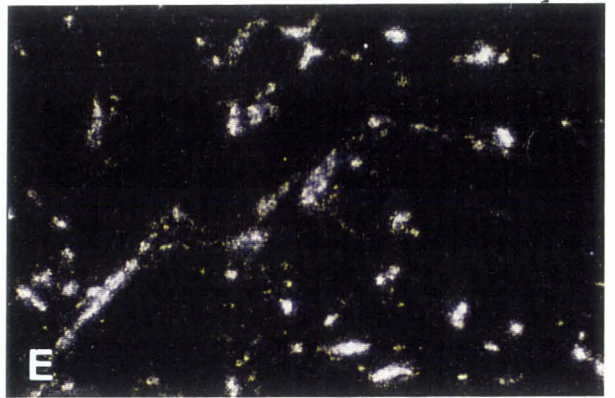
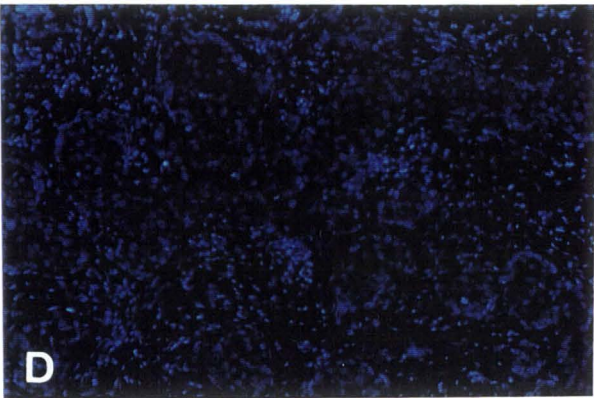
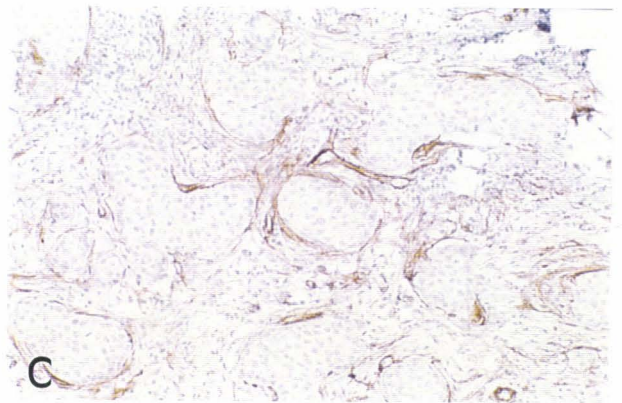
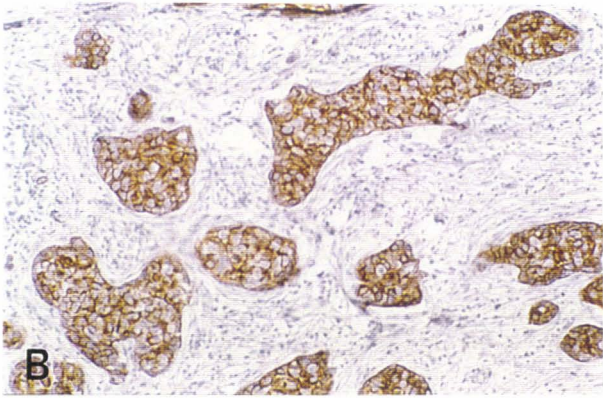
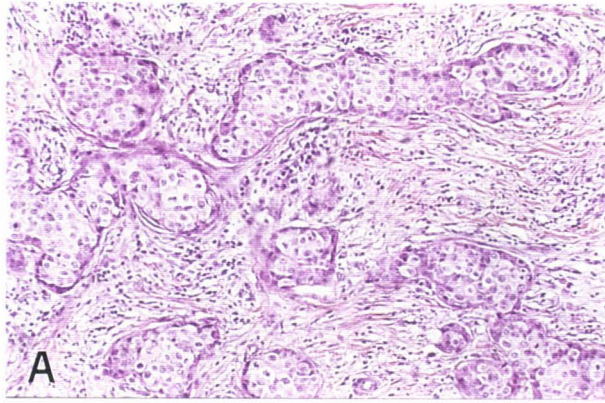


Fig. 8

Facteurs clinicopathologiques	Patron d'expression du gène <i>H19</i>			Surexpression du gène <i>H19</i>	
	Stromal (S) 94 (92.2%)	Epithelial (E) 3 (2.9%)	S et E 5 (4.9%)	Nombre de cas et pourcentage	valeurs <i>P</i>
<b>Age</b>					
< 50 ans	23 (24.5%)	1 (33.3%)	0 (0%)	16/24 (66.7%)	0.4297
> 50 ans	71 (75.5%)	2 (66.7%)	5 (100%)	58/78 (74.4%)	
<b>Statut ménopausal</b>					
Pré-ménopausal	29 (32.2%)	1 (33.3%)	1 (20%)	21/31 (67%)	0.4559
Post-ménopausal	61 (67.8%)	2 (66.7%)	4 (80%)	50/67 (74.6%)	
<b>Valeur T</b>					
T0	7 (7.7 %)	0 (0%)	2 (40 %)	3/9 (33.3%)	T1 to T3 0.029 T0 to T3 4.10 <sup>-5</sup> T0 to T4 1.3.10 <sup>-5</sup>
T1	13 (14.3%)	0 (0%)	1 (20 %)	8/14 (57.1%)	
T2	50 (54.9%)	1 (33.3%)	0 (0 %)	43/51 (84.3%)	
T3	15 (16.5%)	2 (66.7)	2 (40%)	12/19 (63.2%)	
T4	6 (6.6)	0 (0%)	0 (0%)	5/6 (83. %)	
<b>Statut des ganglions</b>					
non envahis	44 (50.6%)	1 (33.3%)	4 (100%)	40/49 (81.6%)	0.2310
envahis	43 (49.4%)	2 (66.7%)	0 (0%)	32/45 (71.1%)	
<b>Récepteur aux oestrogènes</b>					
absence	42 (46.7%)	3 (100%)	5 (100%)	30/50 (60.0%)	0.0048
présence	48 (53.3%)	0 (0%)	0 (0%)	41/48 (85.4%)	
<b>Récepteur à la progestérone</b>					
absence	40 (44%)	3 (100%)	5 (100%)	29/48 (60.4%)	0.0159
présence	51 (56%)	0 (0%)	0 (0%)	42/51 (82.6%)	
<b>Grade histologique</b>					
grade I	12 (14.1%)	0 (0%)	1 (20%)	9/13 (69.2%)	I/II 0.5426 I/III 0.2498 II/III 0.5059 I/II/III 0.5635
grade II	44 (51.8%)	0 (0%)	2 (40%)	35/46 (76.1%)	
grade III	29 (34.1%)	3 (100%)	2 (40%)	28/34 (82.4%)	
<b>Evolution des patients après 5 ans</b>					
vivant	75 (80.6%)	0 (0%)	5 (100%)	57/80 (71.3%)	0.4048
décédé	18 (19.4%)	3 (100%)	0 (0%)	17/21 (80.9%)	
<b>Immunoréactivité à p53</b>					
négative	70 (79.5%)	2 (100%)	2 (40%)	54/74 (73%)	0.4961
positive	18 (20.5%)	0 (0%)	3 (60%)	17/21 (80.9%)	

**Tableau 4** : Corrélation entre la surexpression du gène *H19*, sa localisation et les facteurs clinicopathologiques classiques. Dans certains cas, l'absence d'informations clinicopathologiques explique que le nombre total des cas diffère de 102. Dans 72,5% des cas le gène *H19* est surexprimé. Cette surexpression est souvent stromale (92,2%), parfois épithéliale et stromale (4,9%) et rarement épithéliale (2,9%).

**Figure 9:** Expression du gène *H19* dans un carcinome canalaire invasif.

A : coloration histologique (HES)

B: immunocytochimie avec un anticorps anti-KL1 dirigé contre une cytokératine spécifique des cellules épithéliales

C : immunocytochimie avec un anticorps anti- $\alpha$ -actine lisse spécifique des myofibroblastes

D : hybridation moléculaire *in situ* avec une sonde *H19* antisens, autoradiographie durant 15 jours

La surexpression du gène *H19* est localisée exclusivement dans le compartiment stromal.

La barre en D représente 40  $\mu$ m.



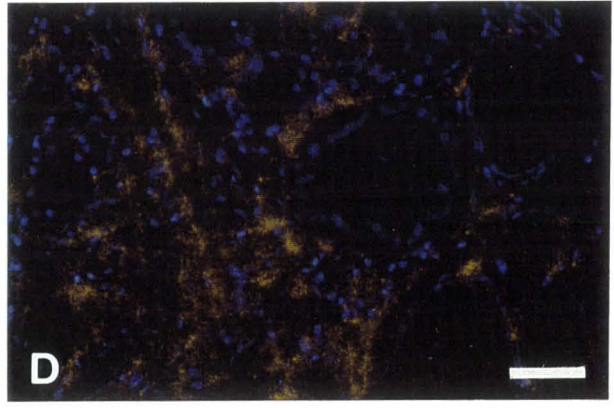
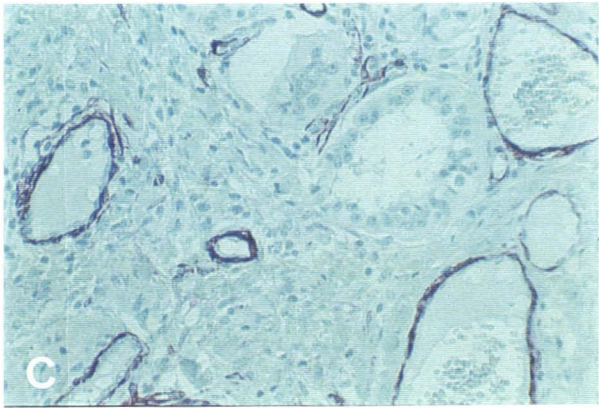
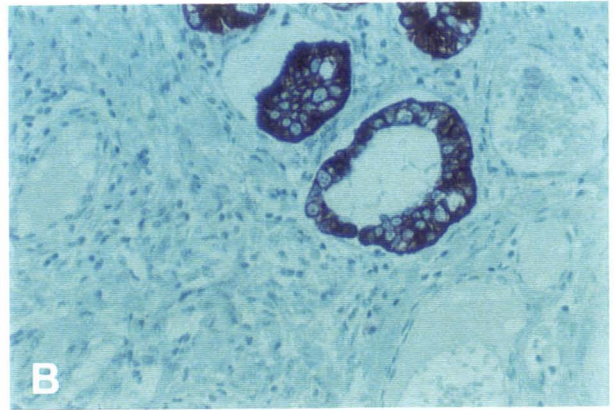
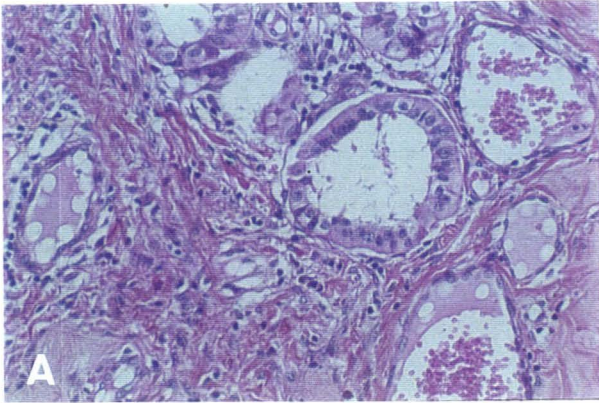


Fig. 9



**Figure 10:** Expression du gène *H19* dans un carcinome avec métaplasie épidermoïde.

A : coloration histologique (HES)

B : immunocytochimie avec un anticorps anti-KL1 dirigé contre une cytokératine spécifique des cellules épithéliales

C : hybridation moléculaire *in situ* avec une sonde *H19* antisens, autoradiographie durant 15 jours

La surexpression du gène *H19* est localisée exclusivement dans le compartiment épithélial. Elle est, de plus, focalisée à l'interface épithélium/stroma.

La barre en C représente 40  $\mu\text{m}$ .



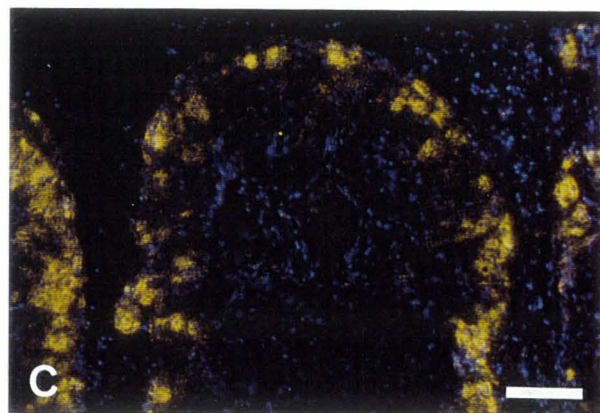
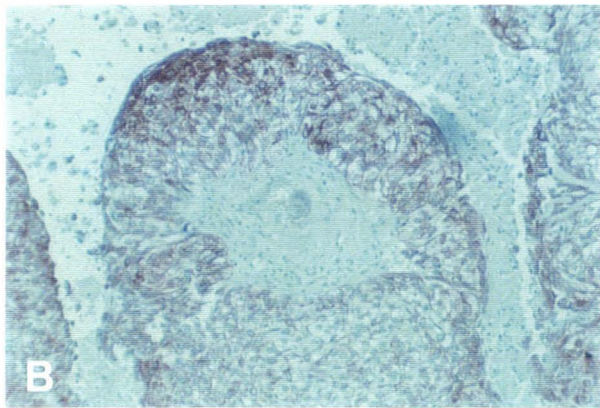
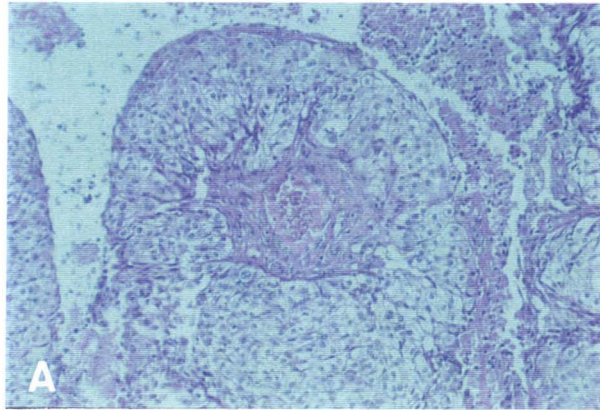


Fig.10

était de tenter d'établir des corrélations significatives entre cette surexpression et des facteurs clinicopathologiques ou des marqueurs biologiques (p53, Ki-67) usuellement utilisés en diagnostic dans les laboratoires d'anatomo-pathologie.

Nous avons ainsi considéré 102 tumeurs de types variés (Tableau 3). L'expression du gène *H19* a été localisée avec précision grâce à l'utilisation, sur des coupes sériées, d'anticorps spécifiques des deux compartiments principaux (épithélial et stromal) de la tumeur (Figure 8) et les patrons d'expression dans la glande mammaire ont été comparés à celui de plusieurs échantillons de sein normal. Divers facteurs clinicopathologiques (âge des patients, type de l'adénocarcinome, taille de la tumeur ou facteur T de la classification TNM pour Tumeur Nodule Métastase, grade histopronostique selon Bloom et Richardson, 1957 et Le Doussal *et al.*, 1989, statut ménopausal, présence de récepteurs aux oestrogènes ou à la progestérone, envahissement des ganglions) ont été retenus et comparés avec la surexpression du gène. Enfin, des corrélations éventuelles avec un marqueur de cellules en cycle (Ki-67) et avec la protéine p53 ont été recherchées.

Notre étude confirme la surexpression du gène *H19* dans la plupart des carcinomes mammaires ; 72,5% des cas tous types confondus (Tableau 4). L'utilisation de l'hybridation moléculaire *in situ*, associée à une immuno-cytochimie marquant spécifiquement soit les cellules épithéliales, soit des cellules stromales (respectivement anticorps anti-cytokératine et anti- $\alpha$ -actine lisse), nous a permis de préciser le patron d'expression du gène *H19* (Figure 8). Nous montrons ainsi que le gène *H19* est préférentiellement exprimé seulement dans des cellules stromales (92,5% des cas), quel que soit le type de tumeur envisagé (Figure 9, Tableau 4). En revanche, les cellules épithéliales expriment rarement le gène : dans 4,9% des tumeurs le marquage est abondant dans les deux compartiments, alors que dans 2,9% des cas le marquage est exclusivement épithélial (Figures 8 et 10, respectivement). Dans un grand nombre d'observations, l'accumulation des ARN *H19* est localisée à la frontière épithélium-mésenchyme (Figure

**Figure 11:** Expression du gène *H19* dans un fibroadénome mammaire.

A : Hoechst

B : Hybridation moléculaire *in situ* avec une sonde *H19* antisens

La surexpression du gène *H19* est exclusivement stromale et les transcrits se concentrent à l'interface épithélium/stroma.

Les lames ont été exposées durant 15 jours en autoradiographie.

La barre en B représente 40  $\mu\text{m}$ .

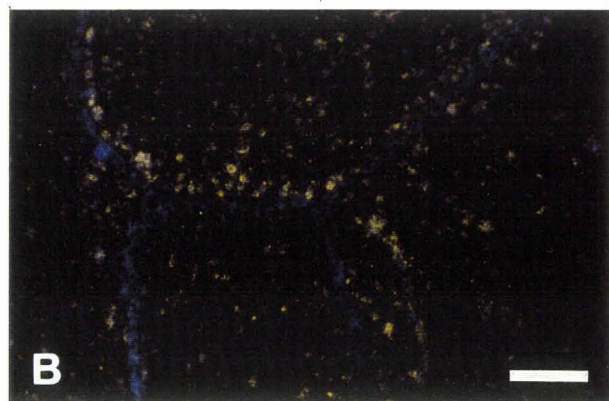
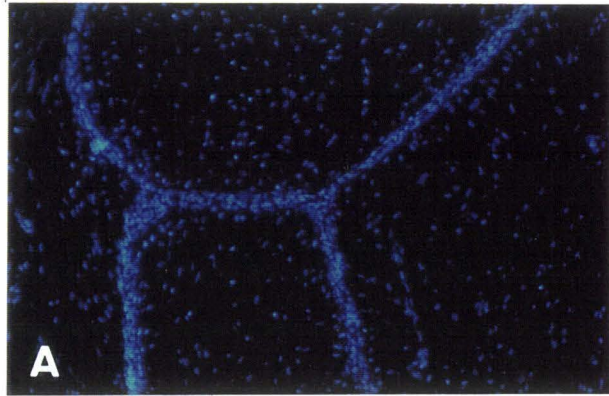


Fig.11



10). Ce fait est également observé dans une tumeur bénigne, un fibroadénome (Figure 11).

La surexpression du gène *H19* a été considérée en parallèle avec différents facteurs clinicopathologiques. Bien que les données brutes (pourcentages de cas, voir Tableau 4) indiquent que le gène *H19* semble plus souvent surexprimé dans les tumeurs de haut grade, l'étude statistique ne permet pas, avec l'échantillonnage retenu, d'établir une corrélation significative entre l'accumulation des ARN *H19* et le grade histopronostique. En conséquence, il apparaît actuellement difficile d'associer, simplement, la surexpression du gène *H19* dans la glande mammaire à la progression tumorale, contrairement à ce qui a été rapporté pour la vessie (Cooper *et al.*, 1996) et des carcinomes urothéliaux (Biran *et al.*, 1994). Selon le même ordre d'idée, on note que les tumeurs présentant une surexpression du gène exclusivement dans les cellules épithéliales sont toutes de grade III, dépourvues de récepteurs aux hormones et que les patientes sont décédées au cours des cinq ans qui ont suivi la résection tumorale. A nouveau, le faible nombre de cas ne permet pas de tirer de conclusion définitive vis-à-vis de cette constatation ; il reste qu'une forte expression du gène *H19* dans les seules cellules épithéliales des tumeurs mammaires pourrait éventuellement indiquer un mauvais pronostic.

Par ailleurs, il existe une très forte corrélation entre la surexpression du gène *H19* et deux facteurs pronostics considérés comme importants par les anatomo-pathologistes : la présence de récepteurs aux stéroïdes et la valeur T. Cette dernière est l'une des composantes de la classification TNM utilisée pour le pronostic et elle représente la taille de la tumeur, l'inflammation de l'organe et l'extension tumorale aux tissus environnants. Nos critères statistiques indiquent une forte corrélation entre la valeur T et la surexpression du gène *H19* (Tableau 4). Nous avons également établi des corrélations significatives entre la surexpression du gène et la sensibilité aux hormones de la tumeur, sensibilité caractérisée par la présence des récepteurs aux œstrogènes et par celle des

récepteurs spécifiques de la progestérone. Ces données suggèrent une relation possible entre l'expression du gène et les ligands spécifiques concernés.

En revanche, l'expression de *H19* n'a pu être significativement corrélée avec les autres facteurs considérés : âge, statut ménopausal, invasion des ganglions, survie à 5 ans (Tableau 4). De même, nous n'avons pas pu établir de corrélation entre l'accumulation de la protéine p53 ou la présence du marqueur de cycle cellulaire Ki-67 et la surexpression du gène. Les protéines p53 et Ki-67 sont présentes dans les cellules épithéliales, alors que le gène *H19* a une surexpression préférentiellement stromale. En première analyse, il semble donc que le gène ne soit pas nécessaire au maintien en cycle des cellules et que dans les carcinomes sa surexpression ne soit pas directement liée à la prolifération anarchique des cellules épithéliales. En ce qui concerne la protéine p53, il nous faut rappeler que cette dernière est très labile dans les cellules normales, donc difficilement détectable, mais sa surexpression dans les cancers la rend décelable et résulte souvent d'une mutation qui lui confère une certaine stabilité. Par ailleurs, nous avons personnellement montré que dans de tout autres systèmes (cellules HeLa, Calu 6), le gène *H19* était régulé négativement par p53 (Dugimont *et al.*, 1998).

Les informations recueillies au cours de cette étude ne nous permettent donc pas de considérer la seule surexpression du gène *H19* comme un facteur pronostic indépendant et complètement fiable. Il faut cependant retenir que la surproduction des ARN *H19* est corrélée avec deux facteurs pronostics usuellement utilisés lors des diagnostics anatomopathologiques, la valeur T et la présence de récepteurs aux œstrogènes ou à la progestérone. Enfin, l'observation fréquente d'une accumulation des transcrits *H19* à l'interface cellules épithéliales/cellules mésenchymateuses place l'expression de ce gène au sein des interactions entre ces deux types de cellules, interactions que l'on sait être fondamentales au cours du développement normal de la glande mammaire ou lors d'une tumorigenèse (Sakakura *et al.*, 1991 ; Cunha *et al.*, 1992).

## Troisième chapitre

### Modulations *in vivo* du gène *H19*.

Le patron d'expression du gène *H19* au cours de la genèse et du remodelage de la glande mammaire pendant la vie d'un mammifère, d'une part, et les corrélations entre sa surexpression et la présence de récepteurs nucléaires aux œstrogènes et à la progestérone dans les adénocarcinomes du sein, d'autre part, suggèrent une possible régulation du gène par les hormones stéroïdes.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons recherché au cours du cycle œstrien chez la souris, les éventuelles variations du gène *H19* dans la glande mammaire et dans un autre organe réputé hormono-sensible : l'utérus. Le cycle œstrien murin comporte quatre stades, déterminés d'après des frottis vaginaux, le proœstrus, l'œstrus, le metœstrus et le diœstrus, au cours desquels les taux d'hormones stéroïdes fluctuent. La glande mammaire manifeste peu de variations morphologiques et physiologiques durant le cycle œstrien. Parallèlement, l'expression du gène *H19* y reste plutôt faible et constante, avec cependant une très légère activation lors du metœstrus (Figure 12). En revanche, de profonds changements morphologiques et physiologiques de l'utérus surviennent durant le cycle. On distingue une phase proliférative (proœstrus et œstrus) sous contrôle des œstrogènes, suivie d'une phase sécrétoire (metœstrus et diœstrus) conditionnée par la progestérone. Seules certaines cellules, regroupées en amas au sein du stroma utérin et du myomètre, expriment le gène *H19* ; alors que les cellules de l'épithélium luminal et de l'épithélium glandulaire ne sont pas marquées (Figure 13). A la fin de la phase sécrétoire (diœstrus), l'expression du gène est très faible, le marquage est à la limite du significatif. Le gène est activé au début de la phase de prolifération (proœstrus) et ce phénomène s'amplifie au

**Figure 12:**

Expression du gène *H19* dans la glande mammaire de souris nullipares au cours du cycle œstrien.

I: Hoechst

II: Hybridation *in situ* avec une sonde *H19* antisens

De 1 à 4: glande mammaire de souris au cours de l'œstrus, du metœstrus, du diœstrus et du proœstrus respectivement.

Les lames ont été mises en autoradiographie durant 21 jours.

L'expression du gène *H19* est très faible quelque soit la phase du cycle. Néanmoins, cette expression augmente très légèrement au cours du metestrus.

Le grossissement est défini par la barre en II-4 qui représente 160  $\mu\text{m}$ .



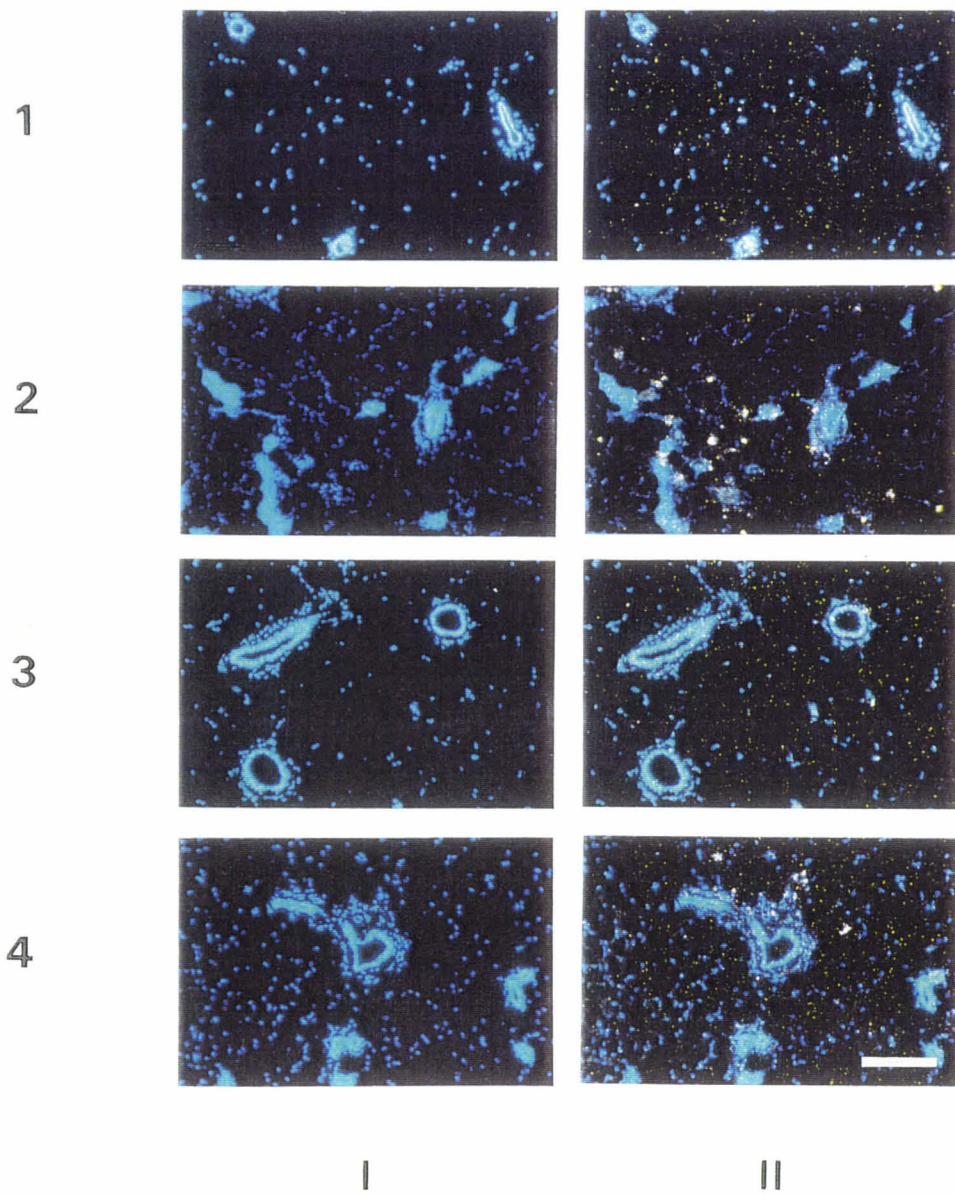


Fig.12



**Figure 13:** Expression du gène *H19* dans l'utérus de souris nullipares au cours du cycle œstrien.

I: coloration histologique (HES)

II: Hoechst

III: Hybridation moléculaire *in situ* avec une sonde *H19* antisens

De 1 à 4: utérus de souris au cours de l'œstrus, du metœstrus, du diœstrus et du proœstrus respectivement.

Le gène *H19* est exprimé dans le stroma (flèche) et dans le myomètre (double flèche), mais non dans l'épithélium glandulaire et luminal (tête de flèche). L'expression de *H19* est élevée durant l'œstrus et le metestrus, diminue en proestrus et est la plus faible en diestrus. Ces modulations au cours du cycle s'accompagnent de changements morphologiques de l'utérus (I).

Les lames ont été mises en autoradiographie durant 21 jours.

Le grossissement de la colonne I est défini par la barre en I-1 qui représente 350 µm. Le grossissement des colonnes II et III est défini par la barre en III-4 qui représente 160 µm.

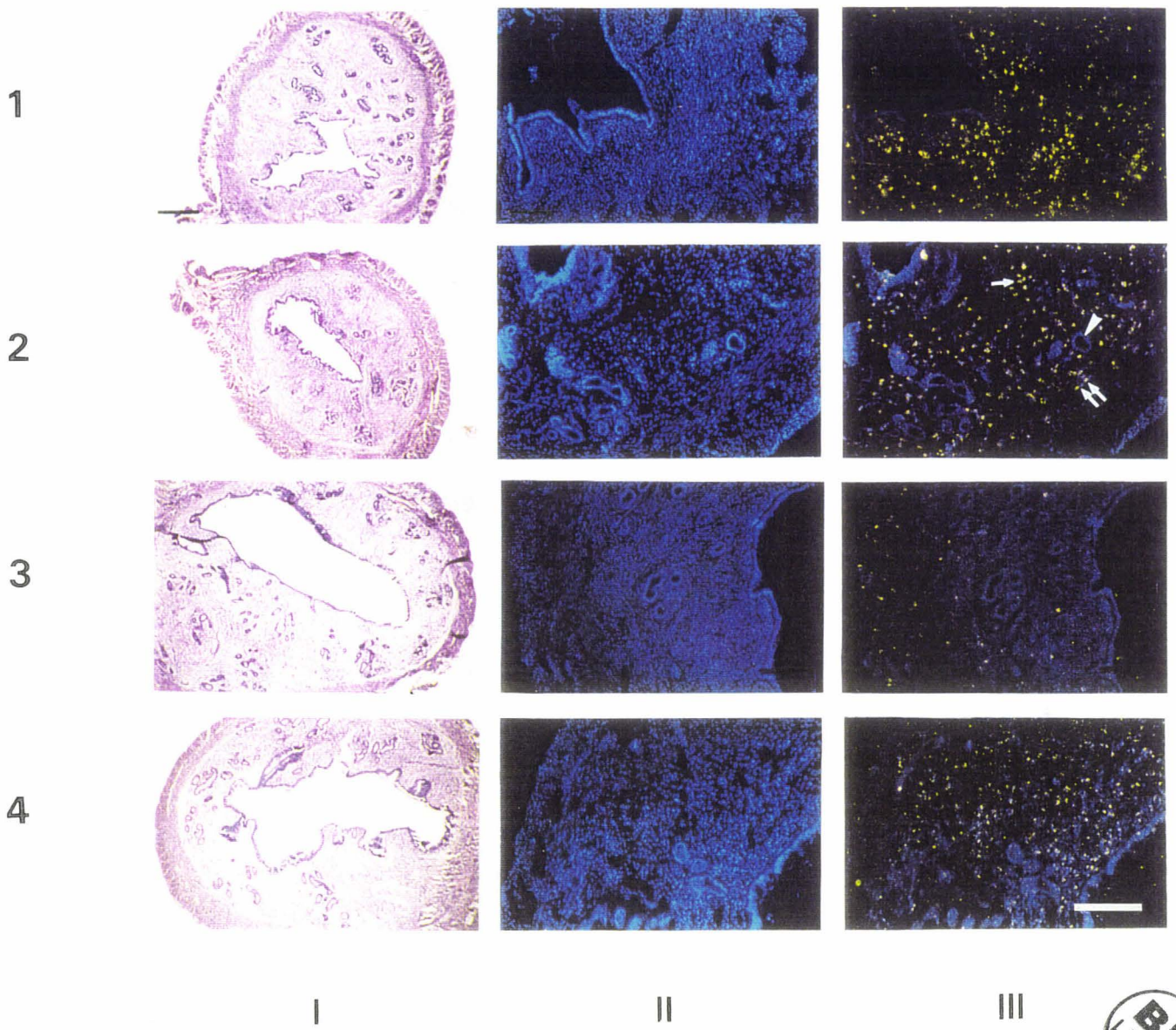


Fig.13



cours de l'œstrus et du metœstrus. Il apparaît évident que les variations cycliques de l'expression du gène accompagnent les bouleversements morphologiques et physiologiques de l'organe. Ces modulations confortent donc notre hypothèse d'une régulation du gène *H19* par des stéroïdes.

Afin de déterminer le rôle de stéroïdes, connus pour réguler le cycle œstrien, sur l'expression du gène *H19*, nous avons entrepris une étude mettant en œuvre des hormones agissant en mode systémique chez des animaux ovariectomisés et surrénalectomisés. Le 17- $\beta$ -œstradiol, la progestérone et la corticostérone ont été injectés soit seuls, soit en association de deux ou trois molécules. Ce type d'expériences, habituellement utilisé pour déterminer le rôle des hormones au cours du développement de certains organes, devait aussi nous permettre de mettre en évidence leur contrôle sur l'expression du gène étudié.

Dans la glande mammaire, quel que soit le stéroïde ou l'association de stéroïdes injectés, aucune différence anatomique n'est perceptible et l'expression du gène *H19* reste très faible, voire absente. En revanche, les différents traitements ont modifié de façon évidente la morphologie de l'utérus (Figures 14 et 15 ; Tableau 5). Chez les animaux pseudo-opérés, le patron d'expression du gène est semblable à celui qui est observé chez les animaux non opérés en cycle ; les variations d'intensité du signal pouvant être attribuées à la phase du cycle où se trouvait l'animal au moment du sacrifice. Les doubles ablations, suivies du traitement par le solvant seul, ont pour conséquence l'inhibition totale de l'expression du gène *H19* ; ce qui indique que les hormones ovariennes et/ou surrénales sont nécessaires au maintien de l'expression normale du gène dans l'utérus. Son expression est recouverte après un traitement par la corticostérone ou par le 17- $\beta$ -œstradiol, mais non après injection de progestérone. Cette hormone, combinée à la corticostérone ou au 17- $\beta$ -œstradiol, inhibe l'action positive de ces deux dernières (Figure 15). En parallèle, le développement de l'utérus des souris traitées par la corticostérone et/ou l'œstradiol est conséquent, alors que celui des souris traitées par la progestérone

**Figure 14:** Effets des traitements hormonaux sur la morphologie de l'utérus.

A: utérus de souris pseudo-opérées. Utérus de souris ovariectomisées et surrenalectomisées puis ayant subies divers traitements: solvant (B), 17- $\beta$ -œstradiol (C), progestérone (D), corticostérone (E), 17- $\beta$ -œstradiol et progestérone (F), 17- $\beta$ -œstradiol, corticostérone et progestérone (G). Voir commentaires sous le tableau 5.

L'échelle supérieure représente 2 cm.

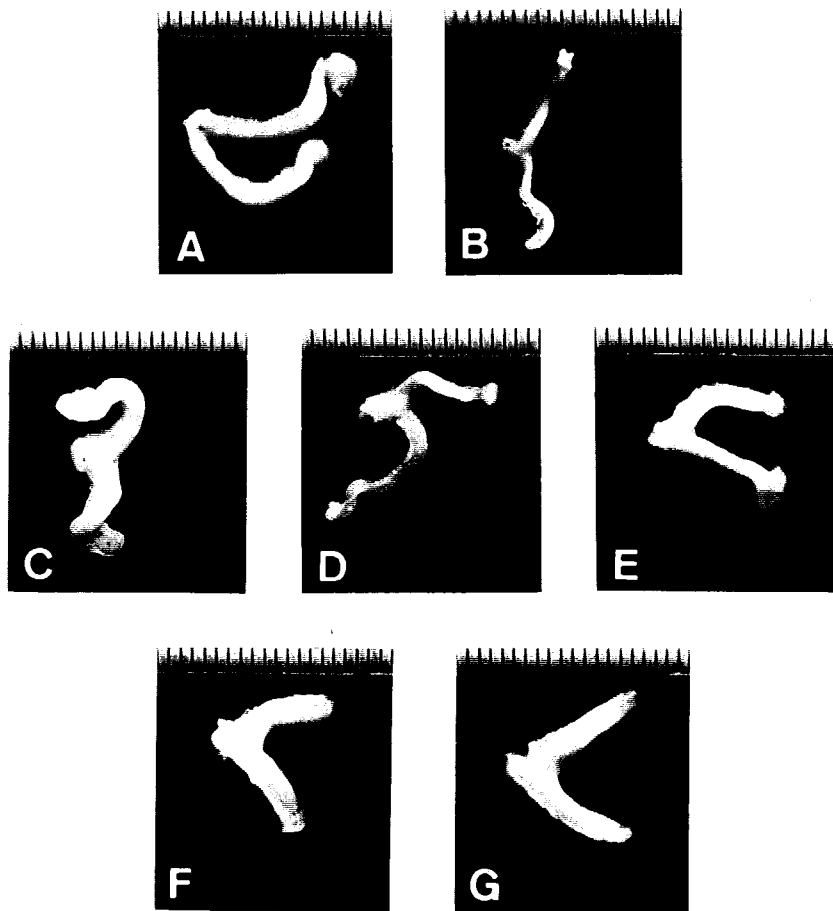


Fig.14



**Figure 15:** Effets des traitements hormonaux sur l'expression du gène *H19* dans l'utérus.

I: coloration histologique (HES)

II: Hoechst

III: Hybridation moléculaire *in situ* avec une sonde *H19* antisens

Utérus de souris ovariectomisées et surrénalectomisées ayant subies divers traitements: solvant (1), corticostérone (2), 17- $\beta$ -œstradiol (3), progestérone (4), 17- $\beta$ -œstradiol et progestérone (5), 17- $\beta$ -œstradiol, corticostérone et progestérone (6).

Après l'opération, l'expression du gène *H19* est inhibée (comparer avec la figure 12 ligne 1). Le 17- $\beta$ -œstradiol et dans une moindre mesure la corticostérone restaurent cette expression dans le stroma et le myomètre. Injectée seule la progestérone n'a aucun effet sur l'expression du gène, et injectée en combinaison avec l'œstradiol et la corticostérone elle inhibe l'action positive de ces dernières.

Les lames ont été exposées durant 21 jours en autoradiographie.

Le grossissement de la colonne I est défini par la barre en I-1 qui représente 350  $\mu\text{m}$ . Le grossissement des colonnes II et III est défini par la barre en II-1 qui représente 160  $\mu\text{m}$ .



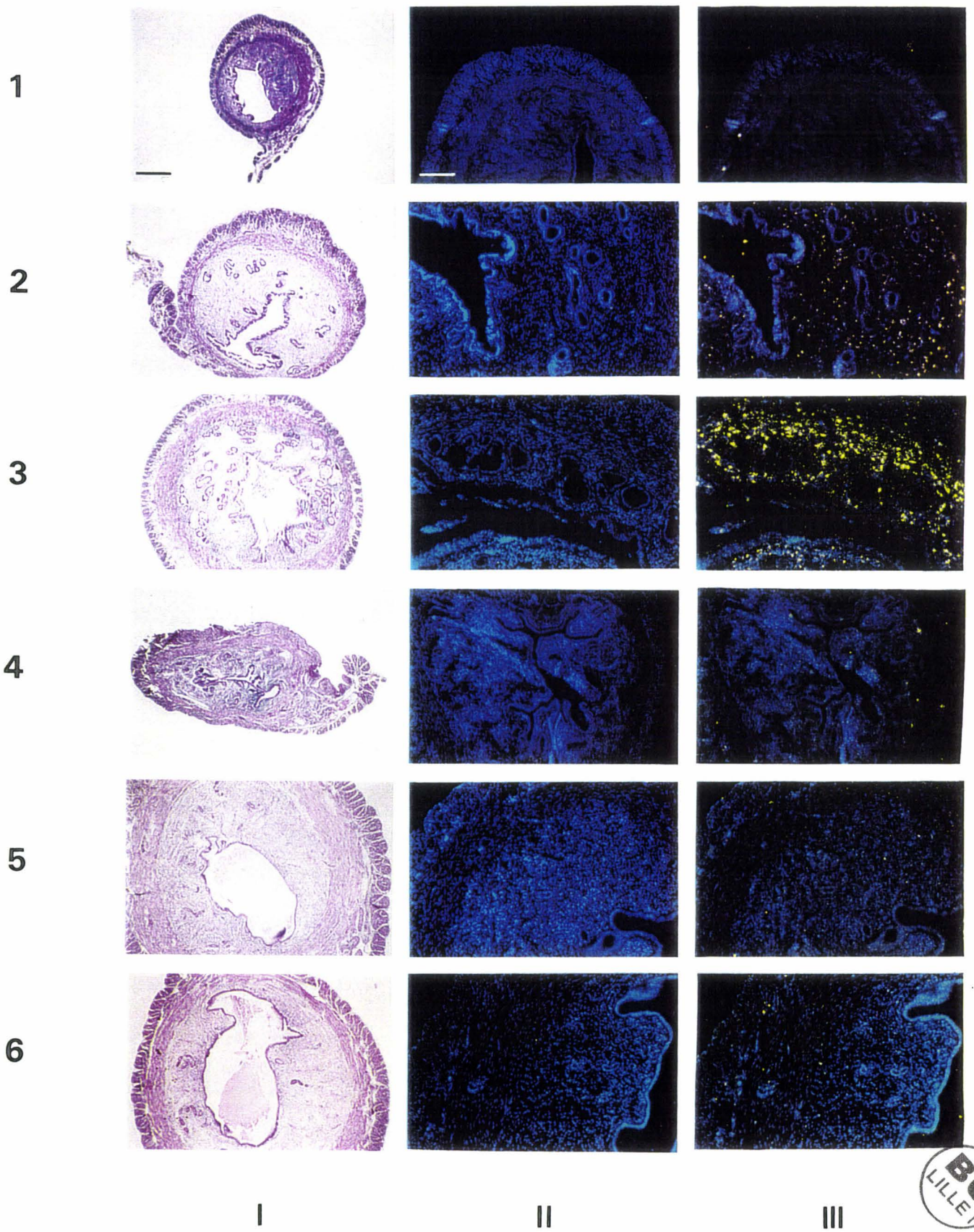


Fig.15





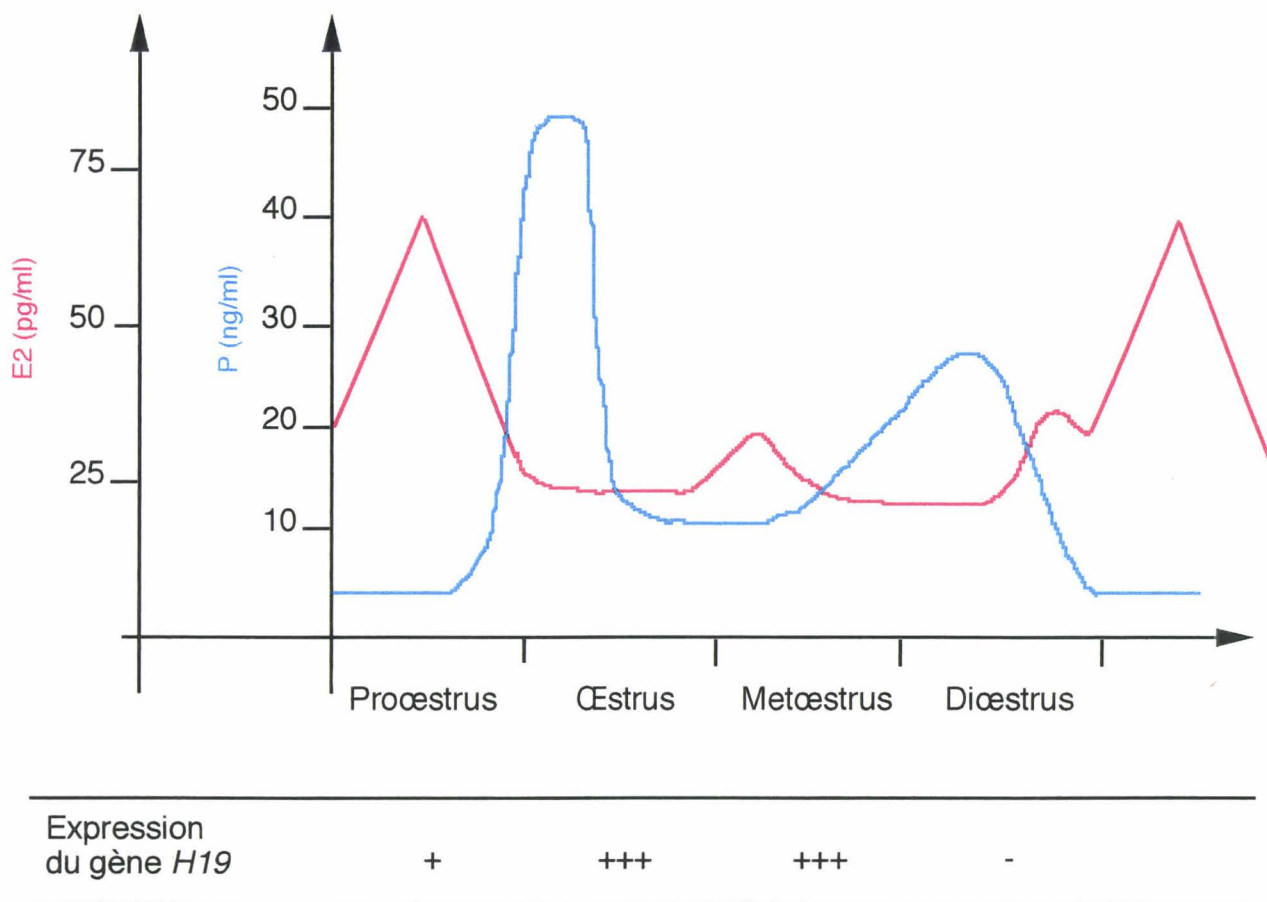
	Traitements	Poids des utérus (mg)
Pseudo-opérées	Solvant	66 ± 1
Ovariectomisées et Surrénalectomisées	Solvant	20.5 ± 0.5
	Corticostérone (B)	65.6 ± 14.2
	Progestérone (P)	41.3 ± 3.05
	Œstradiol (E2)	92 ± 12.7
	E2 + P	71.6 ± 13.3
	E2 + P + B	72.6 ± 12.05

**Tableau 5 :** Poids des utérus des souris opérées ou non, en fonction des traitements administrés.

La déplétion hormonale due à l'opération conduit à une atrophie de l'utérus. Après traitements par la corticostérone, par E2 et P, et par E2, P et B, les utérus retrouvent un poids normal. Le traitement par P conduit à un poids inférieur au poids normal, alors que le 17- $\beta$ -œstradiol entraîne une forte augmentation de poids.

reste très modeste. De plus, on note que la stimulation œstrogénique s'accompagne d'une augmentation du marquage *H19*, mais que ce dernier reste limité à certaines cellules ; cette stimulation ne semble donc pas induire le recrutement de nouvelles cellules exprimant fortement le gène. *H19* pourrait être ainsi utilisé comme un marqueur de cellules hormono-sensibles dans le stroma utérin.

Il apparaît donc que l'action systémique du 17- $\beta$ -œstradiol, comme celle de la corticostérone correspondent à des régulations positives de *H19*, tandis que celle de la progestérone se manifeste par une régulation négative du gène. Il ressort également de notre étude que le traitement hormonal ne semble influencer la synthèse des ARN *H19* que s'il s'accompagne de changements morphologiques et donc physiologiques importants, changements qui peuvent être considérés comme un véritable " remodelage " de l'organe. Enfin, les résultats obtenus chez les animaux opérés nous permettent de proposer une explication aux données recueillies chez les souris en cycle. En effet, les variations observées sont probablement le résultat des actions antagonistes de la progestérone et du 17- $\beta$ -œstradiol. Il convient de noter qu'au cours du dioestrus, la synthèse des ARN *H19* est la plus faible, et que ce stade est précédé de l'action de la progestérone, alors que les taux élevés de l'expression du gène *H19* au cours de l'œstrus et du metœstrus suivent le pic de 17- $\beta$ -œstradiol (Figure 16). Pour tenter de corréler l'expression du gène *H19* à la prolifération cellulaire, nous avons recherché, par immunocytochimie, la présence de la protéine Ki-67, un marqueur des cellules en cycle, dans l'utérus des souris en cycle ou opérées. Aucune corrélation n'a pu être établie ; il semble donc que l'expression du gène *H19* ne puisse être facilement reliée à un phénomène de prolifération.



**Figure 16** : Superposition de l'expression du gène *H19* et du taux d'hormones circulantes (progestérone : P et 17- $\beta$ -œstradiol : E2) au cours du cycle œstrien murin.

L'expression du gène *H19* est évaluée d'après les différentes expériences d'hybridation moléculaire *in situ* réalisées : - peu ou pas d'expression, + faible expression, +++ forte expression.

Les courbes d'hormones circulantes ont été réalisées d'après Driancourt *et al.*, 1991.

## Quatrième chapitre

### Modulations *in vitro* du gène *H19*.

Les études précédentes nous ont permis d'obtenir des résultats intéressants sur les modulations de l'expression du gène *H19*, mais dont la causalité est difficile à appréhender, car ces informations concernent des organes *in situ* en situations normales (genèse et remodelage de la glande mammaire chez des souris témoins), pseudo-normales (maintien des structures de l'utérus chez des souris opérées et traitées par des hormones) ou pathologiques (adénocarcinomes). En conséquence, nous avons choisi de poursuivre notre projet par des essais de "modélisation" de notre approche en utilisant des cellules en culture.

Nous avons d'abord tenté de définir le statut d'expression du gène *H19* dans différentes lignées épithéliales mammaires (MCF-7, MDA-MB-231, HBL-100) et dans des cellules normales (CEMN). Il nous est apparu que la détection des ARN *H19* par la technique de Northern-blot était délicate. En effet, lors d'expériences menées selon des protocoles strictement identiques à notre mesure, la présence du signal *H19* n'a pas été repérée de façon constante. En revanche, par HIS, il nous a été possible de toujours mettre en évidence une expression, plutôt faible, du gène *H19* dans les différents types cellulaires considérés. Par ailleurs, par hybridation moléculaire sur les chromosomes de l'un des types de cellules utilisés (MDA-MB-231) plusieurs signaux indiquent que la région chromosomique contenant *H19* n'était pas délétée, mais au contraire amplifiée (6 exemplaires d'une séquence reconnue par la sonde *H19*, Figure 17). Ces résultats rendent compte d'une part de la plus grande sensibilité de l'HIS par rapport au Northern-blot, et d'autre part du strict contrôle du gène *H19* dans ces cellules, l'absence d'un message *H19*

**Figure 17:** Hybridation moléculaire *in situ* sur chromosome.

A : hybridation sur les chromosomes métaphasiques d'un lymphocyte humain (témoin)

B : « painting » du chromosome 11 des MDA-MB-231

C : hybridation sur les chromosomes métaphasiques de MDA-MB-231

Une séquence génomique de 15 kpb contenant *H19* a été hybridée sur des cellules bloquées en métaphase. En A, localisation du gène *H19* en position télomérique sur le chromosome 11 (têtes de flèche). En B, le « painting » permet d'observer le nombre de chromosome 11 et les translocations possibles (têtes de flèche). En C, l'HIS montre une augmentation du nombre de séquences *H19* dans le génome des cellules MDA-MB-231 (têtes de flèche) due à l'aneuploïdie de ces cellules (cellules et sonde moléculaire fournies à F. Apiou qui a réalisée l'hybridation, Institut Curie, Paris).

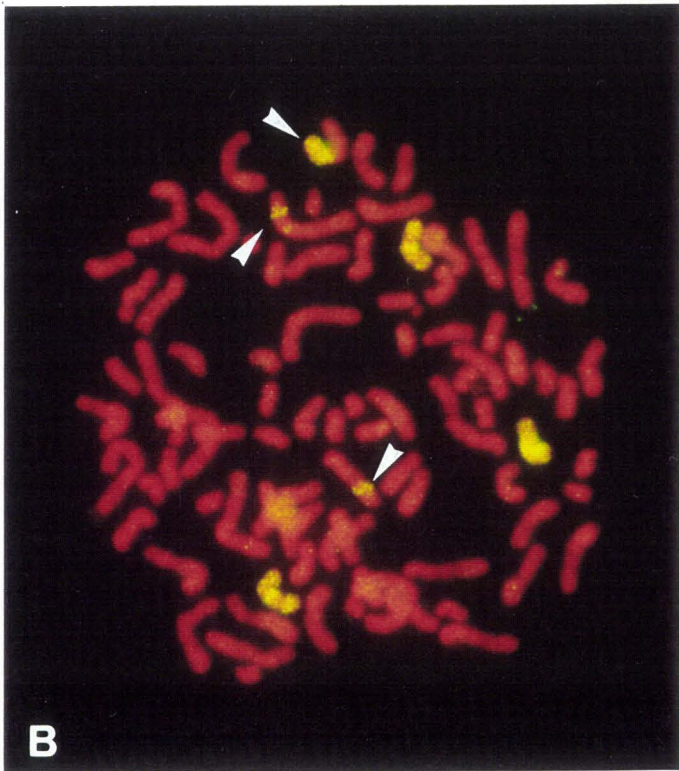


Fig.17

au niveau d'un Northern-blot ne signifiant pas nécessairement une homozygotie *H19* nul. Nous avons donc tenté de déterminer des conditions de culture ou de caractériser des molécules pouvant modifier l'expression du gène *H19* dans ces cellules.

Nous avons d'abord éprouvé les conditions de culture en trois dimensions en gel de collagène. Il s'agit de la reproduction *in vitro* de conditions proches de celles qui existent *in vivo*. Dans ces cultures, nous avons observé par HIS une surexpression du gène *H19* dans tous les types cellulaires étudiés (Figure 18). Ce mode de culture permet d'induire dans certaines conditions envisagées ci-après une tubulogenèse ou un essaimage. En effet, des cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) cultivées en trois dimensions et stimulées par un milieu conditionné par des fibroblastes (MRC-5) forment des tubules. De même, des cellules cancéreuses invasives, comme les MDA-MB-231, stimulées par le même milieu se dispersent et envahissent le gel. Nous pouvons donc reproduire *in vitro* des phénomènes complexes tels que la tubulogenèse ou l'essaimage (ce dernier évoquant des métastases). Nous venons d'indiquer que la simple culture en bicouche de collagène induit une activation de *H19*. Mais nous avons également observé que l'addition d'un milieu conditionné par des fibroblastes aux cultures précédentes se traduit par une augmentation de l'activation déjà constatée (Figure 19). L'ensemble de ces données nous semble d'importance, car il suggère que l'expression de *H19* peut être modulée par de "simples" conditions mécaniques, mais aussi qu'une activation supplémentaire du gène est obtenue par un milieu enrichi en médiateurs libérés par des fibroblastes. Ceci indique donc que le gène étudié peut être mis en cause dans le dialogue cellules mésenchymateuses/cellules épithéliales, avec ici des éléments en faveur d'une production de facteurs paracrines par les cellules mésenchymateuses et une sensibilité à ces facteurs du gène des cellules épithéliales.

Nous avons poursuivi notre stratégie en considérant des expériences susceptibles de circonscrire les causes de la surexpression du gène. C'est pourquoi nous avons cultivé en deux dimensions les différentes souches de cellules épithéliales mammaires sur divers

**Figure 18:** Influence de la matrice extracellulaire sur l'expression du gène *H19*.

A, C, E, G: culture en deux dimensions. B, D, F, H: culture dite en trois dimensions.

A, B: CEMN. C, D: HBL-100. E, F: MCF-7. G, H: MDA-MB-231.

La culture tridimensionnelle dans une matrice de collagène induit une surexpression du gène *H19* pour les quatre types de cellules (B, D, F, H). La culture bidimensionnelle sert de témoins respectifs (A, C, E, G). Le marquage se focalise sur les noyaux (têtes de flèches).

L'autoradiographie a duré 28 jours.

La barre représente 70  $\mu\text{m}$ .



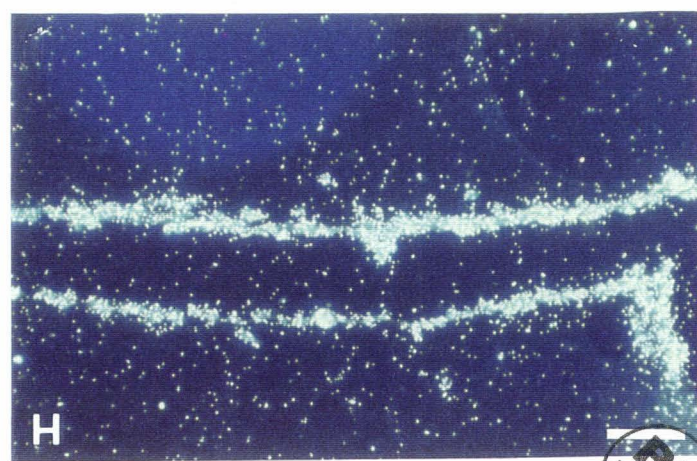
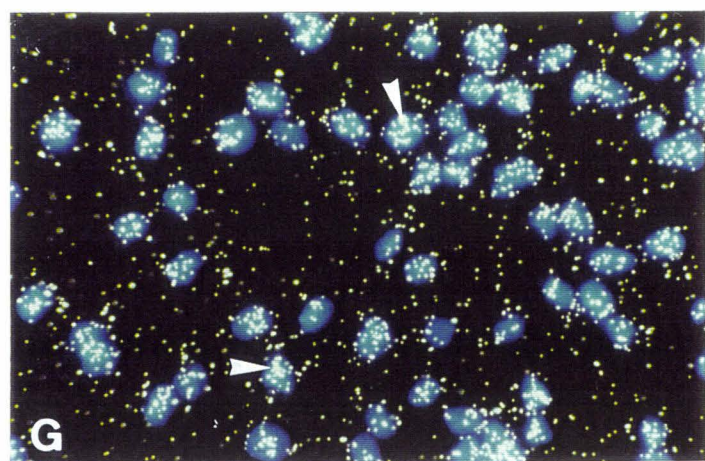
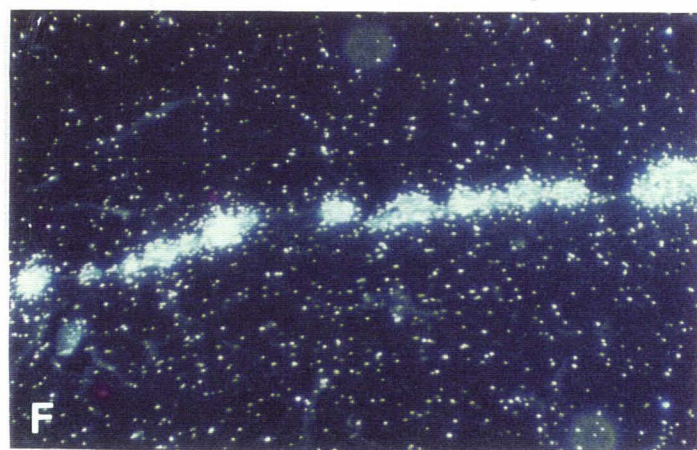
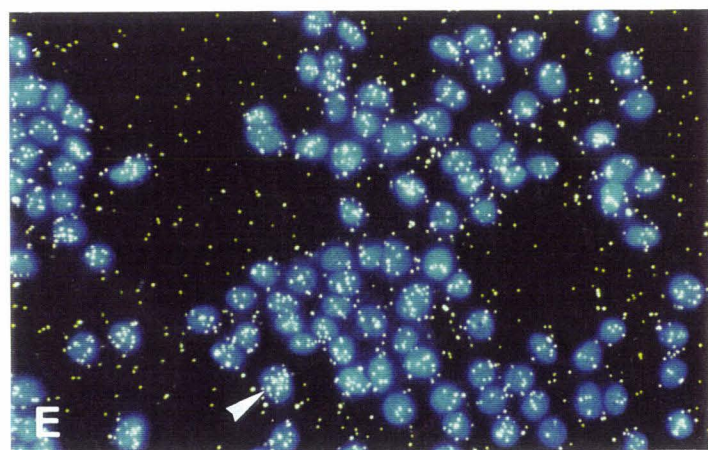
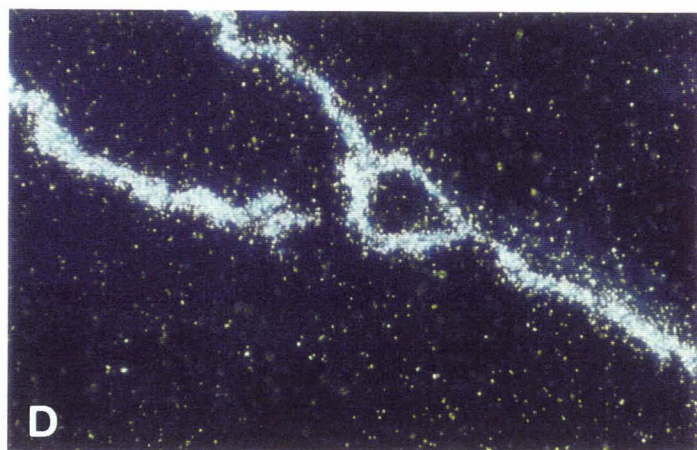
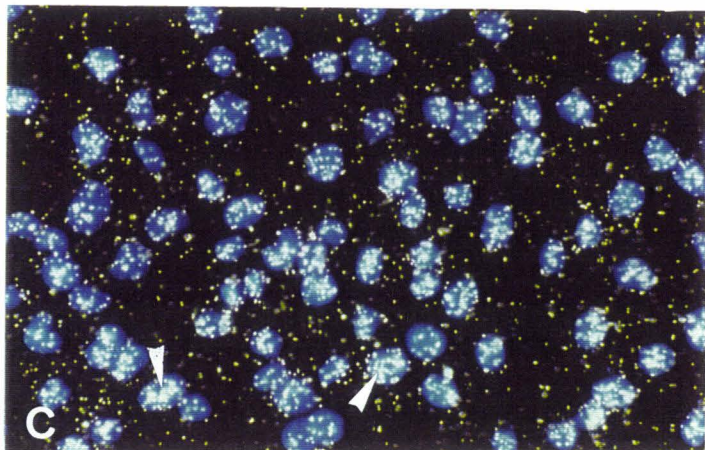
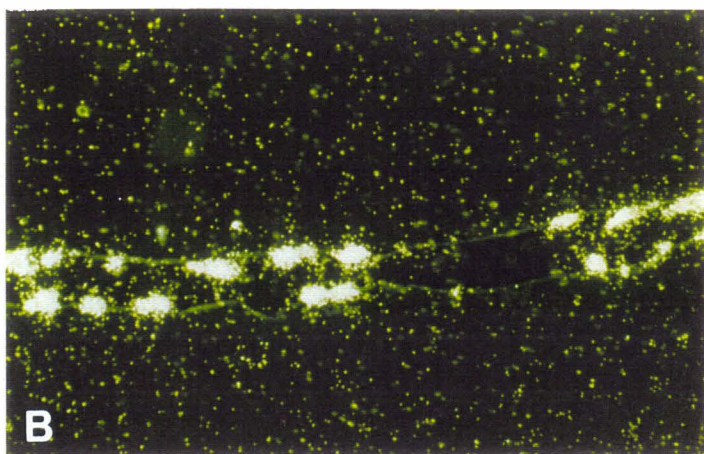


Fig.18



**Figure 19:** Action du milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5 sur l'expression du gène *H19*.

A, D: cultures bidimensionnelles. B, E: cultures tridimensionnelles. C, F: cultures en trois dimensions stimulées par du milieu conditionné par les fibroblastes.

A, B, C: HBL-100. D, E, F: MDA-MB-231.

La surexpression observée lors de la culture en trois dimensions est accentuée par l'action du milieu conditionné. Après stimulation, on observe pour les MDA-MB-231 un essaimage des cellules qui envahissent le gel. On ne note pas de différence de marquage entre les cellules immobiles et les cellules en migration.

Les résultats sont obtenus après 28 jours d'autoradiographie.

La barre représente 70  $\mu\text{m}$ .

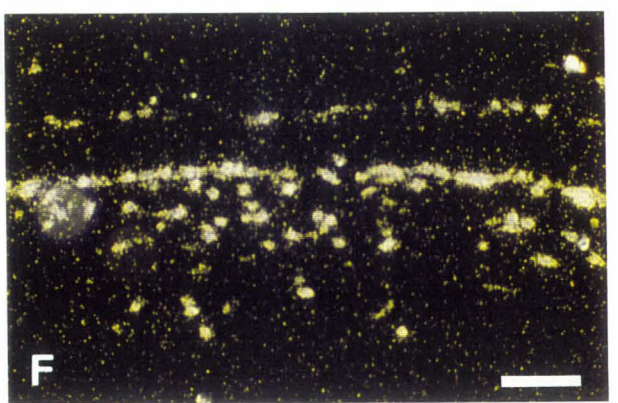
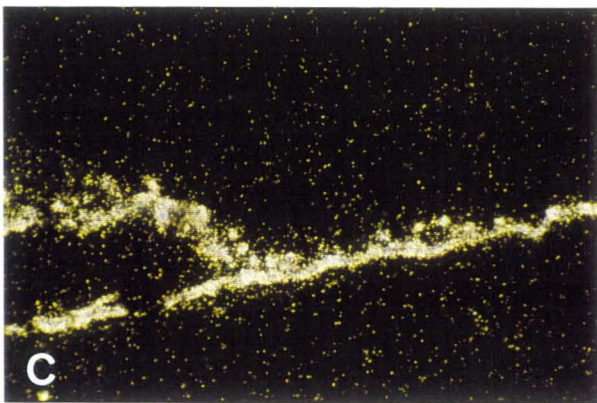
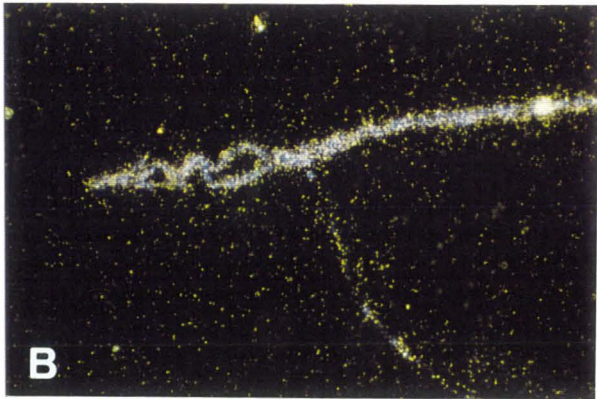
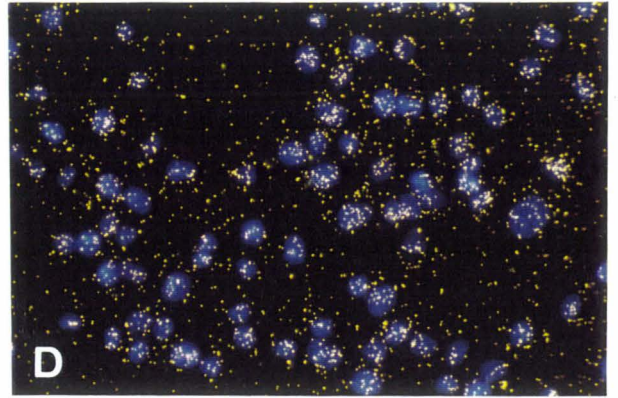
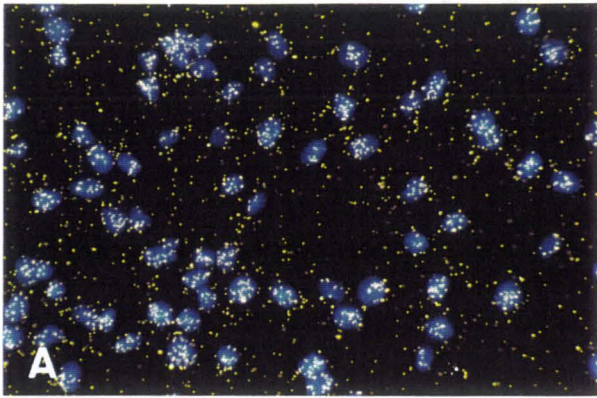


Fig.19

substrats : fibronectine, laminine, collagène, poly-l-lysine, plastique. Aucun de ces substrats ne s'est révélé actif sur l'expression du gène. Ces résultats nous permettent donc de proposer que l'activation du gène *H19* peut avoir pour cause des conditions mécaniques : conformation spatiale et ancrage des cellules au sein d'une bicouche de collagène; mais il reste que le gène est également sensible à des facteurs paracrines libérés par des cellules mésenchymateuses.

Nous avons approfondi notre étude en tentant d'établir si l'expression du gène était corrélée à un état de prolifération des cellules. Dans ce but, nous avons éprouvé différents facteurs connus pour leur rôle sur cette activité. Par exemple, l'addition de sérum de veau fœtal ne modifie pas sensiblement l'expression du gène ; le butyrate de sodium, agent connu pour son action différenciatrice sur les cellules épithéliales mammaires (Dong-LeBourhis *et al.*,1997) semblent également inefficace sur *H19*. En revanche, le TGF $\beta$ 1 inhibe fortement la synthèse des ARN *H19* dans les trois souches cancéreuses étudiées, mais semble sans effet sur les cellules normales (CEMN) (Figure 20, Tableau 6).

Enfin, les résultats d'expériences menées chez la souris ont suggéré que les hormones stéroïdes pouvaient aussi réguler le gène *H19*. Par Northern-blot nous avons détecté les modulations de l'expression du gène *H19* en fonction de l'addition d'hormones au milieu de culture (Figure 21). En condition standard, les MCF-7 (cellules épithéliales mammaires hormono-dépendantes) expriment faiblement le gène *H19*. Ce signal est atténué lors d'une culture en milieu dépourvu de sérum. Le 17- $\beta$ -œstradiol provoque une surexpression du gène *H19*, mais le tamoxifène (un antiœstrogène) diminue l'induction résultant de l'action du 17- $\beta$ -œstradiol. D'autres hormones, telles que la dexaméthasone (un stéroïde de synthèse) induisent une activation du gène dans d'autres modèles cellulaires (cellules HeLa) (Figure 22).

**Figure 20:** Expression du gène *H19* dans les cellules épithéliales mammaires.

A, C, E, G: cellules en prolifération. B, D, F, H: cellules traitées par le TGF $\beta$ 1 (3ng/ml).

A, B: CEMN. C, D: HBL-100. E, F: MCF-7. G, H: MDA-MB-231.

Le TGF $\beta$ 1 a très peu ou pas d'effet sur l'expression du gène *H19* dans les cellules normales (A, B), mais inhibe fortement la transcription de ce gène dans les cellules cancéreuses, excepté dans les MCF-7 (C à H). Le marquage se concentre essentiellement sur les noyaux (têtes de flèches). Les résultats sont obtenus après 28 jours d'autoradiographie.

La barre représente 70  $\mu$ m.



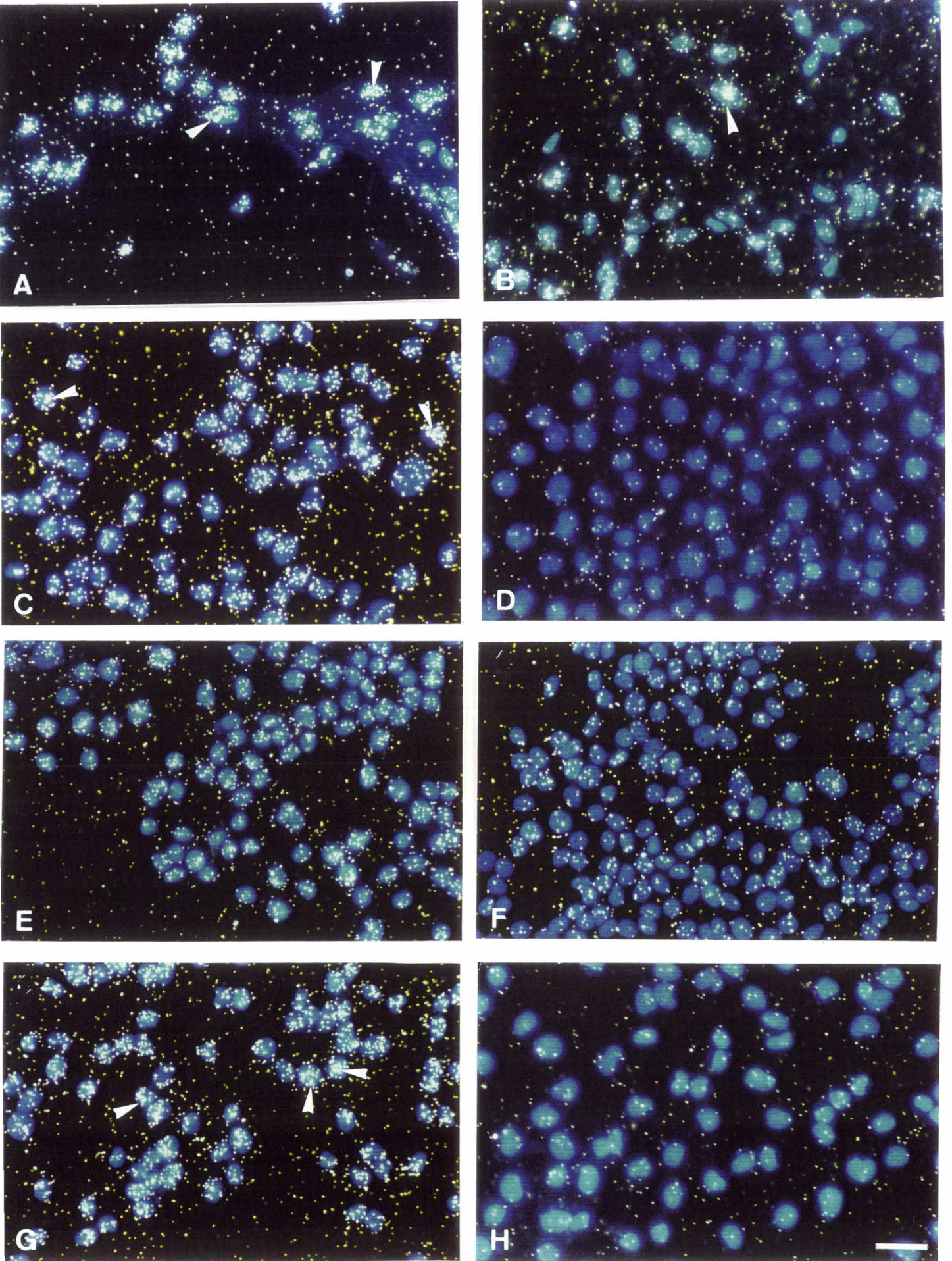
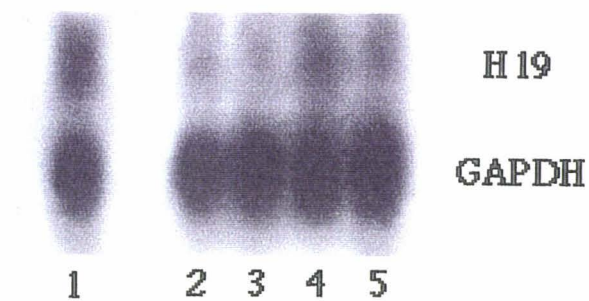


Fig.20



	CEMN	HBL100	MCF7	MDA-MB231
<b>PROLIFERATION</b>	++	+++	+	+++
<b>SEVRAGE</b>	++	+++	+	++
<b>NaB (2mM)</b>	++	?	+	++
<b>NaB (3mM)</b>	++	?	+	++
<b>TGFβ1 (2ng/ml)</b>	++	-	-	+
<b>TGFβ1 (3ng/ml)</b>	++	-	-	-

**Tableau 6 : Evaluation semi-quantitative de l'expression du gène *H19*, déterminée par HIS, dans les cellules normales (CEMN) ou cancéreuses (HBL-100, MCF-7, MDA-MB-231).** Ce tableau résume nos observations et on peut en déduire: 1°) Le marquage n'est pas identique pour les quatre types de cellules en prolifération et il est impossible de corréler l'expression de *H19* à l'agressivité des cellules; ces premiers résultats servent de référence pour les suivants. 2°) La transcription du gène *H19* dans les cellules normales, traitées ou non, ne varie pas et se différencie de celle qui est observée dans les cellules cancéreuses; les réponses de ces dernières ne sont cependant pas homogènes. 3°) La synthèse des ARNm *H19* est inhibée par le TGFβ1 dans ces cellules. 4°) Ni le sevrage, ni le traitement au NAB n'affectent l'expression du gène *H19*.



**Figure 21:** Analyse en Northern-blot de l'expression du gène *H19* dans des cellules MCF-7 après traitement hormonal.

1) ARN de cellules HeLa: témoin positif

ARN de cellules MCF-7 cultivées:

2) en milieu complet

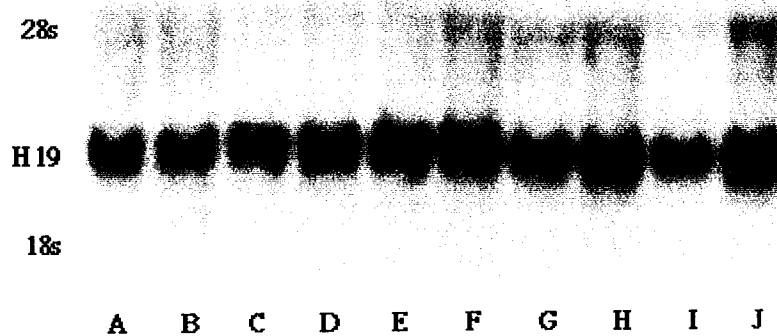
3) milieu dépourvu de sérum

4) milieu dépourvu de sérum additionné de 17- $\beta$ -œstradiol ( $10^{-8}$  M)

5) milieu précédent additionné de tamoxifène ( $10^{-6}$  M)

Le 17- $\beta$ -œstradiol induit une augmentation de l'expression du gène *H19*. Cette stimulation est atténuée en présence d'un antiœstrogène (tamoxifène).





**Figure 22:** Action de la dexaméthasone (corticoïde de synthèse) sur l'expression du gène *H19* dans les cellules HeLa.

ARN de cellules cultivées en:

A: milieu complet

B: milieu dépourvu d'hormones (passage sur charbon actif, milieu dit « strippé »)

C et D: milieu strippé (C), additionné de dexaméthasone (D) pendant 3h

E et F: milieu strippé (E), additionné de dexaméthasone (F) pendant 6h

G et H: milieu strippé (G), additionné de dexaméthasone (H) pendant 12h

I et J: milieu strippé (I), additionné de dexaméthasone (J) pendant 24h

La dexaméthasone induit une surexpression du gène *H19* sensible à partir 12h de traitement.

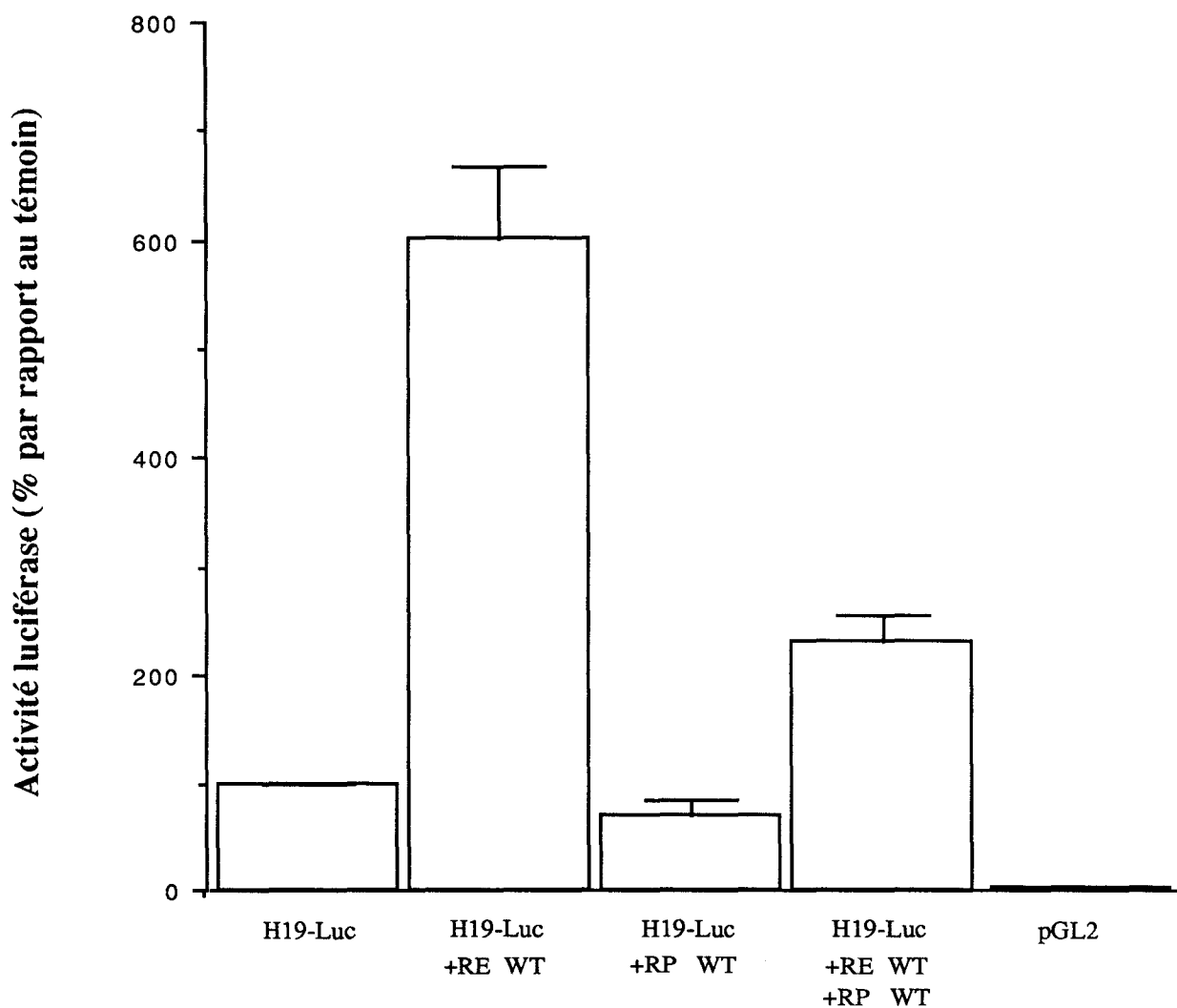
## Cinquième chapitre

### Régulation du promoteur du gène *H19*.

Afin de préciser l'action des hormones stéroïdes sur l'expression du gène *H19*, nous avons tester l'influence de récepteurs nucléaires sur le promoteur naturel du gène.

Dans ce but, nous avons co-transfecté des cellules MCF-7 avec différents construits de récepteurs nucléaires (sauvages ou mutants) et un vecteur contenant le promoteur minimal (823 pb) du gène *H19* couplé à un gène rapporteur, celui de la *luciférase*. En milieu normal, on constate que le récepteur sauvage du 17- $\beta$ -œstradiol (RE) stimule le promoteur de *H19*, alors que celui de la progestérone (RP) le contrôle négativement. Une triple transfection (RE + RP + *H19-luciférase*) se traduit par un résultat intermédiaire entre les deux précédents (Figure 23)

Nous avons poursuivi notre étude en transfectant différents mutants de RE dans les MCF-7. Ces expériences ont été menées en présence ou en absence de ligand spécifique. En absence de 17- $\beta$ -œstradiol, RE sauvage active le promoteur de *H19*. De même deux mutants de RE (ER S554fs et ER L540Q) manifestent un contrôle positif sur ce promoteur, mais leur action varie en fonction de la mutation qui se trouve dans la partie E du récepteur. Il faut noter que ces deux mutants sont moins puissants que la version sauvage de RE (Figure 24). Le troisième mutant testé, ER1-530, donne un résultat semblable au témoin et est donc inefficace sur le promoteur *H19*. Les trois mutants mis en œuvre dans ces expériences ne se comportent pas comme des trans-dominants négatifs et ces résultats ne sont pas en accord avec ce qui a été décrit à leur propos. Nous avons renouvelé les expériences précédentes en ajoutant du 17- $\beta$ -œstradiol au milieu de culture. La présence du ligand spécifique s'est traduite par une activation du promoteur *H19* par



**Figure 23** : Activité luciférase mesurée après co-transfection du gène rapporteur sous contrôle du promoteur *H19* et des récepteurs du 17- $\beta$ -œstradiol et de la progestérone dans les cellules MCF-7.

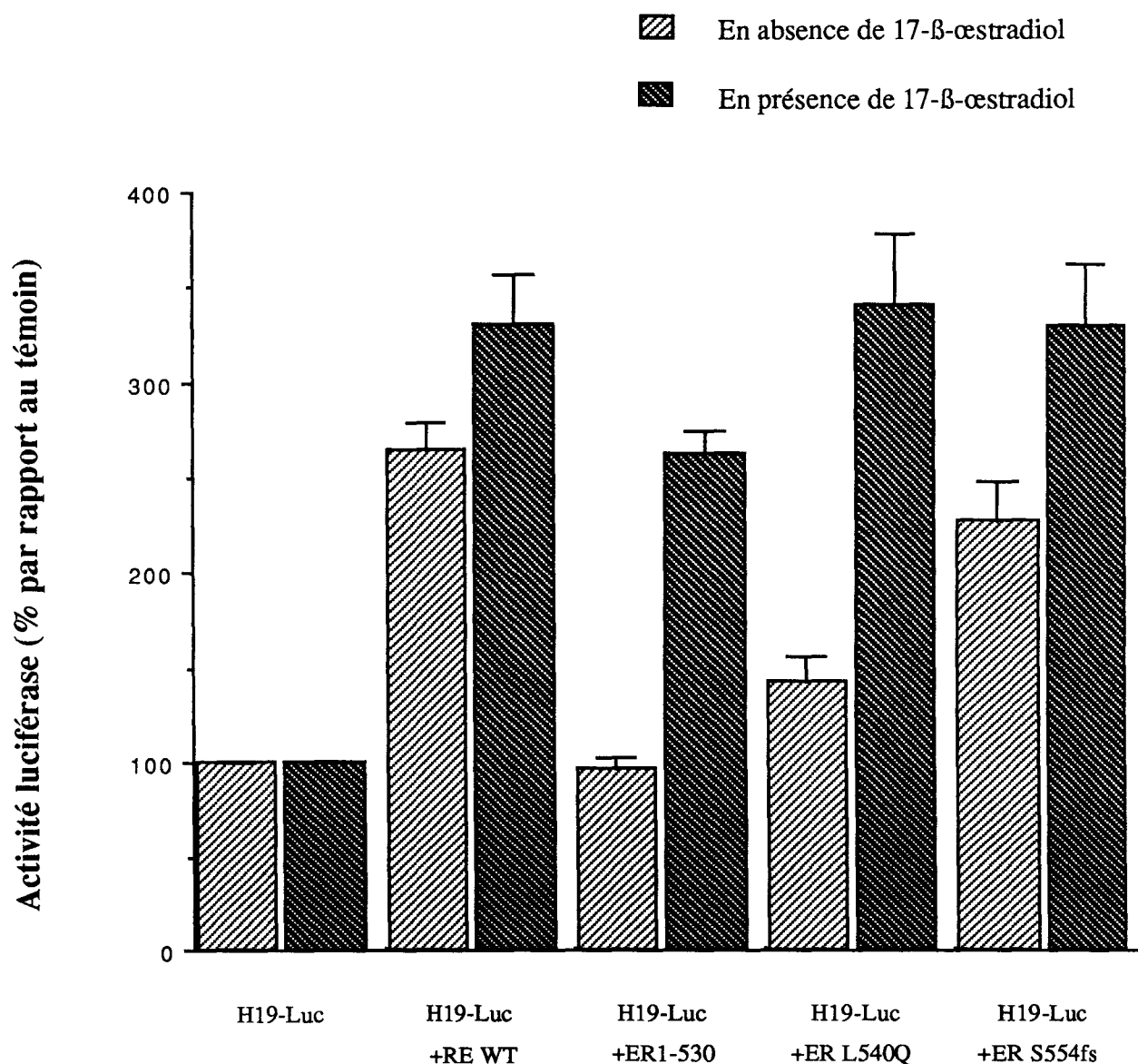
H19-Luc : promoteur du gène *H19* couplé au gène de la *luciférase*

RE WT : récepteur sauvage du 17- $\beta$ -œstradiol

RP WT : récepteur sauvage de la progestérone

pGL2 : vecteur vide

L'activité luciférase est fortement augmentée après transfection du récepteur des œstrogènes. Le récepteur de la progestérone seul diminue légèrement cette activité, mais en combinaison avec RE, il inhibe fortement l'augmentation induite par ce dernier.



**Figure 24 :** Activité luciférase mesurée après co-transfection du gène rapporteur sous contrôle du promoteur *H19* et de différentes formes (sauvage ou mutées) de récepteur du 17-β-œstradiol dans les cellules MCF-7.

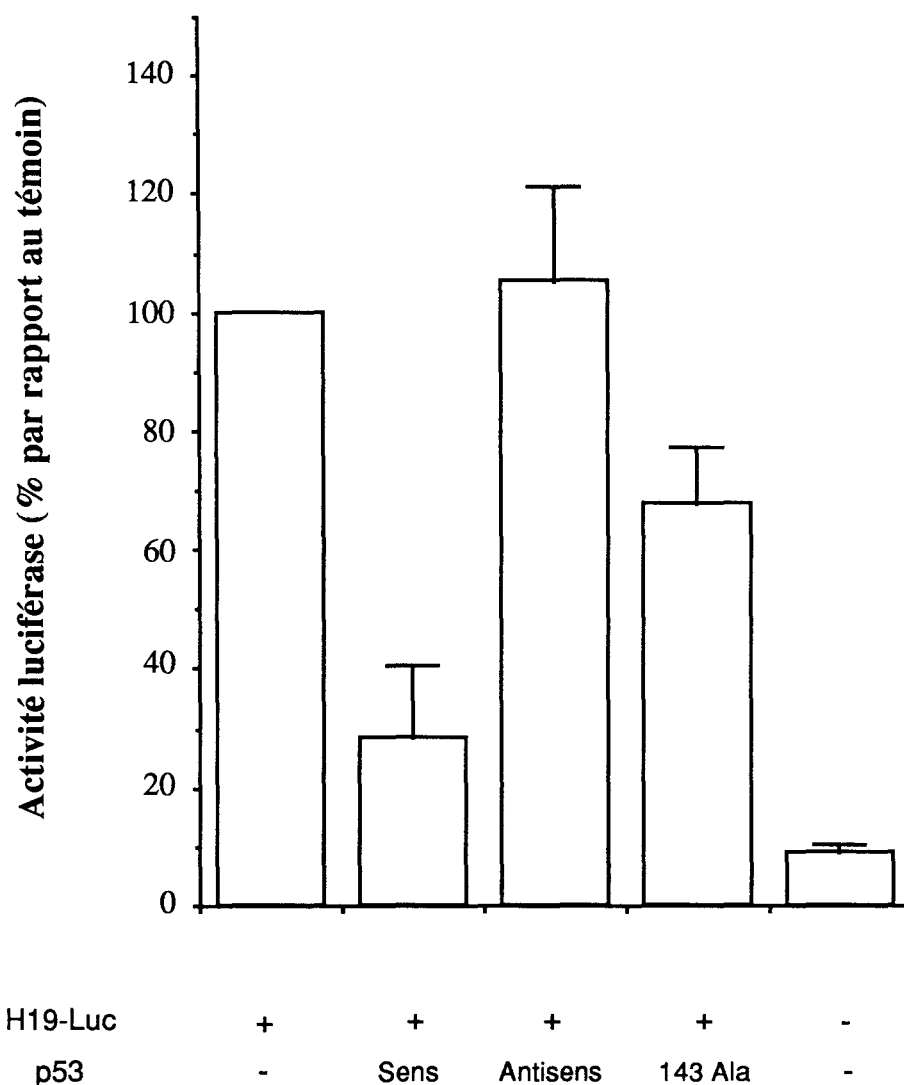
H19-Luc : promoteur du gène *H19* couplé au gène de la *luciférase*  
 RE WT : récepteur sauvage du 17-β-œstradiol  
 ER1-530 : récepteur muté (tronqué après l'acide aminé 530)  
 ER L540Q : récepteur muté (remplacement de la Leucine 540 par une Glutamine)  
 ER S554fs : récepteur muté (déplacement du cadre de lecture au niveau de l'acide aminé 554)  
 pGL2 : vecteur vide

En absence d'hormones, le récepteur aux œstrogènes augmente fortement l'activité de la luciférase. Les mutants n'ont pas d'action (ER1-530) ou une action intermédiaire (ER L540Q et S554fs). En présence d'hormones, tous les construits induisent des activations semblables du promoteur de *H19*.

RE sauvage, mais aussi par les trois versions mutantes de RE. Ces résultats ne sont pas aisés à comprendre et nous suggérerons des interprétations du phénomène dans la discussion de ce mémoire.

L'ensemble des résultats, obtenus après transfection du promoteur naturel de *H19* et différents récepteurs nucléaires, est en accord avec les résultats des chapitres précédents qui indiquaient le rôle des hormones stéroïdes : le 17- $\beta$ -œstradiol et son récepteur activent le gène *H19*, alors que le récepteur de la progestérone l'inhibe faiblement ; en revanche *in vivo*, la progestérone abolit la régulation positive du 17- $\beta$ -œstradiol. Les mutants de RE, utilisés en présence ou en absence d'hormones suggèrent que *H19* peut être transactivé de manière ligand-indépendante.

Parallèlement à cette étude de l'action des stéroïdes sur le promoteur naturel de *H19*, nous avons collaboré activement au sein de notre équipe à l'obtention de résultats indiquant que la protéine p53 module l'activité du gène *H19*. Le gène *p53* code une protéine qui contrôle le cycle cellulaire et la mort cellulaire programmée (apoptose). Des résultats obtenus à partir de cellules HeLa transfectées stablement avec différentes séquences de p53 (sauvages sens ou antisens, ou mutée), indique que p53 régule négativement le gène *H19* (voir Figure 1 article Dugimont *et al.*, 1998, ci-joint). Afin de confirmer cette régulation du gène *H19*, nous avons réalisé des co-transfections transitoires de cellules humaines tumorales de poumon (Calu 6) par des plasmides codant différentes formes de p53 et un gène rapporteur (*luciférase*) sous contrôle du promoteur naturel de *H19*. Les résultats obtenus confirment les précédents, réalisés dans les cellules HeLa (Figure 25). Les cellules Calu 6 sont dépourvues de *p53* endogène. La séquence *p53* antisens n'a aucun effet sur le gène rapporteur ; la séquence sens inhibe environ trois fois l'activité de la luciférase, alors que le mutant thermosensible "ala 143" inhibe légèrement à 37°C l'activité luciférase (inhibition de 0,7 fois).



**Figure 25** : Activité du gène de la *luciférase* sous contrôle du promoteur *H19* après co-transfections de cellules Calu 6 avec différents construits de p53.

H19-Luc : promoteur du gène *H19* couplé au gène de la *luciférase*  
 143 Ala : séquence codante pour une protéine mutante de p53

La protéine p53 sauvage diminue fortement l'activité de la luciférase. Comme il était attendu, l'antisens est sans effet sur ces cellules dépourvues d'endogène. Le mutant inhibe légèrement l'activité luciférase, manifestant ainsi une faible activité de type sauvage.

## DISCUSSION

Les différents travaux effectués au cours de notre stage de doctorat nous ont permis d'appréhender les modulations de l'expression du gène *H19* au cours du développement normal de la glande mammaire, lors de phénomènes néoplasiques dans le sein et dans des cellules épithéliales mammaires (MCF-7) cultivées dans différentes conditions. Enfin, nous avons envisagé la régulation de *H19* par les hormones stéroïdes et par la protéine p53 suppresseur de tumeurs.

Dans un premier temps, nous avons observé l'expression du gène *H19* au cours du développement de la glande mammaire de souris. Comme certains auteurs l'avaient déjà signalé, cette expression pendant la vie fœtale est forte et ubiquitaire (Pachnis *et al.*, 1984 ; Poirier *et al.*, 1991 ; Lustig *et al.*, 1994) ; nous l'avons retrouvée présente à la fois dans le bourgeon mammaire et dans le mésenchyme adjacent. Nos observations confirment la répression néonatale du gène, phénomène également rapporté par les travaux de Pachnis *et al.* (1988) et Zhang et Tycko (1992). Cependant, la synthèse des ARN *H19* dans la glande mammaire est fortement atténuée, mais non complètement abolie ; le maintien d'une expression basale du gène *H19* est l'une des exceptions du patron de synthèse de ces ARN chez l'adulte. Ce faible niveau d'activité persiste jusqu'à la puberté. Lorsque survient la maturation sexuelle, une forte expression du gène *H19* est détectée dans les tubules en croissance et les bourgeons terminaux dont les ramifications envahissent le tissu adipeux. On note que l'expression du gène est la plus élevée aux extrémités des tubules, dans les parties qui pénètrent activement dans le mésenchyme adjacent et où les interactions épithélium/mésenchyme sont prépondérantes. Après la puberté, le niveau d'expression du gène diminue fortement et redevient basal chez la souris mature. Cette faible expression accompagne une période de repos relatif de la glande mammaire. Au cours de la gestation, le développement mammaire est réinitié ; chaque bourgeon terminal se différencie en acinus et ce remodelage s'accompagne à nouveau d'une



très forte expression du gène *H19*. Lors de la lactation, la glande mammaire atteint sa différenciation maximale ; les *acini* s'hypertrophient, synthétisent le lait qui sera expulsé grâce aux cellules myoépithéliales, tandis que les tissus adjacents (fibroblastique et adipeux) involuent. Ces changements morphologiques et physiologiques sont concomitants d'une inhibition de la synthèse des ARN *H19*. Il semble donc que le gène n'intervienne pas dans les phases terminales de la différenciation des cellules mammaires. Après le sevrage des souriceaux, la glande mammaire subit l'involution et recouvre l'état dans lequel elle se trouvait avant la gestation. Ce retour au repos s'accompagne d'une expression du gène *H19* qui revient à un niveau basal. Toutes ces observations indiquent que : 1) l'expression du gène *H19* varie amplement au cours du développement de la glande mammaire ; 2) ces fortes variations concernent essentiellement les cellules épithéliales et la synthèse des ARN *H19* est plutôt constante dans les cellules mésenchymateuses ; 3) l'expression du gène est forte lors de la puberté et de la gestation, lorsque les cellules épithéliales prolifèrent et s'organisent en tubules puis en *acini*, et lorsque les interactions épithélio/mésenchymateuses sont reconnues comme fondamentales, mais elle devient nulle lors de la lactation, qui est la phase ultime de différenciation de la glande mammaire ; au cours des autres phases de la vie de l'animal, l'expression du gène reste faible. Les modulations décrites ci-dessus suggèrent une implication des hormones stéroïdes dans la régulation du gène *H19*.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons suivi l'expression du gène *H19*, au cours du cycle œstrien chez la souris. Nous nous sommes intéressés à deux organes particulièrement sensibles aux hormones ; la glande mammaire et l'utérus, dont le développement cyclique permet la nidation de l'embryon. Dans la glande mammaire, peu de différences morphologiques ont été observées au cours du cycle et le niveau d'expression de *H19* reste toujours faible, sauf lors du métœstrus au cours duquel une légère surexpression a été enregistrée. Il semble donc que les variations hormonales cycliques, relativement faibles par rapport à d'autres phases de

l'activité sexuelle de l'animal (puberté, gestation), affectent peu la synthèse des ARN *H19* dans la glande mammaire. Cependant, il convient de rappeler ici que nous avons observé des variations significatives d'expression du gène *H19*, chez l'Homme, d'un échantillon à un autre de sein sain, variations que nous supposons être dues à l'état d'avancement dans le cycle menstruel au moment du prélèvement. Les différences entre les résultats chez l'humain et chez la souris pourraient être attribuées à la durée du cycle et/ou l'amplitude des variations hormonales. En revanche, dans l'utérus l'action cyclique des hormones se traduit par des variations morphologiques importantes, accompagnées de différences très nettes du niveau de synthèse des ARN *H19*. Lors des quatre stades œstriens, l'expression du gène est détectée dans des groupes de cellules du stroma ou du myomètre, alors que l'épithélium luminal et glandulaire n'est pas marqué. Faible en proœstrus (début de la phase proliférative), l'activité de *H19* augmente en œstrus et en metœstrus, puis redevient très faible lors du dioœstrus (fin de la phase sécrétoire). Ces variations cycliques s'accordent avec notre hypothèse d'une régulation hormonale du gène *H19*. Mais nos observations se rapportant à l'utérus murin sont en désaccord avec certaines données publiées par Ariel *et al.* en 1997. En effet, ces auteurs ont étudié les variations d'expression du gène *H19* dans l'utérus humain au cours du cycle menstruel. Ils ont noté une expression ubiquitaire dans le mésenchyme, mais son absence dans l'épithélium et dans le myomètre. A cette première différence, s'ajoute le fait que ces auteurs ont observé un maximum d'expression du gène lors de la fin de la phase lutéale, lorsque l'utérus est à sa différenciation maximale, tandis que chez la souris, le plus fort marquage est constaté en œstrus et en metœstrus. Ces divergences, entre les résultats obtenus pour l'utérus humain et ceux concernant l'utérus murin, peuvent probablement s'expliquer par les différences importantes entre les cycles chez les deux espèces. Chez la souris, le cycle est court (4 jours) et les variations hormonales ne permettent pas le développement achevé de l'utérus : à la fin du cycle, cet organe n'est pas complètement prêt à recevoir l'embryon. Au contraire

chez la femme, le cycle menstruel est beaucoup plus long (28 jours) et aboutit à un développement important de l'utérus, qui en fin de phase lutéale est prêt à la nidation. Les divergences de marquage pourraient donc s'expliquer par des différences d'état de différenciation lors des phases du cycle.

Pour nous convaincre de la régulation du gène *H19* par les hormones stéroïdes, nous avons réalisé des manipulations *in vivo* permettant de tester l'action en mode systémique de différentes molécules chez des souris ovariectomisées et surrénalectomisées, puis traitées par des injections d'hormones seules ou en mélange. Ces expériences nous ont permis de définir le rôle de chaque hormone sur l'expression du gène *H19*. Les variations très importantes de la morphologie de l'utérus des souris opérées en fonction du traitement rendent compte de l'action des hormones. L'ablation des organes, suivie d'une injection de solvant seul (témoin), abolit l'expression du gène, observée par ailleurs chez les souris non-opérées ; cette inhibition indique le rôle essentiel des hormones stéroïdes dans le maintien du taux normal de synthèse des ARN *H19*. L'injection de 17- $\beta$ -œstradiol (E2) et de corticostérone (B) rétablit le patron normal d'expression, tandis que l'injection de progestérone (P) seule est sans effet. Cette dernière associée aux autres hormones, avec E2 ou E2 et B suffit à annuler leur effet activateur. Nous avons déduit de ces expériences que E2 et B régulent positivement le gène *H19*, alors que P le régule négativement. Les données précédentes nous permettent d'expliquer les variations observées lors du cycle œstrien, variations probablement dues à l'action antagoniste de E2 et de P. On note que le pic d'E2 ne se superpose pas exactement au maximum de synthèse des ARN *H19*. Cet écart peut s'expliquer par une rémanence de l'action des hormones, le délai nécessaire à la synthèse des ARN *H19* ou encore l'action d'autres facteurs venant moduler les *stimuli* hormonaux. De même si les hormones n'agissent pas directement sur le gène, mais par l'intermédiaire d'un relais qui peut être un facteur de croissance paracrine, l'activation de ce relais permet d'expliquer un certain retard dans

l'apparition des ARN *H19*. Contrairement à ce qui a été observé dans l'utérus, aucune différence d'expression n'a été constatée dans la glande mammaire, quelle que soit l'hormone injectée. Au moins deux hypothèses peuvent expliquer cette absence de réponse : 1) la régulation du gène *H19* par les hormones nécessite l'action de co-facteurs qui sont absents lors de nos expériences de compensations hormonales, 2) le dosage des hormones doit être beaucoup plus fin que celui adopté pour mimer les conditions de surexpression observée durant la puberté et la gestation. A ce stade de la discussion, on ne peut encore écarter l'hypothèse d'une expression du gène *H19* indépendante des hormones stéroïdes dans la glande mammaire. Afin de tester ces différentes hypothèses nous avons réalisé plusieurs expériences *in vitro*. La technique du "Northern-blot" a permis de constater que dans des cellules épithéliales mammaires humaines hormono-sensibles (MCF-7), le gène *H19* est régulé positivement par le 17- $\beta$ -œstradiol. Cette régulation pourrait s'effectuer *via* le récepteur nucléaire de l'hormone car l'addition de tamoxifène diminue l'activation induite par le ligand. Cela nous a conduit à rechercher l'action des récepteurs nucléaires sur l'activité du gène *H19*. Dans ce but, nous avons réalisé des co-transfections transitoires de différentes séquences (mutées ou sauvages) de récepteurs nucléaires et d'un gène rapporteur (*luciférase*) sous le contrôle du promoteur de *H19*, et nous avons démontré que le récepteur au 17- $\beta$ -œstradiol (RE) régule positivement le promoteur du gène *H19*, tandis que le récepteur à la progestérone (RP) l'inhibe faiblement. De plus, nous avons obtenu une activation de ce promoteur par RE en absence de stimulation hormonale, ce qui semble indiquer que le gène pourrait également être activé par les récepteurs hormonaux de façon ligand-indépendante. Cette activation ligand-indépendante, décrite dans d'autres systèmes (Weigel et Zhang, 1998 ; El Tanani et Green, 1997 ; Lee et Yee, 1995), a été confirmée par l'utilisation de mutants de RE, mutants dont les événements sont situés dans le domaine E qui est responsable d'une *trans*-activation dépendante du ligand. Ces mutants, décrits pour leur rôle de *trans*-dominant négatif, lorsqu'ils sont transfectés dans des cellules

possédant le récepteur endogène fonctionnel (Schodin *et al.*, 1995 ; Ince *et al.*, 1995), se sont révélés encore capables, dans une certaine mesure, de *trans*-activer le gène *H19*. Ces mutants exhibent donc un phénotype *trans*-dominant négatif lors d'une stimulation ligand-dépendante, mais se comportent comme le sauvage, certes avec moins d'efficacité, lors d'une stimulation ligand-indépendante. Le promoteur du gène *H19* ne possède pas de sites consensus (AGGTCAnnnTGACCT) pour le récepteur au 17- $\beta$ -œstradiol. En revanche, il possède un grand nombre de demi-sites canoniques ou dégénérés. Des travaux récents ont montré que RE pouvait activer des gènes dépourvus de sites consensus (Kato *et al.*, 1995 ; Aumais *et al.*, 1996), en recrutant probablement des demi-sites répétés directs ou inversés séparés par un nombre variable de paires de bases (jusqu'à 200 pb). En conséquence, dans nos expériences de co-transfections, le promoteur *H19* pourrait donc être directement stimulé par les récepteurs nucléaires. Il semble cependant raisonnable de ne pas exclure la possibilité de leur action indirecte. Enfin, des co-facteurs peuvent aussi moduler cette action : la différence entre l'activité du promoteur *H19* sur le gène rapporteur (*luciférase*) en présence de sérum, et celle mesurée en milieu dépourvu de sérum indique la présence dans ce dernier de facteurs capables d'optimiser l'action des récepteurs nucléaires.

Les résultats obtenus en mettant en œuvre un gène rapporteur (*luciférase*) sous le contrôle du promoteur de *H19* nous semble assez convaincants pour admettre une régulation de *H19* par les hormones stéroïdes : *in vivo* et *in vitro* le 17- $\beta$ -œstradiol et son récepteur stimulent l'expression du gène *H19*, tandis que le récepteur à la progestérone et son ligand l'inhibent. Cependant, on note des différences entre les résultats fournis par les expériences menées sur des cultures de cellules et ceux observés en parallèle chez des animaux. Il est évident que les cultures cellulaires ne reproduisent que très partiellement les conditions réalisées *in vivo* : des co-facteurs présents *in vivo* peuvent faire défaut *in vitro*. De plus, au sein des cultures, les cellules isolées peuvent répondre à une stimulation d'une manière différente de

celle des cellules *in situ* interagissant avec leur environnement tissulaire. Les différences entre ces contextes où vivent les cellules justifient pleinement nos expériences *in vivo* qui, bien que lourdes, nous apportent des renseignements essentiels à la compréhension des phénomènes étudiés. On peut inclure dans ce type de divergence, l'absence de réponse du gène *H19* à la stimulation par l'œstradiol dans la glande mammaire *in situ*, alors que le gène des cellules épithéliales mammaires humaines (MCF-7) est sensible à ce stéroïde.

Les résultats obtenus lors des expériences de co-transfections doivent aussi être interprétés avec prudence. En effet, lors de ces expériences, nous avons utilisé un gène rapporteur sous le seul contrôle du promoteur du gène *H19*. Or il est convenu que d'autres séquences situées en *cis* peuvent moduler l'action de ce promoteur (Yoo-Warren *et al.*, 1988). Récemment, Kopf *et al.* (1998) ont montré que l'acide rétinoïque (RA) peut activer le gène *H19*. Ce travail est intéressant car il rapporte qu'un récepteur nucléaire différent de ceux que nous avons étudiés régule l'activité de *H19*. Dans ce travail, l'équipe de Kopf détermine l'importance d'une région située en 3' dans cette régulation.

Il est admis que l'œstradiol provoque une prolifération accrue des cellules épithéliales, tandis que la progestérone induit plutôt une différenciation de ces cellules. L'activation du gène par l'œstradiol et sa répression par la progestérone peuvent donc conduire à penser que le gène *H19* interviendrait dans des phénomènes de prolifération. Cependant, dans l'utérus des souris traitées, nous n'avons pu corrélérer la synthèse des ARN *H19* avec la présence de la protéine Ki-67, un marqueur du cycle cellulaire ; ce qui indique que le gène *H19* n'est pas particulièrement actif dans les cellules qui synthétisent ce témoin de la prolifération. Il est cependant intéressant de se souvenir que l'expression de *H19* est forte lorsque de grands bouleversements morphologiques surviennent, par exemple à la puberté ou lors de la gestation dans la glande mammaire, ou lors des modifications cycliques de l'utérus, tandis que cette expression est faible lors des périodes de "repos", par exemple dans la glande mammaire

avant la puberté et chez la souris nullipare. Enfin, d'autres résultats laissent penser que le gène *H19* n'est pas sensible qu'aux seules hormones utilisées dans cette étude (œstradiol, progestérone, corticostérone). En effet, nous avons indiqué que la dexaméthasone, induit une synthèse des ARN *H19* dans les cellules HeLa. Rogers *et al.* (1990) et Kopf *et al.* (1998) ont de leur côté montré l'action de l'acide rétinoïque sur l'expression du gène *H19* dans différents modèles. Il est donc possible que le gène *H19* soit régulé par nombre de récepteurs nucléaires, avec sans doute des différences selon le modèle ou l'espèce envisagés ; en effet, Senior *et al.* (1996) rapportent chez le rat un effet inhibiteur de la dexaméthasone sur l'expression du gène *H19*.

Parallèlement au suivi de l'expression de *H19* au cours du développement normal de la glande mammaire, nous avons étudié un grand nombre d'adénocarcinomes mammaires humains de types variés (102 cas analysés) afin de tenter d'établir, grâce à une étude statistique, un sens à la surexpression fréquente du gène *H19* dans ces tumeurs (Douc-Rasy *et al.*, 1993 ; Dugimont *et al.*, 1995). Alors que dans d'autres cancers, cette surexpression s'accompagne d'une perte d'empreinte, dans le sein Yballe *et al.* (1996) ont démontré sur 17 cas informatifs que l'expression restait monoallélique. Notre étude a précisé que 72,5% des carcinomes surexpriment le gène *H19* par rapport aux tissus sains. L'utilisation d'anticorps spécifiques des cellules épithéliales ou de cellules stromales nous a permis de déterminer précisément le patron d'expression du gène, ce que d'autres études réalisées par "Northern-blot" n'avaient pu évidemment établir (Douc-Rasy *et al.*, 1993). Dans 92,2% des tumeurs, *H19* est exprimé uniquement dans le compartiment stromal ; l'expression du gène se limite aux seules cellules épithéliales dans 2,9% des cas ; et dans les spécimens restant (4,9%) le gène s'exprime dans les deux compartiments. Au cours de nos observations, nous avons noté que les transcrits *H19* s'accumulent souvent à l'interface épithélium/mésenchyme.

La comparaison entre la surexpression du gène *H19* et les différentes informations clinico-pathologiques choisies, nous a permis de tirer les conclusions suivantes : *H19* est significativement corrélé d'une part avec la valeur T du système TNM, qui rend compte de la taille de la tumeur et de son inflammation, et d'autre part avec la présence des récepteurs hormonaux (RE et RP). Cette dernière corrélation, ainsi que la forte expression du gène d'intérêt dans les adipocytes (lieu de synthèse des œstrogènes) et dans les cellules du tissu palléal (très sensibles aux hormones) proche des cellules épithéliales suggèrent que le gène *H19* est régulé par les hormones stéroïdes dans les tumeurs mammaires. Les tests statistiques ne nous ont pas permis d'établir d'autres corrélations significatives entre une synthèse élevée des ARN *H19* et les autres facteurs clinico-pathologiques considérés (âge, statut ménopausal, invasion des ganglions, survie à cinq ans après la tumorectomie). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine Ki-67 nous a également permis de préciser que dans les tumeurs *H19* n'est pas préférentiellement exprimé dans les cellules en prolifération. Cette observation n'est guère surprenante car le marquage obtenu avec l'anticorps anti Ki-67 (20 cas positifs pour 24 tumeurs étudiées) est essentiellement épithélial, il ne peut donc pas être fréquemment co-localisé avec le signal *H19* qui demeure principalement stromal. De même, nous avons tenté de corréler l'expression du gène *H19* avec la présence de la protéine p53 suppresseur de tumeurs. En effet, nous avons observé que dans d'autres systèmes (cellules HeLa et cellules Calu 6) p53 régulait négativement le gène *H19*. Cette étude a montré, grâce à des transfections stables ou transitoires de cellules HeLa, que *H19* est réprimé par la protéine p53 sauvage, et activé par l'abrogation physiologique de p53, obtenue par la mise en œuvre de séquences antisens ou par un mutant thermosensible de p53 agissant comme un *trans*-dominant négatif (l'association de protéines p53 sauvages endogènes et de p53 mutantes formant un oligomère inactif). Cette démonstration a été étayée par l'utilisation d'un mutant thermosensible manifestant selon la température soit un phénotype sauvage à la température permissive de 32°C, soit un phénotype



mutant à la température non-permissive de 37°C. Nous avons confirmé le rôle de p53 sur le gène *H19* dans des cellules dépourvues de p53 endogène, les cellules Calu 6, pour lesquelles une transfection de p53 est suivie d'une réduction de l'activité du promoteur *H19* ectopique associé au gène rapporteur *luciférase*. En revanche, la transfection de la séquence p53 antisens, comme l'utilisation du mutant sont restées sans effet sur *H19*, car leur produit respectif n'a pu agir avec celui d'une séquence endogène absente ; il faut cependant noter que le mutant est capable d'une légère répression, probablement due à un reliquat d'activité. p53 peut réguler des gènes cibles en se liant à son site de fixation consensuel (Zambetti *et al.*, 1992 ; El Deiry *et al.*, 1993 ; Deb *et al.*, 1994) ou par l'intermédiaire de la TATA box en interagissant avec la TBP (TATA box binding protein) (Deb *et al.*, 1994). Cependant, des gènes dont les promoteurs sont dépourvus de site de fixation consensuel de la protéine p53 peuvent être régulés par celle-ci positivement ou négativement (Ginsberg *et al.*, 1991 ; Santhanan *et al.*, 1991 ; Subler *et al.*, 1992). De même, p53 est capable de moduler l'expression de gènes dont le promoteur ne possède pas de TATA box (*c-ets-1* et *c-ets-2* : Iotsova *et al.*, 1996 ; *fibronectine* : Iotsova et Stéhelin, 1996). Le promoteur du gène *H19* ne possède ni séquence consensus permettant la fixation de p53, ni TATA box. p53 régule donc le gène *H19* par une autre voie. Il a été montré que p53 peut interagir avec des facteurs se liant à la CCAAT box (Agoff *et al.*, 1993) ou empêcher la formation de complexes de transcription impliquant des facteurs SP1 (Perrem *et al.*, 1995). Le promoteur du gène *H19*, riche en GC, pourrait donc être régulé par p53 *via* les sites SP1. p53 peut aussi entrer en compétition avec E2F, s'associer avec DP1 et empêcher ainsi la transcription de gènes activés par le complexe E2F/DP1 (Sorensen *et al.*, 1996). Le promoteur du gène *H19* possède deux sites consensus pour E2F en -40 et -469 pb du point d'initiation de la transcription. Des co-transfections réalisées avec le gène rapporteur sous contrôle du promoteur *H19* et un plasmide codant pour E2F montrent que celui-ci active le gène *H19* ; il est donc possible que p53 inhibe l'activité du

gène *H19* en contrariant son activation induite par E2F (résultats non montrés dans ce mémoire). A la suite de ce travail publié dans *Oncogene* (Dugimont *et al.*, 1998), nous avons suggéré que la surexpression du gène *H19* observée dans de nombreuses tumeurs pouvait être due à la perte de fonction de p53. p53 est en effet mutée dans de nombreux cancers humains (Pellegata et Ranzani, 1996 ; Velculescu et El Deiry, 1996) y compris dans les carcinomes mammaires (Faille *et al.*, 1994 ; Barbareschi, 1996 ; Van der Kooy *et al.*, 1996). Il semble que ce ne soit pas la situation décrite dans notre étude où la surexpression du gène *H19* n'est pas significativement corrélée, au niveau cellulaire, avec la présence de la protéine p53.

La mise en parallèle entre le grade de la tumeur et l'expression du gène *H19* semble indiquer que cette dernière est plus importante dans les tumeurs de grade élevé (grade III). Mais ce rapprochement ne résiste pas à l'analyse statistique effectuée sur les 102 tumeurs ; on ne peut donc conclure à une corrélation significative entre la surexpression du gène et le grade des tumeurs. En conséquence, il semble difficile de considérer *H19* comme un marqueur de la progression tumorale. En revanche, Biran *et al.* (1994) et Cooper *et al.* (1996) sont parvenus à corréler l'expression de ce gène avec l'agressivité des tumeurs dans leur modèle, des carcinomes urothéliaux et de la vessie respectivement. A propos des trois tumeurs, de notre travail, pour lesquelles une surexpression du gène *H19* ne concernait que les seules cellules épithéliales, il faut retenir que ces cancers étaient de grade III, les cellules dépourvues de récepteurs aux hormones (signe d'un mauvais pronostic), et que les patientes sont décédées dans les cinq années écoulées depuis la tumorectomie. Une fois encore le trop faible nombre d'échantillons nous empêche de tirer des conclusions significatives de ces données.

Un autre point d'intérêt est la découverte d'une expression préférentielle du gène *H19* à l'interface épithélium/mésenchyme. Cette localisation a également été observée dans les tumeurs bénignes ou malignes (voir aussi Dugimont *et al.*, 1995) et dans les adipocytes où l'on constate une intensification du signal dans ces cellules à proximité de la tumeur. Ce marquage

privilegié suggère que l'expression du gène dans les cellules stromales pourrait résulter, au moins en partie, d'une influence paracrine des cellules cancéreuses. En effet, le travail de Singer *et al.* (1995) rapporte que la surexpression du gène *IGF-2* dans des tumeurs mammaires résulte d'un effet paracrine, résultant de facteurs solubles libérés par les cellules épithéliales. Comme dans de nombreux modèles les gènes *H19* et *IGF-2* sont co-régulés, il est possible que la surexpression du gène *H19* observée dans les cellules stromales, jouxtant les cellules tumorales, soit le fait d'une telle influence. L'expression du gène *H19* pourrait alors faire partie de l'ensemble des changements communément appelé réaction stromale. En effet, lors d'une évolution néoplasique, en réaction à la multiplication anarchique des cellules épithéliales, des modifications cellulaires s'opèrent au sein du stroma. Les cellules myoépithéliales disparaissent et l'accroissement très important du nombre de cellules myofibroblastiques transforme le stroma en un tissu fibreux. Ces changements s'accompagnent de la synthèse spécifique de certaines protéines dans le compartiment stromal en réponse à des *stimuli* des cellules épithéliales, par exemple le *scatter factor* ou *HGF/SF*, l'*urokinase plasminogen activator*, le facteur de transcription *c-ets-1* et l'*aromatase* responsable de la synthèse de l'œstradiol dans les adipocytes. *H19* pourrait donc faire partie des gènes impliqués dans le dialogue cellules épithéliales/stroma. Notre étude nous a conduit à la double constatation suivante : *H19* est souvent surexprimé dans les cancers (72,5% des cas), mais ce phénomène concerne rarement les cellules tumorales, où le gène est en général réprimé (dans plus de 92% des cas). Nous rappelons que dans le sein normal les cellules épithéliales possèdent un taux basal d'ARN *H19*. Ces données, bien qu'étant des preuves indirectes, sont donc en accord avec le rôle de suppresseur de tumeurs déjà proposé par certains auteurs. Cette conclusion est confortée par nos résultats en faveur d'une expression du gène *H19* indépendante de la prolifération.

Dans le but de déterminer le rôle du gène *H19* au sein des relations épithélium/mésenchyme, nous avons tenté de reproduire *in vitro* ces interactions. L'expression

du gène dans les cellules épithéliales mammaires humaines normales ou cancéreuses reste toujours très difficilement détectable par “Northern-blot”. En revanche la mise en œuvre d’une technique beaucoup plus sensible, l’hybridation moléculaire *in situ*, permet de reconnaître un faible signal dans les quatre types cellulaires utilisés (un type normal, CEMN, et trois lignées, HBL 100, MCF-7 et MDA-MB-231). Si nous rapprochons ces derniers résultats de ceux obtenus au niveau des cellules épithéliales *in situ* dans les tumeurs, il nous semble cohérent de rencontrer des difficultés récurrentes à la détection par “Northern-blot” d’un message *H19* dans les cellules en culture. Dans le but de mimer les conditions du micro-environnement où vivent les cellules *in situ*, nous les avons cultivées en gel de collagène, en culture tridimensionnelle. Ce mode de culture a toujours induit une surexpression du gène *H19*. Nous avons testé différents supports ou “revêtements” du fond de boîte afin de déterminer si l’ancrage pouvait être la cause de cette stimulation du gène *H19*. Aucune modification du taux de synthèse des ARN *H19* n’a été observée dans les cellules ayant proliféré sur les éléments suivants : collagène, fibronectine, poly-l-lysine, plastique nu. Il semble donc que le contexte tridimensionnel soit le seul responsable de la surexpression du gène. Ce résultat intéressant peut être rapproché de ceux de Rachmilewitz *et al.* (1995) qui ont montré que les cellules JEG-3, issues de choriocarcinomes, injectées à des souris “*nude*” surexpriment le gène *H19* ; de même, des cellules HeLa transfectées stablement avec différentes versions de p53 (sens, antisens ou mutantes) et injectées à des souris “*nude*” provoquent des tumeurs surexprimant le gène *H19*. La très importante surexpression du gène *H19* dans les tumeurs induites par ces différents clones transfectés a été interprétée comme étant le résultat d’une violente stimulation de la transcription du gène, qui ne peut plus être contrôlé négativement par la protéine p53. Dans ce cas, que les clones de cellules HeLa soit recombinaisonnés par des versions de p53 sens, antisens ou mutantes, ces événements semblent avoir des conséquences mineures au regard de l’activation de *H19* (Thierry Dugimont,

communication personnelle). Dans ces deux exemples une surexpression du gène *H19* a été obtenue lorsque les cellules ont été placées dans un environnement tridimensionnel. Afin d'améliorer le mimétisme des interactions épithélium/mésenchyme, nous avons cultivé les cellules en gel de collagène dans un milieu conditionné par des fibroblastes (MRC-5). Les facteurs libérés par ces derniers sont capables de provoquer une tubulogenèse de MDCK dans une culture en gel de collagène (Montesano *et al.*, 1991a). Au laboratoire, il a été montré que ce milieu pouvait aussi provoquer une tubulogenèse des cellules mammaires normales (CEMN) et un essaimage de cellules cancéreuses très invasives (MDA-MB231) (Fauquette *et al.*, 1997). Pour notre part, nous avons constaté que ce milieu augmente encore la stimulation du gène *H19*, déjà activé par la simple culture tridimensionnelle dans toutes les cellules utilisées. Cette surexpression n'est pas détectable dans les cellules cultivées en boîte de Pétri (deux dimensions). Ces données nous indiquent qu'une stimulation fibroblastique peut induire une augmentation de la surexpression du gène *H19*, mais que cette stimulation n'est possible que dans certaines conditions (trois dimensions). Certes, le ou les facteur(s) responsable(s) de cette activation reste(nt) à déterminer. Il est tentant de penser à l'un des facteurs libérés par les fibroblastes et responsable de la tubulogenèse et de l'essaimage : "l'*hepatocyte growth factor*" ou HGF. Il serait digne d'intérêt de tester si ce facteur, et d'autres connus pour leur activité morphogène, et/ou motogène sont directement actifs seuls ou en synergie sur *H19*.

## CONCLUSION

Bien que les expériences menées au cours de notre stage ne permettent évidemment pas d'attribuer un rôle précis et définitif au gène *H19*, l'implication de ce gène dans les interactions épithélio-mésenchymateuses semble évidente. *H19* pourrait être l'un des acteurs de la réaction stromale comme cela a été décrit pour d'autres gènes : *IGF-2* et *c-ets-1* par exemple. Nous avons déjà rapporté la co-régulation d' *IGF-2* et de *H19* dans de nombreux systèmes, ainsi que l'expression du premier dans le stroma bordant les cellules cancéreuses mammaires (Singer *et al.*, 1996). L'expression de *c-ets-1* dans les cellules mésenchymateuses adjacentes aux structures épithéliales invasives a été décrite au cours d'interactions épithélio-mésenchymateuses, en particulier lors de la morphogenèse du rein et du poumon (Quéva *et al.*, 1993 ; Maroukalou *et al.*, 1994). L'étude de l'expression de *c-ets-1* dans de nombreux carcinomes invasifs humains a également révélé la présence des transcrits dans les fibroblastes du stroma ; cette expression étant d'autant plus forte que les fibroblastes sont proches des cellules néoplasiques (Wernert *et al.*, 1994). Enfin, *c-ets-1* est exprimé dans les cellules épithéliales mammaires pendant la tubulogenèse ou l'essaimage (Delannoy-Courdent *et al.*, 1996). Cette co-localisation entre *H19* et *c-ets-1* peut laisser penser que le gène *H19*, comme *c-ets-1*, pourrait avoir un rôle dans le remodelage du tissu mésenchymateux lors d'un développement néoplasique et dans les cellules épithéliales lors de stimulations mésenchymateuses. Le rôle du gène dans ces cellules reste à élucider et des expériences complémentaires doivent être envisagées, d'une part, pour découvrir le (ou les) facteur(s) sécrété(s) par les fibroblastes et responsable(nt) de la surexpression du gène *H19*, et d'autre part, à l'inverse d'une action des fibroblastes sur les cellules épithéliales que nous avons mis en évidence, rechercher une action paracrine *in vitro* des cellules tumorales sur les cellules mésenchymateuses, action suggérée par les observations faites sur les tumeurs.

L'ensemble des résultats obtenus semble indiquer une absence d'implication du gène *H19* dans les processus de prolifération. En effet, dans les tumeurs mammaires, comme dans

l'utérus sain en perpétuelle reconstruction, l'expression du gène n'est jamais corrélée avec la présence de la protéine Ki-67. De même dans les cellules en culture, le sevrage, l'action du butyrate de sodium (NaB) et celle du TGF $\beta$ 1 indiquent un découplage entre l'expression du gène *H19* et la prolifération. Le NaB, aux doses utilisées, inhibe la croissance de tous les types cellulaires mammaires (Dong-Le Bourhis *et al.*, 1998), mais est sans effet, comme le sevrage, sur l'expression du gène *H19*. Le TGF $\beta$ 1 inhibe la croissance des cellules normales, sans moduler la synthèse des ARN *H19*, mais n'agit pas en terme de prolifération sur les cellules tumorales, alors que dans ces dernières il inhibe l'expression du gène *H19*. Ces données suggèrent donc une absence de participation du gène dans des phénomènes de prolifération.

Enfin, nous avons démontré que le gène *H19* est régulé par les hormones stéroïdes. La signification de cette régulation reste difficile à appréhender. Néanmoins, le gène est préférentiellement surexprimé dans les tumeurs sensibles aux hormones. Ces tumeurs sont réputées moins agressives et de meilleur pronostic. Ainsi, la surexpression du gène *H19* dans les tumeurs mammaires semble être concomitante d'une évolution positive de la maladie. De plus, l'expression du gène est essentiellement stromale et disparaît lors de la cancérogenèse dans les cellules épithéliales (tumorales). En conclusion, l'ensemble de nos résultats sont en accord avec le phénotype suppresseur de tumeurs attribué par certains auteurs à *H19*.



## BIBLIOGRAPHIE

- Abastado JP, Miller PF and Hinnebush AG. (1991). A quantitative model for translational control of the *GCN4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *New Biol.* **3**, 511-524.
- Adam GIR, Cui H, Miller SJ, Flam F and Ohlsson R. (1995). Allele-specific in situ hybridization (ASISH) analysis: A novel technique which resolves differential allelic usage of *H19* within the same cell lineage during human placenta development. *Development* **122**, 839-847.
- Agoff SN, Hou J, Linzer DIH and Wu B. (1993). Regulation of the human *hsp70* promoter by p53. *Science* **259**, 84-87.
- Ariel I, Lustig O, Schneider T, Pizov G, Sappir M, de Groot N and Hochberg A. (1994). The imprinted *H19* gene as a tumor marker in bladder carcinoma. *Urology* **45**, 335-338.
- Ariel I, Ayesh S, Perlman EJ, Pizov G, Tanos V, Schneider T, Erdmann VA, Podeh D, Komitowski D, Quasem AS, de Groot N and Hochberg A. (1997a). The product of the imprinted *H19* gene is an oncofetal RNA. *Mol. Pathol.* **50**, 34-44.
- Ariel I, Weinstein D, Voutilainen R, Schneider T, Lustig-Yariv O, de Groot N and Hochberg A. (1997b). Genomic imprinting and the endometrial cycle. The expression of the imprinted gene *H19* in the human female reproductive organs. *Diagn. Mol. Pathol.* **6**, 17-25.
- Arrick BA, Lee AL, Grendell RL and Derynck R. (1991). Inhibition of translation of transforming growth factor- $\beta$ 3 mRNA by its 5' untranslated region. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4306-4313.

- Askew DS, Li J and Ihle JN. (1994). Retroviral insertions in the murine *His-1* locus activate the expression of a novel RNA that lacks an extensive open reading frame. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1743-1751.
- Aumais JP, Lee HS, DeGannes C, Horsford J and White HJ. (1996) . Function of directly repeated half-sites as response elements for steroid hormone receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 12568-12577.
- Barbareschi M. (1996). Prognostic value of the immunohistochemical expression of p53 in breast carcinomas. *Applied Immunohistochemistry.* **4**, 106-116.
- Barletta JM, Rainier S and Feinberg AP. (1997). Reversal of loss of imprinting in tumor cells by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* **57**, 48-50.
- Bartolomei MS, Zemel S and Tilghman SM. (1991). Parental imprinting of the mouse *H19* gene. *Nature* **351**, 153-155.
- Bartolomei MS and Tilghman SM. (1992). Parental imprinting of mouse chromosome 7. *Sem. in Dev. Biol.* **3**, 107-117.
- Biran H, Ariel I, de Groot N, Shani A and Hochberg A. (1994). Human imprinted genes as oncodevelopmental markers. *Tumour Biol.* **15**, 123-134.
- Bloom HJ and Richardson WW. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer.* **11**, 359-377.
- Brandeis M, Kafri T, Ariel M, Chaillet JR, McCarrey J, Razin A and Cedar H. (1993). The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse. *EMBO J.* **12**, 3669-3677.
- Brannan CI Dees EC, Ingram RS and Tilghman SM. (1990). The product of the *H19* gene may function as an RNA. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 28-36.

- Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafrenière RG, Xing Y, Lawrence J and Willard HF. (1992). The human *Xist* gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* **71**, 527-542.
- Brunkow ME and Tilghman SM. (1991). Ectopic expression of the *H19* gene in mice causes prenatal lethality. *Genes & Dev.* **5**, 1092-1101.
- Casola S, Pedone PV, Cavazzana AO, Basso G, Luksch R, d'Amore ESG, Carli M, Bruni CB and Riccio A. (1997). Expression and parental imprinting of the *H19* gene in human rhabdomyosarcoma. *Oncogene* **14**, 1503-1510.
- Cooper MJ, Fischer M, Komitowski D, Shevelev A, Schulze E, Ariel I, Tykocinski ML, Miron S, Ilan J, de Groot N and Hochberg A. (1996). Developmentally imprinted genes as markers for bladder tumor progression. *J. Urol.* **155**, 2120-2127.
- Cooper PR, Smilnich NJ, Day CD, Nowak NJ, Reid LH, Pearsall RS, Reece M, Prawitt D, Landers J, Housman DE, Winterpacht A, Zabel BU, Pelletier J, Weissman BE, Shows TB and Higgins MJ. (1998). Divergently transcribed overlapping genes expressed in liver and kidney and located in the 11p15.5 imprinted domain. *Genomics* **49**, 38-51.
- Cunha GR, Young P, Hamamoto S, Guzman R and Nandi S. (1992). Developmental response of adult mammary epithelial cells to various fetal and neonatal mesenchymes. *Epithelial Cell Biol.* **1**, 105-118.
- Deb SP, Munoz RM, Brown DR, Subler MA and Deb S. (1994). Wild-type human p53 activates the human epidermal growth factor receptor promoter. *Oncogene* **9**, 1341-1350.

- DeChiara TM, Robertson EJ and Efstratiadis A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **22**, 849-859.
- Delannoy-Courdent A, Fauquette W, Dong-Le Bourhis XF, Boilly B, Vandebunder B and Desbiens X. (1996). Expression of *c-ets-1* and *uPA* genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 1097-1108.
- Deng G, Chen LC, Schott DR, Thor A, Bhargava V, Ljung BM, Chew K and Smith HS. (1994). Loss of heterozygosity and p53 gene mutations in breast cancer. *Cancer Res.* **54**, 499-505.
- Dowdy SF, Fasching CL, Araujo D, Lai KM, Livanos E, Weissman BE and Stanbridge EJ. (1991). Suppression of tumorigenicity in wilms tumor by the p15.5-p14 region of chromosome 11. *Science* **254**, 293-295.
- Douc-Rasy S, Coll J, Barrois M, Joubel A, Prost S, Dozier C, Stéhelin D and Riou G. (1993). Expression of the human fetal *BAC/H19* gene in invasive cancers. *Int. J. Oncol.* **2**, 753-758.
- Douc-Rasy S, Barrois M, Fogel S, Ahomadegbe JC, Stéhelin D, Coll J and Riou G. (1996). High incidence of loss of heterozygosity and abnormal imprinting of *H19* and *IGF2* genes in invasive cervical carcinomas. Uncoupling of *H19* and *IGF2* expression and biallelic hypomethylation of *H19*. *Oncogene* **12**, 423-430.
- Driancourt MA, Royere D, Hedon B and Levasseur MC. (1991). Cycles œstrien et cycle menstruel. in *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Thibault C and Levasseur MC. Eds ellipses INRA.

- Dugimont T, Cury JJ, Wernert N, Delobelle A, Raes MB, Joubel A, Stéhelin D and Coll J. (1995). *Biol. Cell* **85**, 117-124.
- Dugimont T, Montpellier C, Adriaenssens E, Lottin S, Dumont L, Iotsova V, Lagrou C, Stéhelin D, Coll J and Cury JJ. (1998). The *H19* TATA-less promoter is efficiently repressed by wild-type tumor suppressor gene product p53. *Oncogene* **16**, 2395-2401.
- Eden S and Cedar H. (1995). Action at a distance. *Nature* **375**, 16-17.
- El Deiry WS, Tokino T, Velculescu V, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer EW, Kinzler KW and Vogelstein B. (1993). *Cell* **75**, 817-825.
- Elkin M, Shevelev A, Schulze E, Tykocinsky M, Cooper M, Ariel I, Pode D, Kopf E, de Groot N and Hochberg A. (1995). The expression of the imprinted *H19* and *IGF-2* genes in human bladder carcinoma. *FEBS Lett.* **374**, 57-61.
- ElTanani MK and Green CD. (1997). Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* **11**, 928-937.
- Faille A, De Cremoux P, Extra JM, Linares G, Espie M, Bourstyn E, De Rocquancourt A, Giacchetti S, Marty M and Calvo F. p53 mutations and overexpression in locally advanced breast cancers. *Br. J. Cancer* **69**, 1145-1150.
- Feil R, Walter J, Allen ND and Reik W. (1994). Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse *Igf-2* and *H19* genes. *Development* **120**, 2933-2943.
- Feinberg AP. (1993). Genomic imprinting and gene activation in cancer. *Nature Genet.* **4**, 110-113.
- Franklin GC, Adam GIR and Ohlsson R. (1996). Genomic imprinting and mammalian development. *Placenta* **17**, 3-14.

- Fujimori M Tokino T, Hino O, Kitagawa T, Imamura T, Okamoto E, Mitsunobu M, Ishikawa T Nakagama H and Harada H. (1991). Allelotype study of primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **51**, 89-93.
- Garcia I, Dietrich PY, Aapro M, Vauthier G, Vadas L and Engel E. (1989). Genetic alterations of c-myc, c-erbB-2, and c-Ha-ras protooncogenes and clinical associations in human breast carcinomas. *Cancer Res.* **49**, 6675-6679.
- Giannoukakis N, Deal C, Paquette J, Goodyer C and Polychronakos C. (1993). Parental genomic imprinting of the human *IGF-2* gene. *Nature genet.* **4**, 98-101.
- Giddins SJ, King CD, Harman KW, Flood JF and Carnaghi LR. (1994). Allele-specific inactivation of *insulin* 1 and 2, in the mouse yolk sac, indicate imprinting. *Nature genet.* **6**, 310-313.
- Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M and Oren M. (1991). Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9979-9983.
- Glaser T, Housman D, Lewis WH, Gerhard D and Jones C. (1989). A fine-structure deletion map of human chromosome 11p : analysis of J1 series hybrids. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **15**, 477-501.
- Guillemot F, Caspary T, Tilghman SM, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Anderson DJ, Joyner AL, Rosant J and Nagy A. (1995). Genomic imprinting of *Mash-2*, a mouse gene required for trophoblast development. *Nature genet.* **9**, 235-242.
- Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Ragot T, Bailly A, Atger M, Misrahi M, Perricaudet M and Milgrom E. (1988). Receptors bound to antiprogestin from abortive complexes with hormone responsive elements. *Nature* **336**, 695-698.

- Han DK and Liao G. (1992). Identification and characterization of developmentally regulated genes in vascular smooth muscle cells. *Circulation Res.* **71**, 711-719.
- Han DK, Khaing ZZ, Pollock RA, Haudenschild CC and Liao G. (1996). *H19*, a marker of developmental transition, is reexpressed in human atherosclerotic plaques and is regulated by the insulin family of growth factors in cultured rabbit smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **97**, 1276-1285.
- Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E and Tycko B. (1993). Tumor-suppressor activity of *H19* RNA. *Nature* **365**, 764-767.
- Hatada I, Sugama T and Mukai T. (1993). A new imprinted gene cloned by a methylation-sensitive genome scanning method. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5577-5582.
- Hatada I and Mukai T. (1995). Genomic imprinting of *P57<sup>KIP2</sup>*, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse. *Nature Genet.* **11**, 204-206.
- Hayashida T, Eversole-Cire P, Jones PA and Sasaki H. (1997). Imprinted genes are up-regulated by growth arrest in embryonic fibroblasts. *J. Biochem.* **122**, 901-903.
- Hayashizaki Y, Shibata H, Hirotsune S, Sugino H, Okazaki Y, Sasaki N, Hirose K, Imoto H, Okuizumi H, Maramatzu M, Komatsubara H, Shiroshi T, Moriwaki K, Katsuki M, Hatano N, Sasaki H, Ueda T, Takagi N, Plass C and Chapman VM. (1994). Identification of an imprinted U2af binding protein related sequence on mouse chromosome 11 using the RLGS method. *Nature Genet.* **6**, 33-40.
- Hemberger M, Redies C, Krause R, Oswald J, Walter J and Fundele RH. (1998). *H19* and *Igf2* are expressed and differentially imprinted in neuroectoderm-derived cells in the mouse brain. *Dev. Genes Evol.* **208**, 393-402.



- Hibi K, Nakamura H, Hirai A, Fujikase Y, Kasai Y, Akiyama S, Ito K and Takagi H. (1996). Loss of imprinting in esophageal cancer. *Cancer Res.* **56**, 480-482.
- Hinnebusch AG. (1990). Involvement of an initiation factor and protein phosphorylation in translational control of *GCN4* mRNA. *TIBS* **15**, 148-152.
- Hirling H, Emery-Goodman A, Thompson N, Neupert B, Seiser C and Kühn LC. (1992). Expression of active iron regulatory from a full-length human cDNA by *in vitro* transcription/translation. *Nucl. Acids Res.* **20**, 33-39.
- Hu RJ, Lee MP, Johnson LA and Feinberg AP. (1996). A novel human homologue of yeast nucleosome assembly protein, 65 kb centromeric to the *p57KIP2* gene, is biallelically expressed in fetal and adult tissues. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1743-1748.
- Hu J-F, Vu TH and Hoffman AR. (1997a). Genomic deletion of an imprint maintenance element abolishes imprinting of both *Insulin-like Growth Factor II* and *H19*. *J. Biol. Chem.* **272**, 20715-20720.
- Hu J-F, Nguyen PH, Pham NV, Vu TH and Hoffman AR. (1997b). Modulation of *Igf2* genomic imprinting in mice induced by 5-azacytidine, an inhibitor of DNA methylation. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1891-1898.
- Ince BA, Schodin DJ, Shapiro DJ and Katzenellenbogen BS. (1995). Repression of endogenous estrogen receptor activity in MCF-7 human breast cancer cells by dominant negative estrogen receptors. *Endocrinology* **136**, 3194-3199.
- Iotsova V and Stéhelin D. (1996). Down-regulation of *fibronectin* gene expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cell Growth Diff.* **7**, 629-634.

- Iotsova V, Crepieux P, Montpellier C, Laudet V and Stéhelin D. (1996). TATA-less promoters of some *Ets*-family genes are efficiently repressed by wild-type p53. *Oncogene* **13**, 2331-2337.
- Jinno Y, Yun K, Nishiwaki K, Kubota T, Ogawa O, Reeve A and Niikawa N. (1993). Mosaic and polymorphic imprinting of the *WT1* gene in humans. *Nature genetics* **6**, 305-309.
- Jones BK, LeVorse JM and Tilghman SM. (1998). *Igf2* imprinting does not require its own DNA methylation or *H19* RNA. *Genes & Dev.* **12**, 2200-2207.
- Joubel A, Curgy JJ, Pelczar H, Begue A, Lagrou C, Stéhelin D and Coll J. (1996). The 5' part of the human *H19* RNA contains *cis*-acting elements hampering its translatability. *Cell. Mol. Biol.* **42**, 1159-1172.
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H and Razin A. (1992). Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes & Dev.* **6**, 705-714.
- Kalscheuer VM, Mariman EC, Schepens MT, Rehder H and Ropers HH. (1993). The insulin-like growth factor type-2 receptor gene is imprinted in the mouse but not in humans. *Nature Genet.* **5**, 74-78.
- Kaneko-Ishino T, Kuroiwa Y, Miyoshi N, Kohda T, Suzuki R, Yokoyama M, Vioille S, Barton SC, Ishino F and Surani MA. (1995). *Peg1/Mest* imprinted gene on chromosome 6 identified by cDNA subtraction hybridization. *Nature Genet.* **11**, 52-59.
- Kato S, Sasaki H, Suzawa M, Masushige S, Tora L, Chambon P and Gronemeyer H. (1995). Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements act as promiscuous enhancers for different classes of nuclear receptors. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5858-5867.

- Kitsberg D, Selig S, Brandeis M, Simon I, Keshet I, Driscoll DJ, Nicholls RD and Cedar H. (1993). Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature* **364**, 459-463.
- Klausner RD, Rouault TA and Harford JB. (1989). Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* **72**, 19-28.
- Koide T, Ainscough J, Wijgerde M and Surani MA. (1994). Comparative analysis of *Igf-2/H19* imprinted domain: Identification of a highly conserved intergenic Dnase I hypersensitive region. *Genomics* **24**, 1-8.
- Kondo M, Susuki H, Ueda R, Osada H, Takagi K, Takahashi T and Takahashi T. (1995). Frequent loss of imprinting of the *H19* gene is often associated with its overexpression in human lung cancer. *Oncogene* **10**, 1193-1198.
- Kopf E, Bibi O, Ayesh S, Tykocinski M, Vitner K Looijenga LHJ, de Groot N and Hochberg A. (1998). The effect of retinoic acid on the activation of the human *H19* promoter by a 3' downstream region. *FEBS L.* **432**, 123-127.
- Koromilas AE, Lazaris-Karatzas AL and Sonenberg N. (1992). mRNAs containing extensive secondary structure in their non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J.* **11**, 4153-4158.
- Latham K, Doherty A, Scott C and Schultz R. (1994). *Igf2r* and *Igf2* gene expression in androgenetic, gynogenetic and parthenogenetic preimplantation mouse embryos: absence of regulation by genomic imprinting. *Genes & Dev.* **8**, 290-299.
- Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F and Brunet M. (1989). Prognosis value of histological grade nuclear components of Scarff-Bloom-

Richardson (SBR): an improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* **64**, 1914-1921.

- Lee AV and Yee D. (1995). Insulin-like growth factors and breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **49**, 415-421.

- Leff S, Brannan C, Reed M, Ozcelik T, Francke U, Copeland N and Jenkins N. (1992). Maternal imprinting of the mouse *Snrpn* gene and conserved linkage homology with the human prader-Willi syndrome region. *Nature Genet.* **2**, 259-264.

- Leibovitch MP, Nguyen VC, Gross MS, Solhonne B, Leibovitch SA and Bernheim A. (1991). The human ASM (Adult Skeletal Muscle) gene : expression and chromosomal assignment to 11p15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 1241-1250.

- Leibovitch MP, Solhonne B, Guillier M, Verelle P and Leibovitch SA. (1995). Direct relationship between the expression of tumor suppressor *H19* mRNA and *c-mos* proto-oncogene during myogenesis. *Oncogene* **10**, 251-260.

- Leighton PA, Ingram RS, Eggenschwiler J, Efstratiadis A and Tilghman SM. (1995a). Disruption of imprinting caused by deletion of the *H19* gene region in mice. *Nature* **375**, 34-39.

- Leighton PA, Saam JR, Ingram RS, Stewart CL and Tilghman SM. (1995b). An enhancer deletion affects both *H19* and *Igf2* expression. *Genes & Dev.* **9**, 2079-2089.

- Leighton PA, Saam JR, Ingram RS and Tilghman SM. (1996). Genomic imprinting in mice: its function and mechanism. *Biol. Reprod.* **54**, 273-278.

- Li E, Beard C and Jaenisch R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, **366**, 362-365.

- Liu J, Kahri AI, Heikkila P, Ilvesmaki V and Voutilainen R. (1995). *H19* and *IGF-2* gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 492-496.
- Liu J, Kahri AI, Heikkila P and Voutilainen R. (1997). Ribonucleic acid expression of the clustered imprinted genes, *p57KIP2*, *Insulin-like Growth Factor II*, and *H19*, in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 1766-1771.
- Lustig O, Ariel I, Ilan J, Lev-Lehman E, de Groot N and Hochberg A. (1994). Expression of the imprinted gene *H19* in the human fetus. *Mol. Reprod. Dev.* **38**, 239-246.
- Lustig-Yariv O, Schulze E, Komitowski D, Erdmann VA, Schneider T, de Groot N and Hochberg A. (1997). The expression of the imprinted genes *H19* and *IGF-2* in choriocarcinoma cell lines. Is *H19* a tumor suppressor gene? *Oncogene* **15**, 169-177.
- Lyko F, Brenton JD, Surani MA and Paro R. (1997). An imprinting element from the mouse *H19* locus functions as a silencer in *Drosophila*. *Nature Genet.* **16**, 171-173.
- Mackay J, Elder PA, Porteus DJ, Steel CM, Hawkins RA Going JJ and Chetty U. (1988). Partial deletion of chromosome 11p in breast cancer correlates with size of primary tumor and estrogen receptor level. *Br. J. Cancer* **58**, 710-714.
- Maroulakou IG, Papas TS and Green JE. (1994). Differential expression of *ets-1* and *ets-2* proto-oncogenes during murine embryogenesis. *Oncogene* **9**, 1551-1565.
- Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T and Orci L. (1991a). Identification of a fibroblast derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* **67**, 901-908.
- Montesano R, Schaller G and Orci L. (1991b). Induction of epithelial tubular morphogenesis in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Cell* **66**,

- Ogawa O, McNoe LA, Eccles MR, Morison IM and Reeve AE. (1993). Human insulin-like growth factor type I and II receptors are not imprinted. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 2163-2165.
- Ohlsson R, Barlow D and Surani A. (1994). Impression of imprinting. *TIG* **10**, 415-417.
- Olek A and Walter J. (1997). The pre-implantation ontogeny of the *H19* methylation imprint. *Nature Genet.* **17**, 275-276.
- Pachnis V, Belayew A and Tilghman SM. (1984). Locus unlinked to  $\alpha$ -fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5523-5527.
- Pachnis V, Brannan CI and Tilghman SM. (1988). The structure and expression of a novel gene activated in early mouse embryogenesis. *EMBO J.* **7**, 673-681.
- Pellegata NS and Ranzani GN. (1996). The significance of p53 mutations in human cancers. *Eur. J. Histochem.* **40**, 273-282.
- Perrem K, Rayner J, Voss T, Sturzbecher H, Jackson P and Braithwaite A. (1995). p53 represses SV40 transcription by preventing formation of transcription complexes. *Oncogene* **11**, 1299-1307.
- Pfeifer K, Leighton PA and Tilghman SM. (1996). The structural *H19* gene is required for transgene imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13876-13883.
- Poirier F, Chan CT, Timmons PM, Robertson EJ, Evans MJ and Rigby PW. (1991). The murine *H19* gene is activated during embryonic stem cell differentiation in vitro and at the time of implantation in the developing embryo. *Development* **113**, 1105-1114.

- Quéva C, Leprince D, Stéhelin D and Vandebunder B. (1993). p54c-ets-1 and p68c-ets-1 the two transcription factors encoded by the *c-ets-1* locus are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene* **8**, 2511-2520.
- Rachmilewitz J, Gileadi O, Eldar-Geva T, Schneider T, de Groot N and Hochberg A. (1992a). Transcription of the *H19* gene in differentiating cytotrophoblasts from human placenta. *Mol. Reprod. Dev.* **32**, 196-202.
- Rachmilewitz J, Goshen R, Ariel I, Schneider T, de Groot N and Hochberg A. (1992b). Parental imprinting of the human *H19* gene. *FEBS lett.* **309**, 25-28.
- Rainier S, Johnson L, Dobry C, Ping A, Grundry P and Feinberg AP. (1993). Relaxation of imprinting genes in human cancer. *Nature* **362**, 747-749.
- Rainier S, Dobry CJ and Feinberg AP. (1995). Loss of imprinting in hepatoblastoma. *Cancer Res.* **55**, 1836-1838.
- Reese JC and Katzenellenbogen BS. (1991). Mutagenesis of cysteines in the hormone binding domain of the human estrogen receptor. Alterations in binding and transcriptional activation by covalently and reversibly attaching ligands. *J. Biol. Chem.* **266**, 10880-10887.
- Reeve AE, Sih SA, Raizis AM and Feinberg AP. (1989). Loss of allelic heterozygosity at a second locus on chromosome 11 in sporadic Wilms' tumor cells. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1799-1803.
- Reid LH, Davies C, Cooper PR, Crider-Miller SJ, Sait SN, Nowak NJ, Evans G, Stanbridge EJ, deJong P, Shows TB, Weissman BE and Higgins MJ. (1997). A 1-Mb physical map and PAC contig of the imprinted domain in 11p15.5 that contains TAPA1 and the BWSCR1/WT2 region. *Genomics* **43**, 366-375.



- Ripoche MA, Kress C, Poirier F and Dandolo L. (1997). Deletion of the *H19* transcription unit reveals the existence of a putative imprinting control element. *Genes & Dev.* **11**, 1596-1604.
- Rogers MB, Watkins SC and Gudas LJ. (1990). Gene expression in visceral endoderm: a comparison of mutant and wild-type F9 embryonal carcinoma cell differentiation. *J. Cell Biol.* **110**, 1767-1777.
- Romeo DS, Park K, Roberts AB, Sporn MB and Kim SJ. (1993). An element of the Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 5'-untranslated region represses translation and specifically binds a cytosolic factor. *Mol. Endocrinol.* **7**, 759-766.
- Sakakura T. (1991). New aspects of stroma-parenchyma relations in mammary gland differentiation. *Int. Rev. Cytol.* **125**, 165-202.
- Santhanan V, Ray A and Sehgal PB. (1991). Repression of the *interleukin 6* gene promoter by p53 and the *retinoblastoma* susceptibility gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7605-7609.
- Schodin DJ, Zhuang Y, Shapiro DJ and Katzenellenbogen BS. (1995). Analysis of mechanisms that determine dominant negative estrogen receptor effectiveness. *J. Biol. Chem.* **270**, 31163-31171.
- Searle AG and Beechey CV. (1978). Complementation studies with mouse translocations. *Cytogenet. Cell. Genet.* **20**, 282-303
- Senior PV, Tucci J, Blythe NL and Beck F. (1996). Expression of *IGF-2* and *H19* mRNA in the neonatal rat during normal maturation and after dexamethasone administration. *J. Mol. Endocrinol.* **17**, 217-223.

- Skinner MA, Vollmer R, Huper G, Abbott P and Inglehart JD. (1990). Loss of heterozygosity for genes on 11p and the clinical course of patients with lung carcinoma. *Cancer Res.* **50**, 2303-2306.
- Sorensen TS, Girling R, Lee C-W, Gannon , Bandara LR and La Thangue NB. (1996). Functional interaction between DP-1 and p53. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5888-5895.
- Subler MA, Matin DW and Deb S. (1992). Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J. Virol.* **66**, 4757-4762.
- Sutcliffe JS, Nakao M, Christian S, Örstavik KH, Tommerup N, Ledbetter DH and Beaudet AL. (1994). Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nature Genet.* **8**, 52-58.
- Szabo PE and Mann JR. (1995). Allele-specific expression and total expression levels of imprinted genes during early mouse development: implications for imprinting mechanisms. *Genes & Dev.* **9**, 3097-3108.
- Takira KI, Sato T, Miyagi M, Watatani M, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Abe R and Nakamura Y. (1992). Correlation of loss of alleles on the short arms of chromosome 11 and 17 with metastasis of primary breast cancer to lymph nodes. *Cancer Res.* **52**, 3914-3917.
- Theillet C, Lidereau R, Escot C, Hutzell P, Brunet M, Gest J, Scholm J and Callahan R. (1986). Loss of a c-Ha-ras-1 allele and aggressive human primary breast carcinomas. *Cancer Res.* **46**, 4776-4781.
- Toder R, Wilcox SA, Smithwick M and Graves JA. (1996). The human/mouse imprinted genes IGF2, H19, SNRPN and ZNF127 map to two conserved autosomal clusters in a marsupial. *Chromosome Res.* **4**, 295-300.

- Tremblay KD, Duran KL and Bartolomei MS. (1997). A 5' 2-kilobase-pair region of the imprinted mouse *H19* gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4322-4329.
- Tycko B. Genomic imprinting: mechanism and role in human pathology. *Am. J. Pathol.* **144**, 431-443.
- Uyeno S, Aoki Y, Nata M, Sagisaka K, Kayama Tyoshimoto T, Ono T. (1996). *IGF-2* but not *H19* shows loss of imprinting in human glioma. *Cancer Res.* **56**, 5356-5359.
- Van Gurp RJHLM, Oosterhuis JW, Kalschever V, Mariman CM and Looijenga LHV. (1994). Biallelic expression of the *H19* and *IGF2* genes in human testicular germ cell tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 70-75.
- Velculescu VE and El Deiry WS. (1996). Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin. Chem.* **42**, 858-868.
- Villar AJ and Pedersen RA. (1994). Parental imprinting of the *Mas* protooncogene in mouse. *Nature Genet.* **8**, 373-379.
- Voutilainen R, Ilvesmäki V, Ariel I, Rachmilewitz J, de Groot N and Hochberg A. (1994). Parallel regulation of parentally imprinted *H19* and *IGF2* genes in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology.* **134**, 2051-2056.
- Wada M, Seeger RC, Mizoguchi H and Köeffer HP. (1995). Maintenance of normal imprinting of *H19* and *IGF-2* genes in neuroblastoma. *Cancer Res.* **55**, 3386-3388.
- Walsh C, Miller SJ, Flam F, Fisher RA and Ohlsson R. (1995). Paternally derived *H19* is differentially expressed in malignant and nonmalignant trophoblast. *Cancer Res.* **55**, 1111-1116.

- Webber AL, Ingram RS, Levorse JM and Tilghman SM. (1998). Location of enhancers is essential for the imprinting of *H19* and *Igf2* genes. *Nature* **391**, 711-715.
- Weigel NL and Zhang Y. (1998). Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J. Mol. Med.* **76**, 469-479.
- Wernert N, Gilles F, Fafeur V, Bouali F, Raes MB, Pyke C, Dupressoir T, Seitz G, Vandebunder B and Stéhelin D. (1994). Stromal expression of *c-ets-1* transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res.* **54**, 5683-5688.
- Yballe C, Vu TH and Hoffman AR. (1996). Imprinting and expression of *IGF-2* and *H19* in normal breast tissue and breast tumor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 1607-1612.
- Yoo-Warren H, Pachnis V, Ingram RS and Tilghman SM. (1988). Two regulatory domain flank the mouse *H19* gene. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4707-4715.
- Zambetti GP, Bargonetti J, Walker K, Prives C and Levine AJ. (1992). *Genes & Dev.* **6**, 1143-1152.
- Zhan S, Shapiro DN and Helman LJ. (1994). Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma. *J. Clin. Invest.* **94**, 445-448.
- Zhang Y and Tycko B. (1992). Monoallelic expression of the human *H19* gene. *Nature Genet.* **1**, 40-44.

- Zemel S, Bartolomei MS and Tilghman SM. (1992). Physical linkage of two mammalian imprinted genes, *H19* and *IGF-2*. *Nature Genet.* **2**, 61-65.
- Zimmer A, Zimmer A M and Reynolds K. (1994). Tissue specific expression of the retinoic acid receptor- $\beta$ 2: regulation by short open reading frames in the 5'-noncoding region. *J. Cell Biol.* **127**, 1111-1119.

## PUBLICATIONS

---

1) Dugimont T., Montpellier C., **Adriaenssens E.**, Lottin S., Dumont L., Iotsova V., Lagrou C., Stéhelin D., Coll J. and Cury J.J. (1998). The *H19* TATA-less promoter is efficiently repressed by the wild type tumor suppressor gene product p53. *Oncogene*, **16**, 2395-2401.

2) **Adriaenssens E.**, Dumont L., Lottin S., Bolle D., Delobelle A., Dugimont T., Coll J. and Cury J.J. (1998). *H19* overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumor values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression. *Am. J. Pathol.*, **153**, 1597-1607.

3) **Adriaenssens E.**, Lottin S., Dugimont T., Fauquette W., Coll J., Dupouy J.P., Boilly B. and Cury J.J. Steroid hormones modulate *H19* gene expression in both mammary gland and uterus. *Oncogene*, soumis.

SHORT REPORT

## The *H19* TATA-less promoter is efficiently repressed by wild-type tumor suppressor gene product p53

Thierry Dugimont<sup>1,2</sup>, Claire Montpellier<sup>3</sup>, Eric Adriaenssens<sup>1</sup>, Séverine Lottin<sup>1</sup>, Lionel Dumont<sup>1</sup>, Violette Iotsova<sup>3</sup>, Christian Lagrou<sup>3</sup>, Dominique Stéhelin<sup>3</sup>, Jean Coll<sup>3</sup> and Jean-Jacques Cury<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Biologie Cellulaire, Unité 'Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses' (EA 1033), SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex; <sup>2</sup>Faculté des Sciences Jean Perrin, Université d'Artois, 62307 Lens cedex; <sup>3</sup>Unité d'Oncologie Moléculaire, CNRS U.R.A. 1160, Institut Pasteur, rue Calmette, 59019 Lille cedex, France

The developmentally regulated *H19* gene displays several remarkable properties: expression of an apparently non-translated mRNA, genomic imprinting (maternal allele only expressed), relaxation of the imprinting and/or epigenetic lesions demonstrated in some tumors. Despite several observations after relaxation of imprinting status of the gene, data on *trans* and *cis*-acting factors required for the human *H19* gene expression are still missing. As a first approach to address identification of factors involved in the regulation of the gene, we found that cells from a *p53* antisense-transfected HeLa clone displayed increased amounts of *H19* transcripts when compared to the non-transfected cells. Moreover, a HeLa clone stably transfected with a temperature sensitive (ts) 143 Ala *p53* mutant exhibited temperature-dependent regulation of *H19* expression. This preliminary indication of the repressing effect of the *p53* protein on *H19* expression has been confirmed by transient cotransfection experiments in HeLa cells, using luciferase surrogate constructs under the control of the 823 bp sequence immediately upstream of the transcription start point of the *H19* gene, and different constructs containing sense, antisense or a ts 143 Ala mutant *p53* cDNA. We observed an increase of *H19* promoter-driven activity in transient cotransfections with the antisense *p53* cDNA and the temperature sensitive mutant *p53* at the non-permissive temperature, but a decrease with sense wild-type *p53* cDNA. Furthermore, the cotransfection experiments were repeated in a cell line lacking endogenous *p53*. (Calu 6 cells) and the results provided additional evidence for a down regulation of the expression of the *H19* gene by the *p53* protein.

**Keywords:** *H19*; *p53*; tumor suppressor; gene regulation; TATA-less promoter

The *H19* gene encodes a spliced and polyadenylated RNA which is expressed at a high level in a wide variety of fetal tissues when cell differentiation occurs. *H19* transcripts accumulate in tissues of endodermal and mesodermal origin (Pachnis *et al.*, 1988; Wiles, 1988; Poirier *et al.*, 1991; Rachmilewitz *et al.*, 1992a). After birth the gene is repressed in almost all tissues

but remains detectable in a few adult organs (muscles, mammary glands) (Brunkow and Tilghman, 1991; Leibovitch *et al.*, 1991; Poirier *et al.*, 1991; Han and Liau, 1992; Rachmilewitz *et al.*, 1992a; Dugimont *et al.*, 1995). Furthermore, the *H19* gene is highly expressed in a variety of tumors (Douc-Rasy *et al.*, 1993, 1996; Rainier *et al.*, 1993; Moulton *et al.*, 1994; Dugimont *et al.*, 1995; Elkin *et al.*, 1995; Kondo *et al.*, 1995; Rachmilewitz *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 1995). Because of the apparent lack of evolutionary conserved open reading frames the protein-coding potential of *H19* remains uncertain. Thus, it has been proposed that the gene may act directly at the level of its RNA, perhaps through the formation of a ribonucleoprotein particle (Brannan *et al.*, 1990). However in transient transfections using different constructs, a *H19* protein, synthesized from the largest putative open reading frame (ORF 6 coding a 26 kDa product), has been observed after using extensive deletions and/or point mutations of the nucleotide sequence upstream of this ORF (Joubel *et al.*, 1996).

*H19* is subject to parental imprinting in mouse and human, with the inactive paternal allele fully methylated at numerous CpG dinucleotides both in the promoter and in the transcribed region of the gene, while the active maternal allele displays largely unmethylated sites (Bartolomei *et al.*, 1991, 1993; Zhang and Tycko, 1992; Rachmilewitz *et al.*, 1992b; Rainier *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Ferguson-Smith *et al.*, 1993). To date, the function of the *H19* gene remains enigmatic: a tumor-suppressor role for *H19* has been substantiated in two human embryonic tumor cell lines (G401 and RD) by Hao *et al.* (1993), but Reid *et al.* (1996) have not been able to reproduce these results. Then, the expression of this gene has been associated with tumorigenous processes (Rachmilewitz *et al.*, 1995; Cooper *et al.*, 1996). Finally, Ariel *et al.* (1997) proposed that *H19* product is an oncofetal RNA and neither a tumor suppressor gene nor an oncogene.

It has been well established that the *p53* cellular protein is implicated in the control of cell proliferation and tumor progression (Levine, 1990). Indeed, allelic losses and mutations in the *p53* gene are frequently observed in many types of tumors and *p53* over-expression efficiently inhibits oncogene-mediated transformation, indicating that *p53* is a tumor-suppressor gene (Finlay *et al.*, 1989; Elyahu *et al.*, 1989; Levine, 1990). One set of functions of *p53* is to down modulate the activity of a member of TATA-containing and TATA-less promoters (Ginsberg *et al.*, 1991).

Correspondence: J-J Cury

TD and CM made an equal contribution to this work.

Received 30 June 1997; revised 24 November 1997; accepted 25 November 1997



In this report, we demonstrate that the tumor-suppressor *p53* can actually down regulate the activity of the *H19* gene promoter which lacks a *p53* consensus site and a TATA box.

*Regulation of the H19 gene expression by p53 within stably transfected HeLa cells*

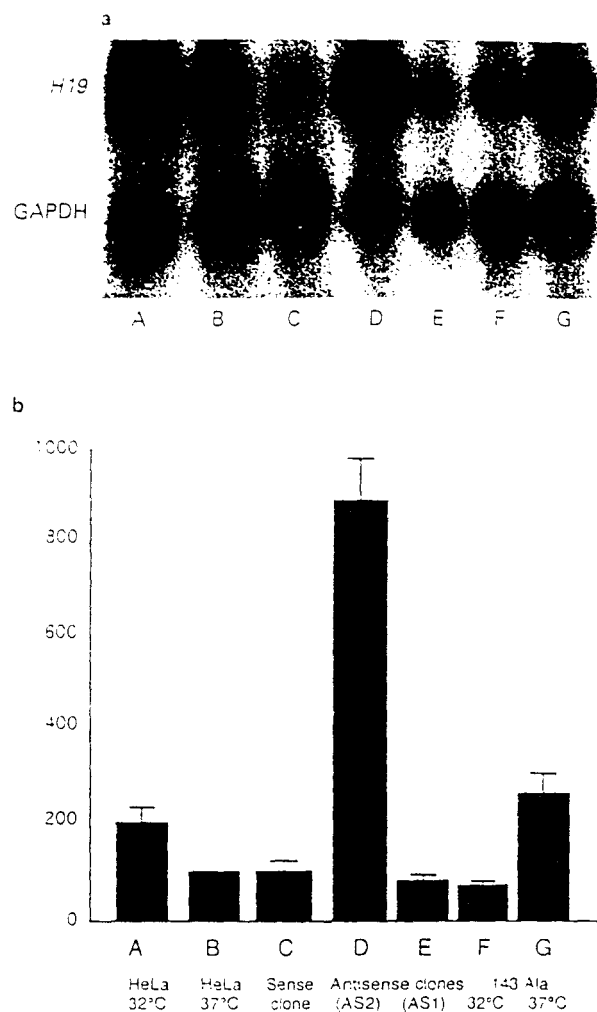
In a previous study, HeLa clones containing and expressing wild-type (w.t.) *p53* in sense and antisense orientation were selected (Iotsova and Stéhelin, 1995). The stably transfected antisense *p53* sequence induced alterations in HeLa cell morphology. Since the targeted degradation of w.t. *p53* is a result of association between the protein and the E6 protein of HPV 18, only a low level of free w.t. *p53* protein is present in these cells (Scheffner *et al.*, 1990), this property could explain the new phenotype displayed by the antisense clones. We have used this cell system for the demonstration of a repression of the *H19* gene promoter by w.t. *p53* protein.

The expression of the *H19* gene was examined in two different cell clones, stably transfected with the antisense *p53* encoding plasmid. After Northern-blot analyses, one clone (AS2) displayed an increase (ninefold) in *H19* gene expression (Figure 1, lane D) when compared to non-transfected HeLa cells (Figure 1, lane B), while another one (AS1) displayed no significant difference in *H19* expression (Figure 1, lane E). HeLa cells expressing a sense *p53* sequence possessed the similar level of *H19* expression (Figure 1, lane C) as non-transfected HeLa cells. These data suggested that an antisense-triggered alteration in endogenous *p53* content could impair a possible negative action of *p53* on the *H19* gene expression.

To test this hypothesis, we measured *H19* expression in a HeLa clone stably transfected with a *p53* temperature sensitive mutant (143 Val>Ala, henceforth called 'ts 143 Ala mutant') (Iotsova, unpublished results). This mutant possessed a wild-type phenotype at the permissive temperature (32°C) and a mutant phenotype at non-permissive temperature (37°C) (Prives, 1994; Zhang *et al.*, 1994). On line with this predicted variation of phenotype towards *H19* regulation we found: (i) at 37°C, the level of *H19* RNAs was 3.5-fold higher than at 32°C (Figure 1, lanes F and G); (ii) this fold activation was 2.7 when expression was compared to that obtained with control HeLa cells grown at the same temperature (Figure 1, lanes B and G). These data suggest that the ts 143 Ala mutation exerted a deleterious effect and the altered *p53* protein could no longer down-regulate *H19* gene expression. Differences obtained at 32°C or 37°C were not due to a direct and temperature-dependent down regulation of expression since no decrease of *H19* RNAs accumulation was observed when control HeLa cells were cultured at 32°C (Figure 1, lanes A and B). On the contrary, these results show a significant (twofold) activation of the endogenous *H19* gene expression in HeLa cells at 32°C. This strengthens the notion that at permissive temperature the altered *p53* protein recovers widely its w.t. control on the *H19* gene expression.

In order to obtain additional evidence on the regulation of *H19* gene expression by *p53* protein at the cellular level, *in situ* hybridization (ISH) experi-

ments were performed using various stably transfected HeLa clones. ISH confirmed all the results of Northern blot analyses and localization of *H19* transcripts was



**Figure 1** Expression of the *H19* gene in w.t. *p53* sense and antisense and ts 143 Ala-mutant *p53* (conferring a thermosensitive phenotype) stably transfected HeLa cells. Cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Boehringer Mannheim, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum and 1 mM sodium pyruvate. Cell treatments and transfections were as described by Iotsova and Stéhelin (1995). Total RNAs were prepared from confluent cells by the guanidium isothiocyanate-CsCl gradient method (Ullrich *et al.*, 1977; Glisin *et al.*, 1974; in Sambrook *et al.*, 1989). Denatured RNA samples (20  $\mu$ g/well) were fractionated on a formaldehyde (1.2%) agarose gel, transferred to a Hybond C Extra filter and analysed by Northern-blot hybridization. RNA amounts were quantified by hybridizing a [<sup>32</sup>P]dCTP GAPDH (Glutaraldehyde-3-Phosphate-DeHydrogenase) probe. Hybridizations were performed in stringent conditions with a 1.2 kbp *H19* cDNA fragment labeled by random priming using [<sup>32</sup>P]dCTP. (a) Northern-blot performed with a *H19* probe and RNA extracted from different HeLa clones. (b) *H19* expression diagram deduced from the signals obtained from the same experiment using a PhosphorImager 425 (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA USA). Lanes A and B: RNA extracted from wild-type HeLa cells at 32°C and 37°C respectively. Results were normalized by using the *H19* GAPDH signal ratio. At 37°C the *H19* GAPDH ratio is considered to be 100 (Lane B). Lane C: RNA extracted from *p53* sense sequence transfected HeLa cells at 37°C. Lane D: RNA extracted from *p53* antisense sequence (AS2) transfected HeLa cells at 37°C. Lane E: RNA extracted from *p53* antisense sequence (AS1) transfected HeLa cells at 37°C. Lanes F and G: RNA extracted from ts 143 Ala *p53* mutant sequence transfected HeLa cells at 32°C and 37°C, respectively. Quantitative results in b are provided by the mean values of three independent experiments.

essentially cytoplasmic, as was previously mentioned by Brannan *et al.* (1990) (data not shown).

*Regulation of the H19 promoter activity by p53 in transiently transfected HeLa cells*

In stably transfected HeLa cells of this first series of experiments, difference appeared between the endogenous *H19* gene expression in the two tested antisense p53 clones (Figure 1, lanes D and E). We propose that this discrepancy can be explained by the more elevated copy number of exogenous p53 sequences observed in the AS2 clone, roughly corresponding to ten copies as compared to the band of the endogene (Iotsova and Stéhelin, 1995). Then, to try to overcome this ambiguity and to investigate the mechanism whereby p53 protein regulates the expression of the *H19* gene, we used the different versions of p53 sequences mentioned above in transiently transfected HeLa cells. These experiments allowed us to test a targeted p53 transcription control on a *H19* active region (823 bp) containing the minimal promoter.

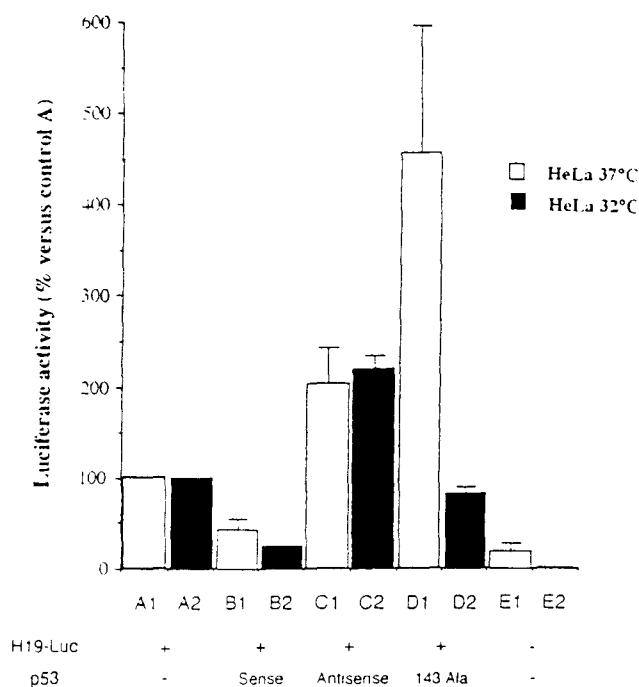
The experiments were performed using a ratio of 5:1 expressed p53 derived sequences and reporter plasmid (luciferase assays) in transfections. However, the inverted ratio gave similar results (data not shown). The transfection experiments were repeated four times and the results are summarized in Figure 2. Cotransfection of both pGL2 containing the *H19* promoter region coupled with the luciferase (LUC) gene (pGL2-H19-LUC) and a p53 sense cDNA decreased the LUC activity (twofold, Figure 2, A1 and B1) and that cotransfection of pGL2 containing *H19* promoter with p53 antisense cDNA led to an increase of LUC expression (about twofold, Figure 2, A1 and C1). Specificity of reactions was ascertained by controls performed by cotransfecting HeLa cells with the two empty plasmids (Figure 2, E1).

To establish whether p53 gene product activity was mediated through its wild-type state, we tested the previously characterized ts 143 Ala mutant p53. At the non-permissive temperature (37°C), the mutated phenotype was revealed by a 4.5-fold increase in LUC activity when compared to cells transfected with the reporter gene alone (Figure 2, A1 and D1).

Owing properties of the ts 143 Ala mutant, we performed a new series of experiments at a permissive temperature (32°C). As it could be expected from its sensitive phenotype, the mutant loosed its transrepression effect at this temperature and displayed a weak decrease (about 0.8-fold) of the expression of the reporter gene (Figure 2, A2 and D2); this data is dramatically different of that one obtained at 37°C (Figure 2, D1 and D2).

In other respects, results obtained with sense and antisense constructs at 32°C were similar to those at 37°C concerning the repressing and enhancing effects, respectively (Figure 2, lanes A2, B2, C2 and A1, B1, C1).

In conclusion of this series of transient transfection experiments we propose: (i) The increased LUC activity, observed with the ts 143 Ala mutant at 37°C, could be explained by a negative trans-dominant action of the 143 Ala mutated p53 protein. Indeed, it has been previously demonstrated that p53 gene products act as oligomers complexes and cross-



**Figure 2** Regulation of the reporter gene (*luciferase*, LUC) expression via the *H19* promoter active region by different versions of p53 in transiently transfected HeLa cells. The latter were transiently cotransfected with the plasmid pGL2 containing the *H19* promoter region (823 bp) associated with the LUC gene reporter and the plasmid pL15TK containing a sequence coding for different transcripts of the p53 gene (sense p53, antisense p53 and ts 143 Ala p53 mutant). The region of 823 bp immediately upstream to the human *H19* transcriptional start site (Brannan *et al.*, 1990) was amplified by PCR from a 15 kbp genomic clone containing the gene together with 5' and 3' flanking sequences using primers 5'-AACAACCCCTACCAAAGGCC-3' (upstream) and 5'-CCGGATCCTCGGTCTAGCCCGG-3' (downstream). The resulting PCR product was cloned in the PCR II vector (TA cloning kit, Invitrogen, San Diego, CA), excised with *Xho*I and *Hind*III, and ligated into the *Xho*I and *Hind*III sites of pGL2 basic vector. The pGL2 basic vector alone was used as a negative control. Informations upon p53 constructs can be obtained in Iotsova and Stéhelin (1995). Cotransfections were performed by using lipofectamine<sup>TM</sup> reagent (Gibco BRL, Life Technologies Inc.). 0.5 µg of the reporter plasmid and 2.5 µg of the tested plasmid were used for cotransfection of cells from a 90 mm dish. Cells were incubated with reagents for 6 h at 37°C or 32°C followed by change of the culture medium. Forty-eight hours after transfection, cells were harvested with a reporter lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA). Prior to LUC assays, total proteins were determined by densitometry (DU<sup>R</sup>64 Spectrophotometer, Beckman) at 595 nm wavelength. LUC assays were performed by adding 85 µl of sample to 100 µl of a mix containing: mix luciferase 100 mM, ATP 20 mM, LUC buffer. LUC activities were performed by a lumat LB 9501 (Berthold). Lanes A1 to E1 and A2 to E2: cotransfections and cultures performed at 37°C and 32°C, respectively. A1 and A2: cotransfections of pGL2-H19-LUC with empty pL15TK are the control of basal LUC expression (100-index). B1 and B2: LUC with pL15TK-p53s. C1 and C2: LUC with pL15TK-p53AS. D1 and D2: LUC with pL15TK-143 Ala p53 mutant. E1 and E2: cotransfections of the two empty plasmids (pGL2, pL15TK) used as negative control. The values shown represent the means of four independent experiments.

oligomerization of mutant with w.t. p53 is the origin of dominant negative phenotype of ts 143 Ala mutant (Milner and Medcalf, 1991; Bargonetti *et al.*, 1992; Shaulian *et al.*, 1992; Friedman *et al.*, 1993). Therefore, mutated p53 products could interact with w.t. p53 endogenous proteins remaining in HeLa cells and inhibit their down-regulation properties; (ii) Dramatic

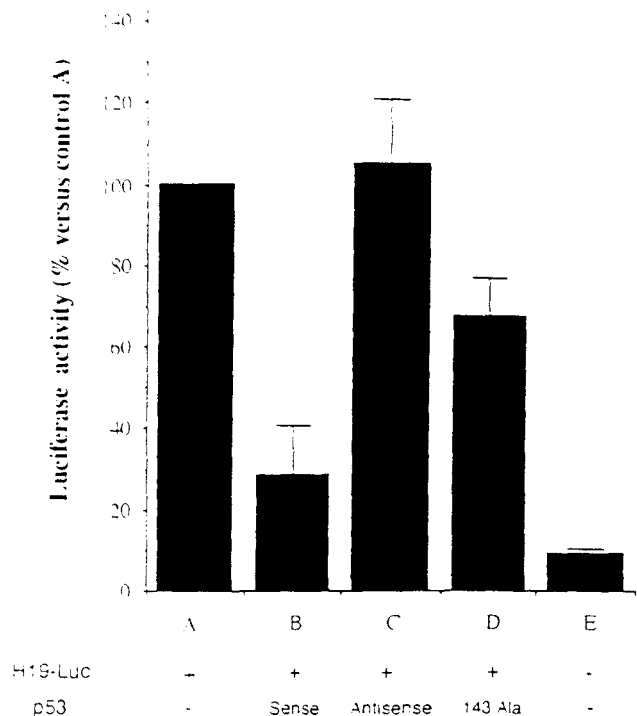
differences in LUC activities were observed from the ts 143 Ala mutant construct assayed at 32 C and 37 C. At 32 C, mutated p53 displayed a wt.-like property and acquired a rough wt.-conformation that induced a decrease of the reporter gene expression, when compared to the basal expression. Nevertheless, this inhibition of expression is weaker than those obtained when cotransfections were performed with H19-LUC and p53 sense; (iii) The sense and antisense constructs gave similar data at both the 32 C and 37 C temperatures; these results corroborate those observed in stably transfected HeLa cells. The weak discrepancies observed between the down-regulation of the *H19* promoter by the p53 sense sequence at 32 C versus 37 C and the up-regulation of the promoter of interest by p53 antisense sequence at the two assayed temperatures reflect probably a better transfection efficiency recorded in our hands at 32 C than at 37 C.

*Regulation of the H19 promoter activity by p53 protein within transiently transfected Calu 6 cells*

HeLa cells contain a low level of free wt. p53 protein. Nevertheless, in our experiments this low amount of p53 protein was still competent for transcriptional regulation of the *H19* promoter activity. However, it seems difficult to evaluate the involvement of endogenous wt. p53 protein during the cotransfection experiments. To address this problem, p53 null Calu 6 cells were chosen for a new series of cotransfection experiments. Data from three series of experiments are summarized in Figure 4. Cotransfection of H19-LUC with p53 sense constructs downregulated the reporter gene activity (about fivefold, Figure 3a and b), while as expected for a cell lacking any endogenous p53 protein cotransfection with p53 antisense had no effect on the expression of the reporter gene (Figure 3a and c). Controls were performed by cotransfecting Calu 6 cells by the two empty plasmids (Figure 3e). At 37 C, as could be expected, cotransfections of H19-LUC with the 143 Ala mutant led to the disappearance of the transdominant negative effect due to the absence of endogenous p53 protein in Calu 6 cells. On the contrary, a low decrease of the reporter gene activity was observed (about 0.7-fold, Figure 3a and d). Through mutated p53 proteins fold into altered complexes at 37 C, probably these complexes keep a residual activity and therefore are able to weakly downregulate the reporter gene expression.

*Concluding remarks*

Embryonic and neoplastic tissues share some common characteristics, i.e. rapid proliferation rate and ability of cells to migrate. These phenomena are strictly controlled and coordinated during fetal life, whereas in neoplastic tissues a loss of equilibrium between cell proliferation and tissue organization occurs. Numerous data show that *H19* transcripts are tightly linked both to differentiation in the fetus (Han and Liau, 1992; Han et al., 1996; Jinno et al., 1995; Kim et al., 1994; Pachnis et al., 1984, 1988; Poirier et al., 1991; Voutilainen et al., 1994) and tumorigenesis in the adult (Douc-Rasy et al., 1993, 1996; Dugimont et al., 1995; Elkin et al., 1995; Moulton et al., 1994). In accordance with these properties, Elkin et al. (1995)



**Figure 3** Regulation of the LUC reporter gene expression via the control of *H19* promoter active region by different transcripts of p53 in transiently transfected Calu 6 cells. Calu 6 cells obtained from a generous gift of Dr JF Cajot were propagated at 37 C in  $\alpha$ -MEM medium (Life Technologies) supplemented by 10% fetal calf serum and 1% sodium pyruvate. Cells were transiently cotransfected in similar conditions to those described for HeLa cells. (a) cotransfection of pGL2-H19-LUC with empty pL15TK as a control of basal LUC expression. (b) LUC with pL15TK-p53S. (c) LUC with pL15TK-p53AS. (d) LUC with pL15TK-ts 143 Ala p53 mutant. (e): cotransfection of the two empty plasmids (pGL2, pL15TK) as a negative control experiment. Each value is representative of the results obtained in three independent experiments

and Ariel et al. (1997) proposed that *H19* is an oncofetal gene and it is now established that this gene undergoes strict regulation with tissue and time specificities. But little is known on molecular mechanism of this regulation, beside imprinting and or role played by 3'-enhancers (Yoo-Warren et al., 1988; Surani, 1993; Eden and Cedar, 1995; Eversole-Cire et al., 1995; Leighton et al., 1995; Elson and Bartolomei, 1997). Owing the properties of p53 protein, as a product of a tumor suppressor gene, involved in control of cell proliferation (Fields and Jang, 1990; Kern et al., 1991; Raycroft et al., 1990), playing a role in growth arrest at the G1-S boundary of the cell cycle (Mereer et al., 1990) and causing apoptosis in response to DNA damage (Clarke et al., 1993; Lowe et al., 1993), we decided to test the hypothesis of a regulation by this key protein on the transcription of the oncofetal *H19* gene.

To address this hypothesis, we examined the effects of wt. sense, antisense and one mutant (ts 143 Ala) p53 gene sequences stably transfected in HeLa cells. We demonstrated a down-regulation of *H19* expression by wt. p53 protein, whereas both the antisense and mutant p53 sequences activated the transcription of the *H19* gene. These data indicate that the wt. p53 protein is active, but the mutated one is not. This conclusion is

supported by results obtained from transient cotransfections of HeLa cells with a reporter vector containing the *H19* promoter (823 bp) fused to the luciferase gene and with various vectors containing p53 cDNA in sense and antisense orientations, as well as the ts 143 Ala mutant of the p53 gene. In transient transfection experiments, the p53 negative regulation on the *H19* gene expression was greater than that observed in stably transfected cells (Figures 2 or 3 and 1, respectively). Thus these results indicate that the w.t. p53 product was more powerful on the ectopic *H19* promoter alone versus the complete *H19* endogene and suggest that other control elements are involved in defining relationship between *H19* and p53. Furthermore, this series of experiments delineated the sequence upstream the *H19* transcription start site exhibiting a *cis*-regulation of the repression. We were concerned that presence of endogenous p53 protein in HeLa cells, even in a low quantity, could induce a bias in the results obtained with these cells. We therefore performed an analogous series of experiments in the Calu 6 cells that are devoid of endogenous p53 gene. These experiments confirmed that the w.t. p53 protein exerts a transcriptional inhibition on the *H19* gene.

The interest of data reported here is strengthened by the following outlines: (1) transient and stably transfected HeLa cells gave similar results, (2) indications of a p53 regulation of the *H19* gene had not been established after only integration within recipient cells of a p53 sense encoding plasmids, but (3) the repression by p53 is also and principally based upon antisense p53 transcripts and the transdominant negative phenotype exhibited by a thermosensitive mutant; the potent role of this mutant was tested at permissive (32°C) and non-permissive (37°C) temperatures in cells provided or not with an endogenous p53 gene; all the interest of using the thermosensitive mutant hold in that *in vivo* modulation of p53 activity induced variations of the *H19* transcription level.

As both the p53 and *H19* genes are active during embryonic development and exhibit temporal and spatial expression patterns, it seems interesting to discuss whether any relationship could exist between the expression of the two genes. Schmid *et al.* (1991) described the *in situ* study of p53 gene expression during mouse embryogenesis. They demonstrated a high level of p53 transcription during early differentiation, but in tissues, undergoing terminal differentiation, p53 RNA expression declined and tissue-specific p53 expression patterns were observed. *H19* is also abundantly expressed in both extraembryonic and fetal tissues, and ISH studies performed on different mammals (human, Ariel *et al.*, 1997; mouse, Poirier *et al.*, 1991; rabbit, Han and Liau, 1992) during embryogenesis allow comparisons and indicate tissue-specific patterns of the *H19* gene expression, in some cases depending on the considered species. Any relationship between *H19* and p53 is not obvious: (a) in some organs expression of the two genes is strong (liver, placenta), but in others, expression of p53 is high, whereas *H19* expression is weak or absent (brain).

Now we must consider several p53 properties and the action of this product on the *H19* promoter. w.t. p53 activates transcription from promoters with p53-binding sites and several target genes whose expression may be positively influenced through this way have

been identified. These include *MCK* (Zambetti *et al.*, 1992), *MDM2* (Barak *et al.*, 1993), *CIP1 WAF1 p21* (El Deiry *et al.*, 1993), *EGFR* (Deb *et al.*, 1994), *thrombospondin-1* (Dameron *et al.*, 1994), *GADD45* (Kastan *et al.*, 1992), *Bax* (Miyashita *et al.*, 1994) and *cyclin G* (Okamoto and Beach, 1994) genes.

However, w.t. (but not mutant) human p53 activates the *in vivo* or *in vitro* transcription of many cellular and viral genes with promoters harboring p53-binding sites. In addition to this positive regulatory activity, the physiological effect of p53 may also include down-regulation of genes in which the promoter is devoid of p53-binding sites (Ginsberg *et al.*, 1991; Santhanam *et al.*, 1991; Subler *et al.*, 1992). Thus, w.t. p53 products bind to the TBP (TATA-Binding Protein). Interaction between p53 and TBP may activate or inhibit transcription (Deb *et al.*, 1994). Although Mack *et al.* (1993) reported that the expression of TATA-less promoter genes are refractory to repression by p53, down-regulation as well as up-regulation of TATA-less or TATA-containing promoters were reported by several authors. Indeed, papers indicated p53-repression of genes that are needed for ongoing cell proliferation, including those of the  $\beta$ -actin, *c-fos*, *c-jun*, p53 (autoregulation), *hsc70* (Ginsberg *et al.*, 1991; Seto *et al.*, 1992). Several more recent studies showed that w.t. p53 negatively regulates the expression of various genes, with or without a TATA-box in their promoter, transcribed by RNA polymerase II: human *c-ets-1* and *c-ets-2*, P4 for minute virus of mice (MVM) (Iotsova *et al.*, 1996), fibronectin (Iotsova and Stéhelin, 1996), MAP-4 protein which is known to bind, polymerize and stabilize microtubules (Murphy *et al.*, 1996) or transcribed by RNA polymerase III: *Alu* template, *7SL RNA* gene (Chesnokov *et al.*, 1996). Furthermore, Shivakumar *et al.* (1995) reported that low levels of w.t. p53 protein transactivate the human PCNA promoter, whereas at high concentration w.t. p53 inhibits this promoter. Tumor-derived p53 mutants activate the PCNA promoter. These results emphasized the importance of p53 regulation on promoters depending on the w.t. p53 protein concentration within the nucleus, and clearly implicate w.t. p53 in the regulation of cell growth.

Analysis of the human *H19* sequence used as promoter in our study indicated that it is devoid of both TATA-box and p53-consensus sites. Then, functional activities of p53 protein were proposed to be relevant of relationships between protein-protein, displaying in particular interactions between p53 and the general transcription factors TBP and TAFs (TBP-associated factors) (Farmer *et al.*, 1996). Furthermore, Agoff *et al.* (1993) demonstrated that p53 both represses transcription from the *hsp70* promoter and also interacts with CCAAT binding factor (CBF), and Perrem *et al.* (1995) provided evidence that p53 can repress transcription from the SV40 promoter by preventing formation of transcription complexes involving transcription factors Sp1. Consequently, we cannot rule out that the transcriptional effect of w.t. p53 that we report here could be actually mediated by mechanisms involving fundamental protein-protein interaction, within the construction of the initiation complex necessary for the *H19* gene transcription.

Members of the E2F transcription factor family play a crucial role in activation or repression in the promoters

of cell-cycle regulated genes: this key position originates from establishment of trans-active association with DP family gene products. A competition between p53 and E2F for DP-1 association was demonstrated (Sorensen *et al.*, 1996). These products can also provide a trans-repression through association with the two well known tumor repressive systems: the already mentioned p53 and pRB-pocket proteins (p107 and p130) (Chellappan *et al.*, 1991). Then, it seemed important to look for E2F site presence in the *H19* promoter. Indeed, we localized two sites, at -40 and -469 bp from the transcription start point, exhibiting strong sequence homologies with the E2F sites found in promoters of human *cyclin E* (*CCNE*) and *RB* genes (Zwicker and Müller, 1997). These consensus E2F sites, especially the -40 one, could allow a *H19* gene down-regulation by p53 gene product as described by Sorensen *et al.* (1996). Then, as an approach to test this hypothesis we evaluated if these putative E2F-binding sites contribute to the *H19* promoter activity in transient expression assays. Experiments were performed in HeLa cells by using co-transfections with the reporter gene and E2F or DP-1 expressing vectors either alone or together. We observed a severe *H19* promoter repression with E2F or DP-1 expressing vector used alone, with a weaker effect of the latter. Co-transfections with E2F and DP-1 vectors together gave an intermediate repression. Experiments were performed three times (data not shown). These results are in agreement with the reported possibility of a transcription repression role played by E2F (Zwicker and Müller, 1997) and DP-1 (Jooss *et al.*, 1995). Furthermore, these preliminary results do not substantiate the hypothesis of a down-regulation of the *H19* promoter gene by p53 via a competition with DP-1 to E2F (Sorensen *et al.*, 1996).

Interestingly, our data suggest also that p53 can exert down-regulation of genes through oligomer complexes and account for the regulation of *H19* gene expression by p53 bioavailability. Finally, since the p53 tumor suppressor is mutated in a majority of human tumors (Pellegata and Ranzani, 1996; Velculescu and El Deiry, 1996), including breast cancers (Friedrichs *et al.*, 1993; Faille *et al.*, 1994; Barbareschi, 1996; Van der Kooy *et al.*, 1996), we propose that the acquired properties of several modified p53 proteins could explain the frequent overexpression of the *H19* gene in various types of cancers and numerous tumor cells mentioned in the introduction.

Results reported in this paper and comments place the *H19* gene within the core mechanism of the cell-cycle control and cell-proliferation, especially at the transition from G1 to S phases.

#### Acknowledgements

We thank Dr X Lu (Ludwig Institute for Cancer Research, St Mary's Hospital School, London, UK) for graciously providing E2F and DP-1 recombinated vectors. We also thank D Fernig (University of Liverpool, UK), JC D'Halluin (IRC, Lille), B Boilly and X Desbiens (University Lille I) for critical reading of the manuscript. This work was supported by Grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Ligue Nationale de Lutte contre le Cancer, the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and the Institut Pasteur de Lille. JJ Curgy holds Grants from the Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (Fé-GEFLUC) and the NORGINE-PHARMA laboratories (Paris).

#### References

- Agoff SN, Hou J, Linzer DIH and Wu B. (1993). *Science*, **259**, 84-87.
- Ariel I, Ayesh S, Perlman EJ, Pizov G, Tanos V, Schneider T, Erdmann VA, Podeh D, Komitowski D, Quasem AS, de Groot N and Hochberg A. (1997). *Mol. Pathol.*, **50**, 34-44.
- Barak Y, Juven T, Haffner R and Owen M. (1993). *EMBO J.*, **12**, 461-468.
- Barbareschi M. (1996). *Appl. Immunohistochem.*, **4**, 106-116.
- Bargonetti J, Reynisdottir J, Friedman PN and Prives C. (1992). *Genes & Dev.*, **6**, 1886-1898.
- Bartolomei MS, Webber AL, Brunkow ME, and Tighman SM. (1993). *Genes & Dev.*, **7**, 1663-1673.
- Bartolomei MS, Zemel S and Tilghman SM. (1991). *Nature*, **351**, 153-155.
- Brannan CI, Dees EC, Ingram RS and Tighman SM. (1990). *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 28-36.
- Brunkow ME and Tilghman SM. (1991). *Genes & Dev.*, **5**, 1092-1101.
- Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM and Nevins JR. (1991). *Cell*, **65**, 1053-1061.
- Chesnokov I, Chu W-M, Botchan MR and Schmid CW. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 7084-7088.
- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML and Wyllie AH. (1993). *Nature*, **362**, 849-852.
- Cooper MJ, Fischer M, Komitowski D, Shevelev A, Schulze E, Ariel I, Tykocinski ML, Miron S, Ilan J, de Groot N and Hochberg A. (1996). *J. Urol.*, **155**, 2120-2127.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA and Bouck N. (1994). *Nature*, **265**, 1582-1584.
- Deb SP, Munoz RM, Brown DR, Subler MA and Deb S. (1994). *Oncogene*, **9**, 1341-1350.
- Douc-Rasy S, Coll J, Barrois M, Joubel A, Prost S, Dozier C, Stéhelin D and Riou G. (1993). *Int. J. Onc.*, **2**, 753-758.
- Douc-Rasy S, Barrois M, Fogel S, Ahomadegbe JC, Stéhelin D, Coll J and Riou G. (1996). *Oncogene*, **12**, 423-430.
- Dugimont T, Curgy JJ, Wennert N, Delobelle A, Raes M-B, Joubel A, Stéhelin D and Coll J. (1995). *Biol. Cell*, **85**, 117-124.
- Eden S and Cedar H. (1995). *Nature*, **375**, 16-17.
- El Deiry WS, Tokino T, Velculescu T, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer EW, Kinzler KW and Vogelstein B. (1993). *Cell*, **75**, 815-825.
- Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O and Oren M. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8763-8767.
- Elkin M, Shevelev A, Schulze E, Tykocinsky M, Cooper M, Ariel I, Pode D, Kopf E, de Groot N and Hochberg A. (1995). *FEBS Letts.*, **374**, 57-61.
- Elson DA and Bartolomei MS. (1997). *Molec. Cell. Biol.*, **17**, 309-317.
- Eversole-Cire P, Ferguson-Smith AC, Surani MA and Jones PA. (1995). *Cell Growth Dif.*, **6**, 337-345.
- Faille A, de Cremoux P, Extra JM, Linares G, Espie M, Boursstyn E, de Rocquancourt A, Giacchetti S, Marty M and Calvo F. (1994). *Br. J. Cancer*, **69**, 1145-1150.
- Farmer G, Colgan J, Nakatani Y, Manley JL and Prives C. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4295-4304.

- Fergusson-Smith AC, Sasaki H, Cattanaich BM and Surani MA. (1993). *Nature*, **362**, 751–755.
- Fields S and Jang SK. (1990). *Science*, **249**, 1046–1049.
- Finlay C, Hinds PW and Levine AJ. (1989). *Cell*, **57**, 1083–1093.
- Friedman PN, Chen X, Bargonetti J and Prives C. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3319–3323.
- Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H and Jonat W. (1993). *Cancer*, **72**, 3641–3647.
- Ginsberg D, Mehta F, Yaniv M and Oren M. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9979–9983.
- Glisin V, Crkvenjakov R and Byus C. (1974). *Biochemistry*, **13**, 2633.
- Han DKM, Khaing ZZ, Pollock RA, Haudenschild CC and Liao G. (1996). *J. Clin. Invest.*, **97**, 1276–1285.
- Han DKM and Liao G. (1992). *Circulation Res.*, **71**, 711–719.
- Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E and Tycko B. (1993). *Nature*, **365**, 764–767.
- Iotsova V, Crepieux P, Montpellier C, Laudet V and Stéhelin D. (1996). *Oncogene*, **13**, 2331–2337.
- Iotsova V and Stéhelin D. (1995). *Eur. J. Cell Biol.*, **68**, 122–132.
- Iotsova V and Stéhelin D. (1996). *Cell Growth Diff.*, **7**, 629–634.
- Jinno Y, Ikeda Y, Yun K, Maw M, Masuzaki H, Fukuda H, Inuzuka K, Fujishita A, Ohtani Y, Okimoto T, Ishimaru T and Niikawa N. (1995). *Nature Genet.*, **10**, 318–324.
- Jooss K, Lam EW, Bybee A, Girling R, Muller R and La Thangue NB. (1995). *Oncogene*, **10**, 1529–1536.
- Joubel A, Curgy JJ, Pelczar H, Begue A, Lagrou C, Stéhelin D and Coll J. (1996). *Cell. Mol. Biol.*, **42**, 1159–1172.
- Kastan MB, Zhan Q, El Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B and Fornace AJ Jr. (1992). *Cell*, **71**, 587–597.
- Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C and Vogelstein B. (1991). *Science*, **252**, 1708–1711.
- Kim D-K, Zhang L, Dzau VJ and Pratt RE. (1994). *J. Clin. Invest.*, **93**, 355–360.
- Kondo M, Susuki H, Ueda R, Osada H, Takagi K, Takahashi T and Takahashi T. (1995). *Oncogene*, **10**, 1193–1198.
- Leibovitch MP, Nguyen VC, Gross MC, Solhonne B, Leibovitch SA and Bernheim A. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **180**, 1241–1250.
- Leighton PA, Saam JR, Ingram RS, Stewart CL and Tilghman SM. (1995). *Genes & Dev.*, **9**, 2079–2089.
- Levine AJ. (1990). *BioAssays*, **12**, 60–66.
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA and Jacks T. (1993). *Nature*, **362**, 847–849.
- Mack DH, Vartikar J, Pipas JM and Laimins L. (1993). *Nature*, **363**, 281–283.
- Mercer WE, Shields MT, Amin M, Sauve GJ, Appella E, Romano JW and Ullrich SJ. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1958–1962.
- Milner J and Medcalf E. (1991). *Cell*, **65**, 765–774.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B and Reed JC. (1994). *Oncogene*, **9**, 1799–1805.
- Moulton T, Crenshaw T, Hao Y, Moosikasuwon J, Lin N, Dembitzer F, Hensle T, Weiss L, McMorro L, Loew T, Kraus W, Gerald W and Tycko B. (1994). *Nature Genet.*, **7**, 440–447.
- Murphy M, Hinman A and Levine AJ. (1996). *Genes & Dev.*, **10**, 2971–2980.
- Okamoto K and Beach D. (1994). *EMBO J.*, **13**, 4816–4822.
- Pachnis V, Belayew A and Tilghman SM. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5523–5527.
- Pachnis V, Brannan CI and Tilghman SM. (1988). *EMBO J.*, **7**, 673–681.
- Pellegata NS and Ranzani GN. (1996). *Eur. J. Histochem.*, **40**, 273–282.
- Perrem K, Rayner J, Voss T, Sturzbecher H, Jackson P and Braithwaite A. (1995). *Oncogene*, **11**, 1299–1307.
- Poirier F, Chan CTJ, Timmons PM, Robertson EJ, Evans MJ and Rigby PWJ. (1991). *Development*, **113**, 1105–1114.
- Prives C. (1994). *Cell*, **78**, 543–546.
- Rachmilewitz J, Gileadi U, Eldar-Geva T, Schneider T, de Groot N and Hochberg A. (1992a). *Mol. Reprod. Dev.*, **32**, 196–202.
- Rachmilewitz J, Goshen R, Ariel I, Schneider T, de Groot N and Hochberg A. (1992b). *FEBS Lett.*, **309**, 25–28.
- Rachmilewitz J, Elkin M, Rosensaft J, Gelman-Kohan Z, Ariel I, Lustig O, Schneider T, Goshen R, Biran H, de Groot N and Hochberg A. (1995). *Oncogene*, **11**, 863–870.
- Raycroft L, Wu H and Lozano G. (1990). *Science*, **249**, 1049–1051.
- Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE and Feinberg AP. (1993). *Nature*, **362**, 747–749.
- Reid LH, West A, Gioli DG, Phillips KK, Kelleher KF and Araujo D. (1996). *Human Mol. Genet.*, **5**, 239–247.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2nd Ed. CSH Press, Plainview, New-York, 7.19–7.22.
- Santhanam V, Ray A and Sehgal PB. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7605–7609.
- Seto E, Usheva A, Zambetti GP, Momand J, Horikoshi N, Weinmann R, Levine AJ and Shenk T. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 12028–12032.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ and Howley PM. (1990). *Cell*, **63**, 1129–1136.
- Shaulian E, Zauberman A, Ginsberg D and Oren M. (1992). *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5581–5592.
- Shivakumar CV, Brown DR, Deb S and Deb SP. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6785–6793.
- Schmid P, Lorenz A, Hameister H and Montenarh M. (1991). *Development*, **113**, 857–865.
- Sorensen TS, Girling R, Lee C-W, Gannon J, Bandara LR and La Thangue NB. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 5888–5895.
- Subler MA, Martin DW and Deb S. (1992). *J. Virol.*, **66**, 4757–4762.
- Surani MA. (1993). *Nature*, **366**, 302–303.
- Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, Pictet E, Tisher E, Rutter WJ and Goodman HM. (1977). *Science*, **196**, 1313.
- Van der Kooy K, Rookus MA, Peterse HL and Van Leeuwen FE. (1996). *Am. J. Epidemiol.*, **144**, 924–933.
- Velculescu VE and El-Deiry WS. (1996). *Clin. Chem.*, **42**, 858–868.
- Voutilainen R, Ilvesmäki V, Ariel I, Rachmilewitz J, de Groot N and Hochberg A. (1994). *Endocrinol.*, **134**, 2051–2056.
- Walsch C, Miller SJ, Flam F, Fisher RA and Ohisson R. (1995). *Cancer Res.*, **55**, 1111–1116.
- Wiles MV. (1988). *Development*, **104**, 403–413.
- Yoo-Warren H, Pachnis V, Ingram RS and Tilghman SM. (1988). *Molec. Cell. Biol.*, **8**, 4707–4715.
- Zambetti GP, Bargonetti J, Walker K, Prives C and Levine AJ. (1992). *Genes & Dev.*, **6**, 1143–1152.
- Zhang W, Guo X-Y, Hu G-Y, Liu W-B, Shay J and Deisseroth A. (1994). *EMBO J.*, **13**, 2335–2344.
- Zhang Y, Shields T, Crenshaw T, Hao Y, Moulton T and Tycko B. (1993). *Am. J. Hum. Genet.*, **53**, 113–124.
- Zhang Y and Tycko B. (1992). *Nature Genet.*, **1**, 40–44.
- Zwicker J and Müller R. (1997). *Trends Genet.*, **13**, 3–6.

# H19 Overexpression in Breast Adenocarcinoma Stromal Cells Is Associated with Tumor Values and Steroid Receptor Status but Independent of p53 and Ki-67 Expression

Eric Adriaenssens,\* Lionel Dumont,\*  
Séverine Lottin,\* Domitille Boile,\* Alain Leprêtre,†  
Alice Delobelle,‡ Fatima Bouali,§  
Thierry Dugimont,¶|| Jean Coll,|| and  
Jean-Jacques Cury\*

From the Centre de Biologie Cellulaire,\* Unité Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses, and Laboratoire d'Ecologie Numérique,† Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, and the Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique,‡ Centre Oscar Lambret, and Régulation des Processus Invasifs, de l'Angiogenèse et de l'Apoptose§ and Immunopathologie Cellulaire des Maladies Infectieuses,¶ Institut de Biologie Moléculaire, Institut Pasteur, Lille, France; and Faculté des Sciences Jean Perrin,|| Université d'Antois, Lens, France

In a previous study we described the expression of the *H19* gene by *in situ* hybridization (ISH) in normal breast and in benign or malignant breast tumors (Dugimont T, Cury JJ, Wernert N, Delobelle A, Raes MB, Joubel A, Stéhelin D, Coll J: *Biol Cell* 1995, 85:117–124). In the present work, 1) we extend the previous one to a statistically useful number of adenocarcinomas, including 10 subclasses, 2) we provide information on the precise ISH localization of the *H19* RNA by using, on serial tissue sections, antibodies delineating specifically the stromal or the epithelial component of the breast, and 3) we consider relationships between the *H19* gene expression and various clinicopathological information as tumor values (T0 to T4), grades, steroid receptors, lymph node status, and molecular features as the p53 gene product and the Ki-67/MIB-1 protein, which is specific to proliferating cells. Data indicate that 1) in 72.5% of studied breast adenocarcinomas an overall *H19* gene expression is increased when compared with healthy tissues, 2) the *H19* gene is generally overexpressed in stromal cells (92.2%) and rarely in epithelial cells (2.9% only), 3) an up-regulation of the *H19* gene is significantly correlated with the tumor values and the presence of both estrogen and progesterone receptors, and 4) at the cellular level, the *H19* gene demonstrates an independent expression versus accumulation of both the p53 protein and the Ki-67/MIB-1 cell-cycle marker. (*Am J Pathol* 1998, 153:1597–1607)

*H19* is a developmentally regulated gene. Thus, it is highly expressed in several fetal tissues, except in the nervous system and thymus,<sup>1–5</sup> and repressed after birth in most of the organs. In adulthood, a basal *H19* gene expression has been detected only in mammary gland,<sup>4,6</sup> cardiac and skeletal muscles,<sup>7,8</sup> and to a lesser extent in kidney, adrenal gland, and lung.<sup>9</sup>

The *H19* gene codes for a capped, spliced, and polyadenylated RNA. It is highly conserved in vertebrates, as homologous sequences have been detected in rabbit,<sup>10</sup> mouse,<sup>1</sup> chicken, monkey, and human.<sup>4,11</sup> The protein-coding potential of *H19* RNA remains uncertain, and it has been proposed that this gene may act as an RNA.<sup>11</sup> However, introduction of deletions or point mutations into the 5'-untranslated region (5'UTR) of an ectopic *H19* gene, upstream of the largest open reading frame (ORF6), enabled the production of a 26-kd protein,<sup>12</sup> although this has not been detected in cells expressing an endogenous *H19* gene.

The *H19* gene is located at 11p15.5 and is imprinted with only the maternal allele being expressed.<sup>9,13</sup> *H19* maps closely to another imprinted gene, *IGF-II*, but in the latter case it is the paternal allele that is transcribed. It has been reported that loss of heterozygosity (LOH) of a specific parental allele could be associated with the activation of a gene in cancers,<sup>14</sup> and LOH of 11p<sup>15</sup> was found in a wide variety of tumors, including some Wilms' tumor<sup>15–17</sup> and lung,<sup>18</sup> liver,<sup>19</sup> ovarian, and breast cancers.<sup>20,21</sup> Loss of imprinting of *IGF-II* has been described in a subset of Wilms' tumors. One hallmark of Wilms' tumors is the high levels of expression of the *IGF-II* gene, which has generated suggestions that an overdosage of the product of this gene contributes to Wilms' tumorigenesis.<sup>22</sup> In some Wilms' tumors (approximately one-third)

---

Supported by grants from Association de la Recherche sur le Cancer (ARC, Villejuif), the Ligue Nationale de Lutte contre le Cancer (Paris), and the Pasteur Institute in Lille. J.J. Cury holds grants from the Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (Fé-GEFLUC) and from the NORGINE PHARMA laboratories (Paris).

Accepted for publication July 24, 1998.

Address reprint requests to Dr. Jean-Jacques Cury, Centre de Biologie Cellulaire, DRED 1033, Université des Sciences et Technologies de Lille, Batiment SN3, Villeneuve d'Ascq Cedex 59655, France. E-mail cury@univ-lille1.fr.



the transcriptionally silent maternal *IGF-II* allele is activated such that *IGF-II* expression occurs biallelically.<sup>23,24</sup> There is evidence (enhancer deletion) that sequences flanking the *H19* gene in the mouse control the nearby *IGF-II* gene in *cis*.<sup>25,26</sup> In the majority of Wilms' tumors the silencing of *H19* has been reported.<sup>27-31</sup> This transcriptional silencing was accompanied by DNA methylation of the maternal *H19* allele and activation of the maternal *IGF-II* allele.<sup>27-29</sup> Loss of imprinting of *H19* and/or *IGF-II* has been described in various cancers, including lung carcinomas,<sup>32</sup> rhabdomyosarcoma,<sup>33-35</sup> hepatoblastoma,<sup>24,36</sup> testicular germ cell tumors,<sup>37</sup> bladder carcinomas,<sup>38</sup> uterine cervix carcinomas,<sup>39</sup> and esophageal cancers.<sup>40</sup> On the contrary, in some tumors, maintenance of normal imprinting of the *H19* and/or *IGF-II* genes were observed (colorectal,<sup>40</sup> neuroblastoma,<sup>41</sup> glioma,<sup>42</sup> leiomyomata,<sup>43</sup> and breast<sup>44</sup>).

*H19* is overexpressed in a wide variety of cancers (breast,<sup>4,6</sup> head and neck,<sup>4,39</sup> papillary and follicular thyroid,<sup>4</sup> uterine cervix,<sup>4,39</sup> bladder,<sup>45,46</sup> adrenal tumor,<sup>47</sup> trophoblast,<sup>48</sup> lung,<sup>4,32</sup> and esophageal<sup>40</sup>).

To date, the actual function of the *H19* gene in cancer is still a matter of debate. Hao et al<sup>49</sup> demonstrated that introduction of an *H19* cDNA construct into G401 cells or RD rhabdomyosarcoma cells (two embryonal tumor cell lines) caused morphological changes and growth retardation. These investigators also reported that one *H19*-transfected G401 clone no longer formed tumors when injected into nude mice and that many clones had reduced growth in soft agar. These results made the *H19* gene a good candidate to be a tumor suppressor gene. This function attributed to *H19* was supported by several well documented works demonstrating the silencing of the *H19* gene in several Wilms' tumors.<sup>27,28</sup> However, Reid et al<sup>50</sup> reported that *H19* expression did not correlate with tumor suppression in their G401 cells (only two of the five nontumorigenic lines expressed *H19*). Otherwise, Cooper et al<sup>46</sup> demonstrated that *H19* is an onco-developmental marker during bladder tumor progression. Ariel et al<sup>51</sup> examined the expression of *H19* in tumor arising from tissues that express this gene in fetal life, and Verkerk et al<sup>52</sup> reported the expression pattern of *H19* in testicular germ cell tumors of adolescents and adults. These studies bring evidence that *H19* is not a tumor suppressor gene, and their authors proposed that its product is an oncofetal RNA. Recently, Lustig-Yariv et al<sup>53</sup> evaluated the level of *H19* expression in choriocarcinoma cell lines (JAr and JEG-3 cells) and in tumors formed by these cells after their injection into athymic nude mice; they concluded that their data assigned to the *H19* gene a role in contradiction with the tumor suppressor function proposed by others. Consequently, the role of *H19* is still enigmatic, and the question of the properties of the *H19* product, so far an RNA, remains open.

Other studies suggested that another locus on the short arm of chromosome 11 might be involved in tumor suppression, and the likely candidate is the cyclin-dependent kinase inhibitor, the *p57<sup>KIP2</sup>* gene, in band 11p15.5, which causes G1 arrest<sup>54-58</sup>.

It has been frequently demonstrated that the *H19* gene is up-regulated *in vitro* in differentiating cells as well as

during growth arrest.<sup>1,7,59-61</sup> A number of growth factors, such as insulin-like growth factor (IGF)-I and -II, epidermal growth factor (EGF), insulin, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , and transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, and activators or inhibitors of protein kinase A and C modulated the *H19* gene expression level in different cell lines: vascular smooth muscle cells,<sup>10</sup> fetal adrenal cells,<sup>62</sup> and cultured adrenal cells.<sup>47</sup> Otherwise, Leibovitch et al<sup>63</sup> reported that the overexpression of c-mos protein in the muscle cell line C2C12 induces a concomitant increase of *H19* RNA expression, suggesting an interrelationship between these two gene products during muscle differentiation.

The mammary gland is a unique organ in that most of its growth, morphogenesis, and differentiation occur in the adult. During these periods, interactions between epithelial and mesenchymal cells and hormones and growth factors contribute to its development. Disorders of these interactions can result in a tumorigenic process.<sup>64,65</sup>

Observations of the *H19* gene expression in normal breast and its overexpression in many tumors,<sup>4,6,44</sup> despite the possible maintenance of genomic imprinting,<sup>44</sup> suggest that this gene is involved in both normal organogenesis and pathological events of the mammary gland.

We indicated, in a preliminary study of the expression of *H19* gene by *in situ* hybridization (ISH) in 13 adenocarcinomas,<sup>6</sup> that *H19* transcripts accumulate essentially within the stromal compartment of the mammary gland. The aim of the present work was 1) to extend the previous study on the expression of the *H19* gene to a statistically useful number of breast cancers (102), 2) to determine the level of *H19* gene expression in various subclasses of adenocarcinomas, including some which are rare, 3) to delineate the precise localization of the *H19* RNA, by using antibodies raised against specific stromal or epithelial components, 4) to establish the prognostic value of the *H19* RNA (localization and intensity of the *H19* signal were examined, and their relationships with histological grading system and various clinicopathological information were discussed), and 5) to correlate *H19* expression with molecular markers of growth activity of the tumor: steroid receptor content, Ki-67/MIB-1 antigen presence, and overexpression (abnormal) of *p53* gene product, which appears to be a common event in primary mammary carcinomas.

## Materials and Methods

### Biological Material and Clinicopathological Information

Breast carcinoma specimens were obtained from 102 patients (100 females and 2 males) treated by mastectomy at the Center Oscar Lambret (Lille, France) in 1990 and were selected on the basis of the first and unilateral cancer. In case of fatal issue, it was necessary to be sure that the cancer was only the more probable cause of death. For each tissue sample, the following clinicopathological information was obtained: histological subclassification (invasive ductal, invasive lobular, sarcomatoid,



epidermoid metaplastic, tubular, colloid mucillanous, papillary, apocrine, intraductal, or lobular *in situ*), tumor (T) values (from the tumor/nodes/metastases (TNM) classification of the UICC, ranging from T0 to T4), histological grade according to Bloom and Richardson,<sup>66,67</sup> the axillary lymph node status, and the hormone receptor status (estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR)), determined in femtomoles of receptors per milligram of cytosolic proteins and considered positive above 15 fmol/mg. The presence of these receptors indicates the level of sensitivity of tumor cells to these hormones. Furthermore, the age and menopausal status of patients were known, and expectation of life was followed up until the end of 1995.

### Fixation, Embedding, and Histological Staining

Immediately after resection, material was fixed with formalin (10%) for 24 hours and then dehydrated through increasing ethanol concentrations and embedded into Paraplast Plus. Five-micron sections were transferred to slides coated with 3-aminopropyl-triethoxysilane (TESPA, Aldrich) for immunohistochemical staining (IH) and to Esco Superfrost Plus (Polylabo) for *in situ* hybridization (ISH). For IH, tumor sections were fixed on slide by a glycerinated albumin (10%) solution.

Hemalun-phloxine-safran (HPS) staining was performed on one section of each tumor. This section indicated histological structures, and frequently this staining demonstrated heterogeneity of tumors. HPS allowed us to localize precisely the more interesting areas to be observed after various IH procedures or the ISH. As control, we analyzed normal healthy tissues from cosmetic surgery; resections originated from mature breasts of two premenopausal women.

### Immunohistochemical Staining

Sections were treated with xylene to remove paraffin from tissues, which were then progressively rehydrated. Sections were preliminarily treated by a modified procedure of Balaton et al<sup>68</sup> to restore antigen specificity before immunostaining; slides were immersed for 7.5 minutes in citrate buffer (0.01 mol/L, pH 6) heated in a pressure-cooker, and the latter was then placed for 15 minutes under cold water.

To determine precisely which cells expressed the *H19* gene, four immunostaining reactions were performed in parallel: 1) monoclonal antibody named anti-KL1, anti-human cytokeratin specific for epithelial cells (1:200 dilution; Immunotech, Marseille, France), 2) monoclonal antibody anti-smooth-muscle- $\alpha$ -actin to define myoepithelial cells (1:2000 dilution; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 3) anti-Ki-67/MIB-1 specific for a cell-cycle protein (prediluted; Immunotech), 4) anti-p53 protein raised against the amino-terminal amino acid sequence of both the wild-type and mutant versions of the protein (DO-1, prediluted; Immunotech). Immunoreactions were visualized with diaminobenzidine chromogen (Dako, Glostrup, Denmark), and sections were post-stained with hemalun.

## In Situ Hybridization

### Riboprobes

pSP65 plasmids were recombined with a 1.3-kb *Stul* fragment of *H19* cDNA at a *Sma*I site. cDNA fragments (5'→3' and 3'→5') were downstream of the SP6 promoter. Plasmids were linearized by *Hind*III digestion. Sense and antisense riboprobes were synthesized in the presence of [<sup>35</sup>S]CTP and reduced to an average 150-bp length before use.

### ISH Protocol

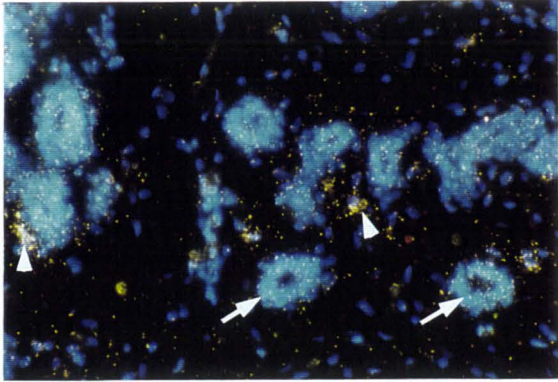
Basic experiments were those previously described by Quéva et al.<sup>69</sup> After hybridization, slides were dipped in the NTB2 nuclear track emulsion (Kodak, Rochester, NY), heated at 45°C, and exposed for 3 weeks. Autoradiographic revelation (D19 revelator) and fixation (Unifix, Kodak) were performed at 12°C. A fluorescent post-staining of the nuclei was carried on (Hoechst 33258, Bisbenzimidine, Serva;  $\lambda = 340$  nm). Coverslips were fixed by Dako-glycergel (Sebia). Observations were performed through an Olympus BH2 microscope.

## Results

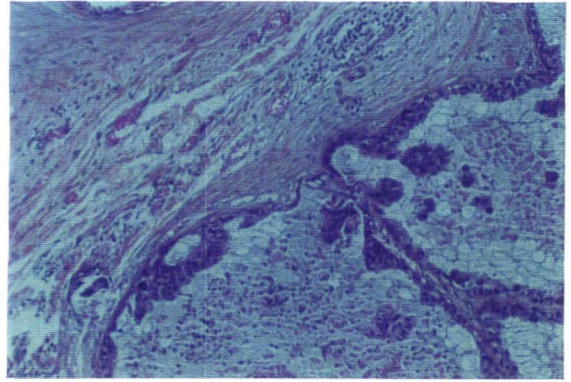
### Patterns of the *H19* Gene Expression

We previously reported that in normal breast resections signal for *H19* RNA was localized within both the epithelial and mesenchymal tissues.<sup>6</sup> The mesenchymal compartment was rather focally labeled. Our observations of two other normal breast samples confirmed this initial report. However, it appears that the *H19* transcript abundance can vary from one sample to another and even in different areas of the same section (Figure 1A).

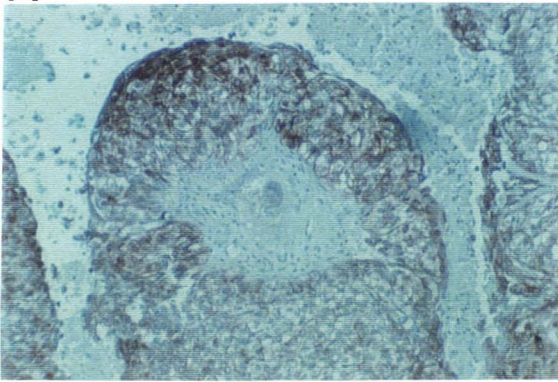
In 102 adenocarcinomas, we investigated the *H19* signal intensity and delineated regions where *H19* RNA was abundant. In 74/102 samples (72.5%), the *H19* gene was obviously more highly expressed than in normal breast. Figures 1 and 2 enabled us to compare the high difference of labeling with antisense *H19* riboprobe between normal (Figure 1A) and tumorigenic breast tissues (Figure 1, C and F; Figure 2, C and F). Based on this kind of representative observations, each tumor was classified as overexpressing the *H19* gene by a clear high-level labeling with the probe. Determinations were performed independently by two investigators (E. Adriaenssens and L. Dumont). If ambiguity of classification arose, the tumor was considered as exhibiting no more labeling than the control (normal breast). So, we admit that the pattern of overexpression, defined in this manner, in a given tumor, was objective. Frequently, in a given specimen we found a heterogeneous pattern of focal *H19* gene expression, which could be explained by histological diversity and/or differences in the grading of the carcinoma. Then, we focused our observations on the characteristic area, which was chosen for the clinical typing of the tumor. To delineate very precisely tumor compartments, we used two antibodies, anti-cytokeratin named anti-KL1 and anti-



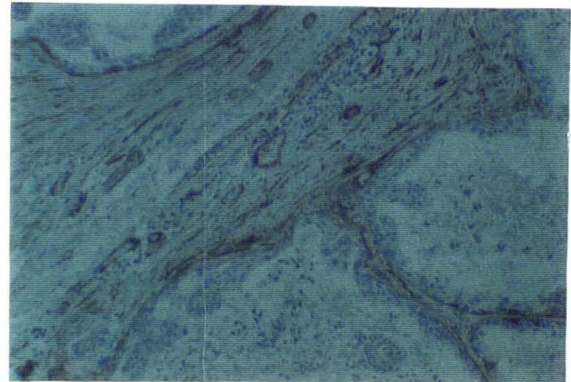
A



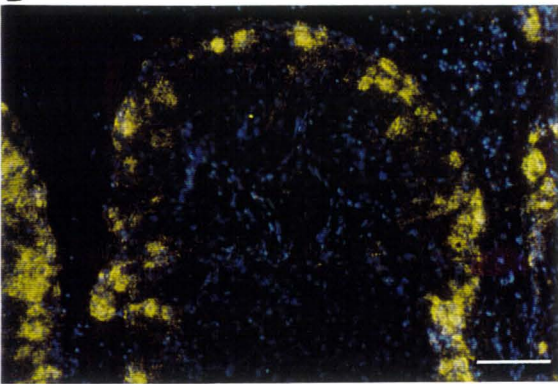
D



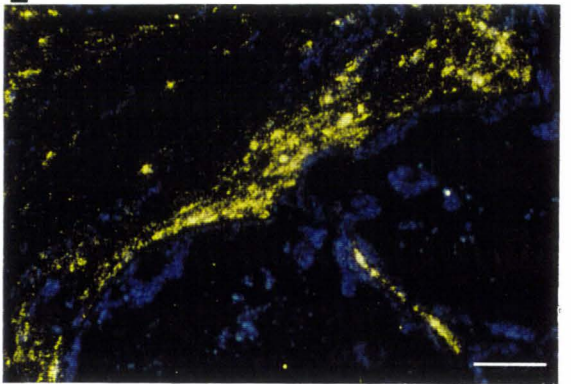
B



E



C



F



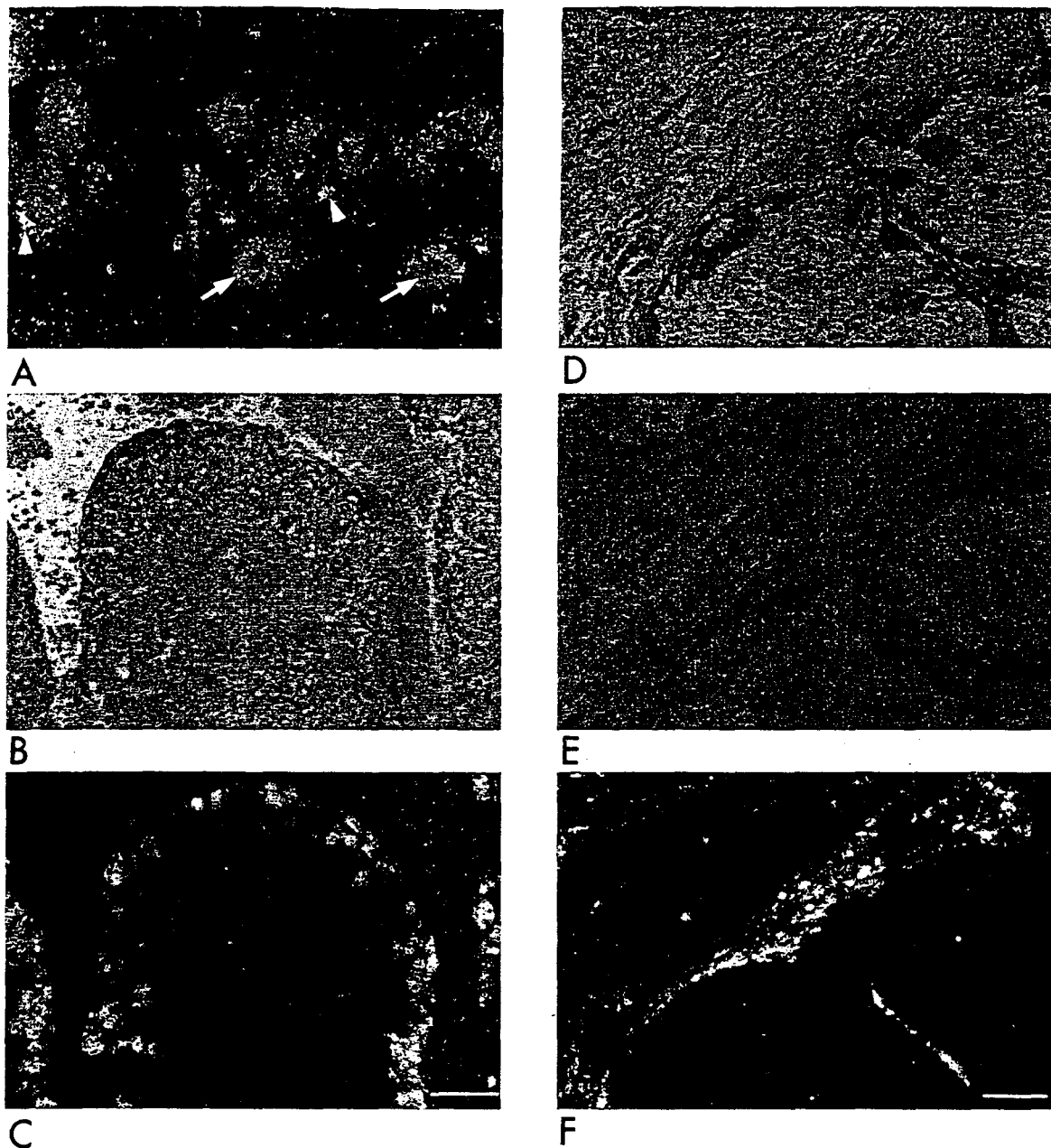


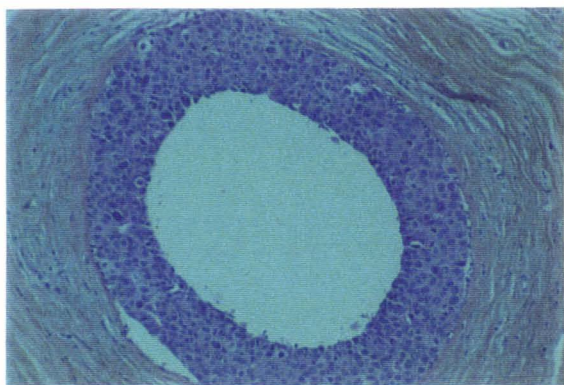
Figure 1. Expression of the *H19* gene in normal breast and in adenocarcinomas. A: Normal breast; epithelial (arrows) and mesenchymal (arrowheads) cells are labeled by the riboprobe. B and C: Epidermoid metaplastic carcinoma; *H19* RNA was exclusively located in the epithelial cells. D to F: Invasive ductal carcinoma; *H19* RNAs were exclusively located in the stromal compartment. B: Anti-KL-1-immunostaining; D: HPS coloration; E: anti-smooth-muscle- $\alpha$ -actin immunostaining; A, C, and F: ISH. In these two tumors, *H19* transcripts accumulated at the epithelium/stroma boundaries, either in epithelial cells (C) or in stromal cells (F). Scale markers, 120  $\mu$ m (A) and 600  $\mu$ m (B to F).

smooth-muscle- $\alpha$ -actin raised against differentiation molecules specific for epithelial and myoepithelial cells, respectively. Only 3/102 tumors (2.9%) exhibited an exclusive but intense epithelial labeling (Figure 1, B and C), but in a large majority of tumors, 94/102 (92.2%), *H19* was expressed in the stromal component only (Figure 1, D to F and Figure 2, D to F). *H19* transcripts were present in both compartments in 5/102 specimens (4.9%); the epithelial signal was rather punctate (Figure 2C). Interestingly, an intense signal at epithelial-stromal boundaries was located quite frequently on epithelial or stromal cells (Figure 1, C and F, respectively). Whatever the

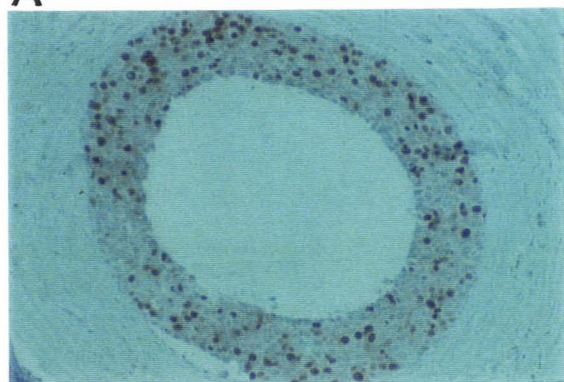
classification of a tumor, only a fraction of epithelial or stromal cells was stained. Table 1 indicates localization of *H19* RNA in ten histological subclasses of tumors.

Table 2 reports information concerning the three patterns of *H19* gene expression (stromal, epithelial, and both stromal and epithelial). Percentage of positivity, ie, *H19* RNA abundance, was indicated for the following clinicopathological factors or parameters: T values (T0 to T4), histological grade, estrogen and progesterone receptor status, age, menopausal and lymph node status, and cancer evolution for 5 years since tumorectomy. In the three specimens where *H19* RNA was exclusively

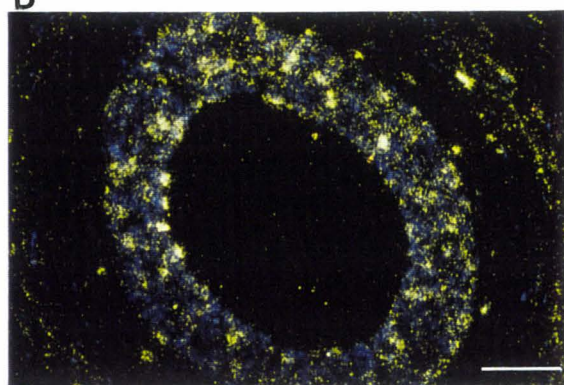




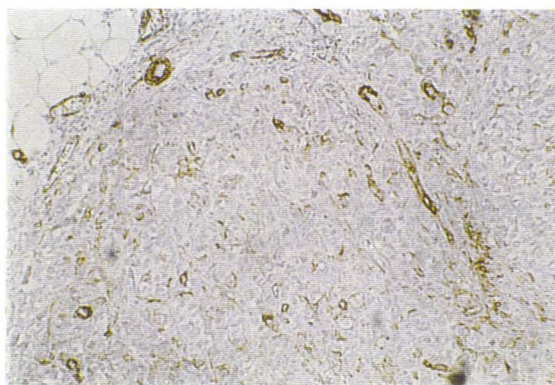
A



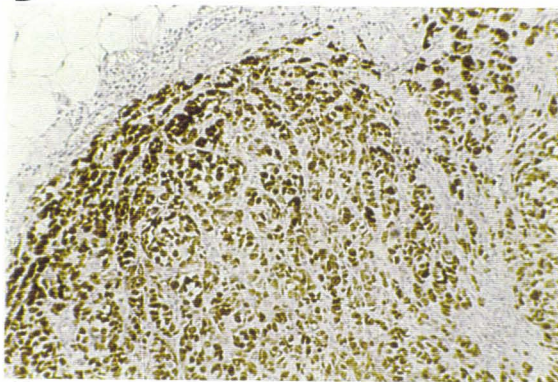
B



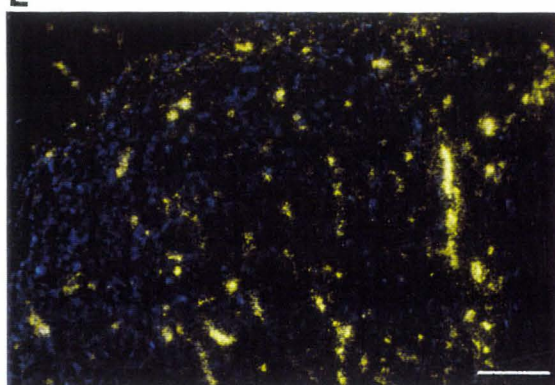
C



D



E



F

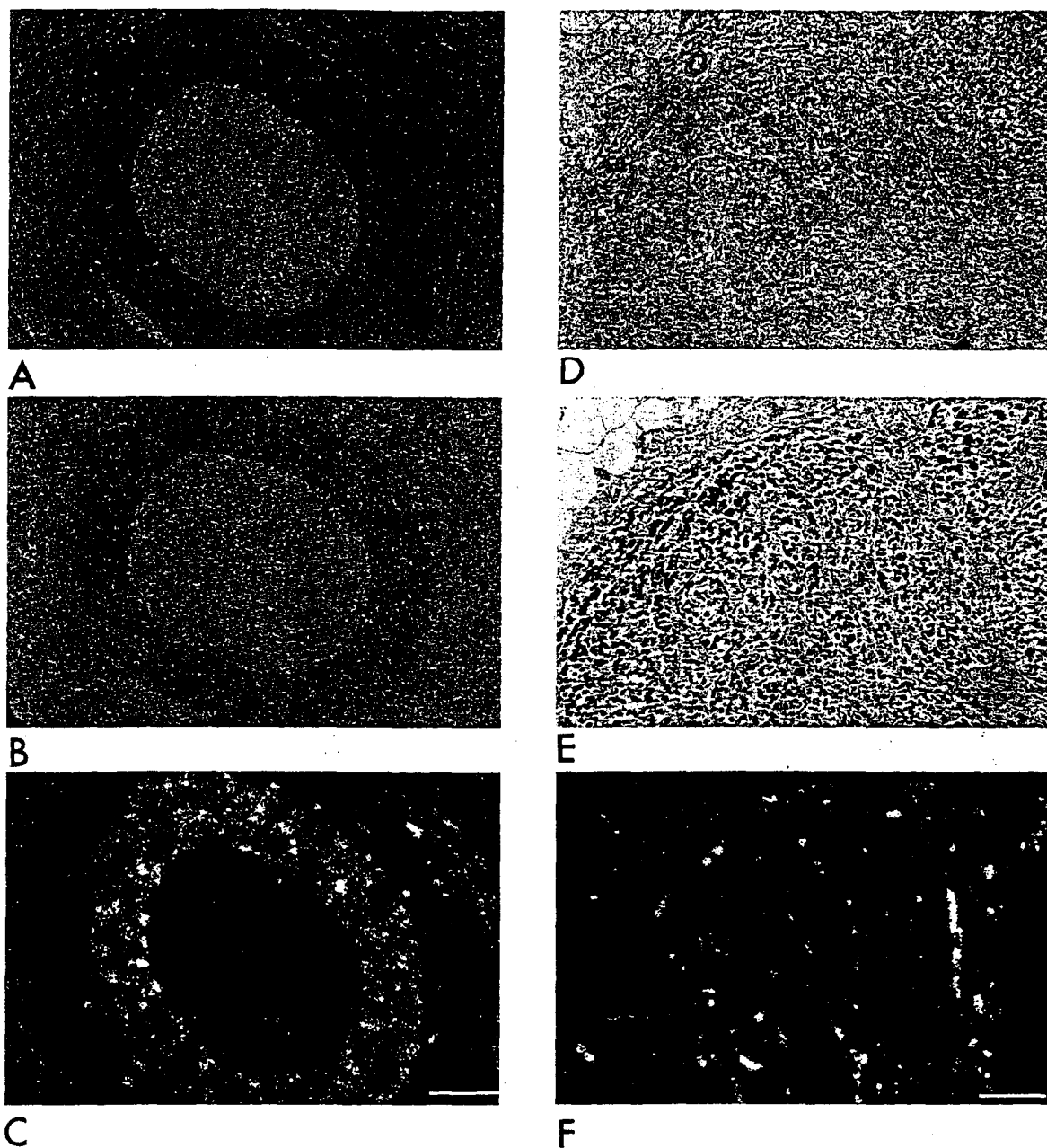


Figure 2. *H19* gene overexpression compared with accumulations of p53 protein and Ki-67/MIB-1, a protein specific to the cell cycle. A to C: Invasive ductal carcinoma; *H19* RNA was localized in epithelial and stromal cells. D to F: Invasive ductal carcinoma; *H19* RNA was exclusively localized in the stroma. Overlapping of the actin immunolabeling and the *H19* RNA patterns is seen. A: HPS coloration; B: anti-Ki-67/MIB-1 immunostaining; D: anti-smooth-muscle- $\alpha$ -actin immunostaining; E: anti-p53 immunostaining; C and F: ISH. B and C: No co-localization could be established between the overexpression of the *H19* gene and the presence of the Ki-67/MIB-1 cell cycle marker. E and F: The *H19* and p53 labelings do not overlap. Scale marker, 600  $\mu$ m.

observed in epithelial cells, one can notice that these tumors were of grade III, cells were devoid of hormone receptors, and patient death occurred within the 5 years after the surgery. This number of cases is too small to give a statistical meaning to these results, but it is intriguing that these 3 cases are a subset of the 21 deaths (21/102 cases) registered within this period. Indeed, we found only 10 tumors of grade III, showing no hormone receptors, which evolved fatally over the 5-year follow-up.

It can be noticed that when epithelial cells were capable of *H19* RNA synthesis, either in an epithelial pattern only (3 cases) or in an epithelial and stromal pattern (5

cases), then cells were completely devoid of hormone receptors.

#### *H19* Gene Overexpression and Various Clinicopathological Factors

Table 2 shows the abundance of the *H19* RNA as a function of various clinicopathological indications. Proportions were compared by using a Fisher's exact probability test,<sup>70</sup> and the threshold *P* value of 0.05 was chosen. The *H19* overexpression, as defined above, exhibits a very high correlation with the T values (UICC classifi-

Table 1. *H19* Transcript Localization in the Various Histological Subclasses of Tumors

Carcinomas	<i>n</i>	H19 transcript localization					
		Stromal		Epithelial		Stromal plus epithelial	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Invasive ductal	55	51	92.73	1	1.82	3	5.45
Invasive lobular	15	15	100	0	0	0	0
Sarcomatoid	1	1	100	0	0	0	0
Epidermoid metaplastic	2	1	50	1	50	0	0
Tubular	2	2	100	0	0	0	0
Colloid mucillaneous	5	5	100	0	0	0	0
Papillary	1	0	0	1	100	0	0
Apocrine	12	11	91.67	0	0	1	8.33
Intracanalal	8	7	87.50	0	0	1	12.50
Lobular <i>in situ</i>	1	1	100	0	0	0	0
Total	102	94	92.16	3	2.94	5	4.90

cation;  $P = 1.3 \times 10^{-5}$ ) but also with the presence of hormone receptors for estrogen and progesterone ( $P = 0.0048$  and  $P = 0.0159$ , respectively). For other factors (age, menopausal and lymph node status, histological grade, and evolution at 5 years),  $P$  values were too high to be significant; as a consequence, the *H19* gene overexpression cannot be significantly correlated with these parameters:

*H19 Gene Overexpression and Presence of a Cell Cycle Marker Protein, Ki-67/MIB-1*

Proliferative-cell activity has been estimated by immunohistochemical staining with Ki-67 antibody, and it has been shown that MIB-1, a monoclonal antibody, can react with an epitope of the Ki-67 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues processed by microwave

Table 2. *H19* RNA Localization and *H19* Gene Overexpression versus Various Clinicopathological Factors

Clinicopathological factors	Localization patterns of <i>H19</i> RNA			<i>H19</i> gene overexpression	
	Stromal ( <i>n</i> = 94, 92.2%)	Epithelial ( <i>n</i> = 3, 2.9%)	Stromal and epithelial ( <i>n</i> = 5, 4.9%)	Number of cases (%)	$P$ values
Age					
<50 years	23 (24.5%)	1 (33.3%)	0 (0%)	16/24 (66.7)	0.4297
>50 years	71 (75.5%)	2 (66.7%)	5 (100%)	58/78 (74.4)	
Menopausal status					
Premenopausal	29 (32.2%)	1 (33.3%)	1 (20%)	21/31 (67)	0.4559
Postmenopausal	61 (67.8%)	2 (66.7%)	4 (80%)	50/67 (74.6)	
T values					
T0	7 (7.7%)	0 (0%)	2 (40%)	3/9 (33.3)	T1 to T3, 0.029 T0 to T3, $4.10^{-5}$ T0 to T4, $1.3.10^{-5}$
T1	13 (14.3%)	0 (0%)	1 (20%)	8/14 (57.1)	
T2	50 (54.9%)	1 (33.3%)	0 (0%)	43/51 (84.3)	
T3	15 (16.5%)	2 (66.7)	2 (40%)	12/19 (63.2)	
T4	6 (6.6)	0 (0%)	0 (0%)	5/6 (83)	
Lymph node status					
Negative	44 (50.6%)	1 (33.3%)	4 (100%)	40/49 (81.6)	0.2310
Positive	43 (49.4%)	2 (66.7%)	0 (0%)	32/45 (71.1)	
Estrogen receptor					
Negative	42 (46.7%)	3 (100%)	5 (100%)	30/50 (60.0)	0.0048
Positive	48 (53.3%)	0 (0%)	0 (0%)	41/48 (85.4)	
Progesterone receptor					
Negative	40 (44%)	3 (100%)	5 (100%)	29/48 (60.4)	0.0159
Positive	51 (56%)	0 (0%)	0 (0%)	42/51 (82.6)	
Histological grade					
Grade I	12 (14.1%)	0 (0%)	1 (20%)	9/13 (69.2)	I/II, 0.5426 I/III, 0.2498 II/III, 0.5059 I/II/III, 0.5635
Grade II	44 (51.8%)	0 (0%)	2 (40%)	35/46 (76.1)	
Grade III	29 (34.1%)	3 (100%)	2 (40%)	28/34 (82.4)	
Evolution over 5 years					
Alive	75 (80.6%)	0 (0%)	5 (100%)	57/80 (71.3)	0.4048
Dead	18 (19.4%)	3 (100%)	0 (0%)	17/21 (80.9)	
p53 immunoreactivity					
Negative	70 (79.5%)	2 (100%)	2 (40%)	54/74 (73)	0.4961
Positive	18 (20.5%)	0 (0%)	3 (60%)	17/21 (80.9)	

For a few patients, some clinicopathological evaluations failed; consequently, the total number of cases can differ from 102.

pretreatment.<sup>71</sup> This protein is characterized by an accumulation at the transition between G2 and M phases, and its expression correlates with semiconservative DNA synthesis associated with the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression but not with the DNA synthesis associated with DNA repair.<sup>72</sup> Consequently, Ki-67 has a short half-life, and its concentration decreases rapidly after the mitotic phase; thus, it is considered as an accurate indicator of cell proliferation in histological material.<sup>73</sup> A majority of the studied tumors, 20/24 (83.3%), were mainly Ki-67/MIB-1 positive; but at the cellular level, no co-localization could be established between the overexpression of the *H19* gene and the presence of this marker (Figure 2, B and C).

### H19 Gene Overexpression and p53 Protein Accumulation

Ninety-five carcinomas were examined for the presence of p53 protein by using an immunohistochemical method; twenty-one cases (23.3%) were positive. Accumulation of p53 protein was mainly inside nuclei (Figure 2E), although a weak cytoplasmic signal could not be excluded as described by Moll et al.<sup>74</sup> The *H19* and p53 labelings do not overlap (Figure 2, E and F). Anti-p53 immunoreaction was correlated with histological grade ( $P = 0.0062$ ) but not with a high *H19* expression level ( $P = 0.4442$ ) and clinical information, including T values, T0 to T4 ( $P = 0.5732$ ), estrogen ( $P = 0.3702$ ) and progesterone ( $P = 0.2512$ ) receptors, age ( $P = 0.4881$ ), and menopausal ( $P = 0.8383$ ) and lymph node ( $P = 0.7867$ ) status. Correlation of p53 index with the histological grade provided the following results: grades I/II,  $P = 0.7571$ ; grades I/III,  $P = 0.2001$ ; and grades II/III,  $P = 0.0392$ .

### Discussion

The function of *H19* in mammary gland is of particular interest as it is one of the few tissues that continues to express detectable amounts of *H19* RNA in adulthood.<sup>1,6</sup> Results reported in this work confirm that the *H19* gene is overexpressed in most cases of breast adenocarcinomas.<sup>4,6</sup> The high level of expression of the *H19* gene observed in these cancers is probably not the consequence of the loss of imprinting, as Yballe et al<sup>44</sup> claimed that in their study *H19* was expressed monoallelically in all of the 18 informative breast tumors.

ISH detection of *H19* RNA, associated with immunohistochemical staining specific for epithelial or myoepithelial cells, allowed us to precisely detect the pattern of expression of this gene in tumors and, consequently, are complementary to previous results obtained by Northern blot.<sup>4</sup> *H19* RNA was preferentially located in stromal cells only (92.2% of cases), whatever the considered histological subclasses of tumors (Table 1). Adipocytes were also highly labeled. Our data establish, too, that during breast tumorigenesis an overexpression of the *H19* gene within epithelial cells was rare: in 4.9% of specimens in both

epithelial and stromal cells and in 2.9% of them in epithelial cells only (Table 2).

Spanakis and Brouty-Boyé<sup>75</sup> tested the hypothesis that predicts that the stroma also progresses along with the epithelium in a breast tumor. They asked what characteristics were likely to change in a permanent manner during tumor development, and they screened a large number of transcripts. They concluded that stromal cells from normal and pathological breast tissues present multiple irreversible differences in gene expression. During the desmoplastic reaction, cells constructing the stroma originated mainly in fibroblasts and smooth muscle cells, the so-called myofibroblasts, which correspond to a significant percentage of cells present in breast tumors, as high as 45%.<sup>76,77</sup> Thus, when tumorigenesis occurs, quantitative (cellular proliferation) and qualitative (disappearance of myoepithelial cells) modifications arise, and the stroma is transformed in a fibrous tissue.<sup>78</sup> Several genes are expressed specifically in the stromal part of a breast cancer, ie, hepatocyte growth factor,<sup>79</sup> urokinase plasminogen activator,<sup>80,81</sup> thrombospondin-1,<sup>82</sup> tissue factor,<sup>83</sup> aromatase,<sup>84</sup> and *c-ets-1* transcription factor.<sup>80</sup> Through reciprocal exchanges between epithelial and stromal cellular types, products of the latter genes interfere in the tumor growth when proliferation, angiogenesis, and invasion occur. The study of Singer et al<sup>85</sup> is worth mentioning in this context; indeed, these authors reported a paracrine influence, mediated by soluble factors released by epithelial cells, which are able to increase expression of the *IGF-II* gene in stromal cells; *IGF-II*-expressing fibroblasts are selected specifically in the stroma of breast cancers by the malignant cells. As *IGF-II* and *H19* genes are co-regulated by the same set of enhancers, although they are oppositely imprinted,<sup>9,13</sup> we propose that the stromal *H19* up-regulation described in the present work could be induced by paracrine factors involved in the activation of the *IGF-II* transcription within the same mesenchymal cells. Furthermore, the epithelium-mesenchyme interactions also play a key role in proliferation and differentiation mechanisms during normal breast development.<sup>80,86-89</sup>

Otherwise, the *H19* RNA concentration observed at the epithelium/mesenchyme boundary can reflect one issue of the interactions or the dialogue between cancerous and stromal cells. The conversion of fibroblast to myofibroblast is the consequence of epithelial stimuli.<sup>90</sup> The closer the cells are to the tumor epithelial cells, the more they are stimulated. In another respect, kinetics of *H19* RNA paralleled the accumulation of muscle-specific markers ( $\alpha$ -actin, MLC1/MLC3),<sup>63</sup> and the expression of the rabbit *H19* homologue was found in nonproliferative actin-positive cells.<sup>91</sup> This could explain the overexpression of the *H19* gene at the epithelium/stroma boundary in benign and malignant tumors (see also Ref. 6). This pattern of expression can be put in parallel with that one observed for *c-ets-1*, *uPA*, and *collagenase* expression detected in mesenchyme cells facing invasive epithelial cells; these data suggest that epithelial cells send signals to mesenchymal cells, which react by expressing these genes.<sup>92,93</sup>



Owing to the few number of cases (2.9%) where *H19* transcripts were localized exclusively in epithelial cells, the question of the importance of this observation is posed. We can notice that this rare *H19* expression pattern matches with the absence of hormone receptors and the death of patients within the 5 years after tumorectomy. These rare situations could be explained by the general deregulation of genes, which can be encountered in the advanced tumor phase of cells.

In the healthy breast, epithelial cells synthesize a basal level of *H19* transcripts depending on the specimen and even the area within a given section (this study and Ref. 6); this indicates that in the majority of carcinomas (~92%), the tumor development is accompanied by the complete loss of *H19* gene expression in cancer cells. This striking silencing of the *H19* gene does not establish the final evidence of the tumor suppressor function of the gene, but our statement on *H19* expression patterns fit well with this role proposed by several authors.<sup>17,27,28,30,49,94</sup> The *H19* product (a RNA) could be implicated in some differentiation (or proliferation arrest) mechanisms. Moreover, Leibovitch et al<sup>63</sup> demonstrated that both the *H19* gene and *c-mos* oncogene are involved in myogenic differentiation and even are necessary in the maintenance of this status. The fact that the *H19* gene is expressed during embryogenesis and then turned off in almost all adult tissues, except in breast, heart, and skeletal muscles, could suggest a dual function: one in proliferative events and the other one in differentiation.

Table 2 shows that among several clinicopathological factors considered in this study, only the T values classification (UICC) and the presence of hormone receptors (ER and PR) gave a positive significant correlation with *H19* gene overexpression. Interestingly, the T value is one of the three elements of the TNM classification usually used to determine evolution and prognosis of the tumors. *P* values indicate that this important clinicopathological factor is highly correlated with *H19* gene overexpression. No less interesting is the positive significant correlation between *H19* overexpression and the presence of hormone receptors, which can be put together with the established feature that the estimate (in femtomoles) of these receptors indicates the level of sensitivity of tumor cells to these hormones.<sup>95</sup> Otherwise, it is known that aromatase is involved in estradiol synthesis, and the expression of the aromatase gene increases in fat tissue adjacent to the tumor.<sup>96-98</sup> Interestingly, *H19* transcripts were abundant in adipocytes, mostly in those located near the tumor. The latter cells synthesize estrogens, particularly those located in this area,<sup>99</sup> and these hormones could account for *H19* overexpression, as it has been proposed that estrogen could play a role in modulations of *H19* expression.<sup>100</sup> Consequently, variations of the estrogen levels during the menstrual cycle could account for the observed differences in *H19* RNA abundance detected in various healthy breast resections and eventually also in pathological tissues.

Now we have to discuss ISH data in parallel with information on two physiological properties of the cells overexpressing the *H19* gene. Do these cells accumulate the p53 protein and are they in cycle? Relationships

between p53 accumulation and pathological factors, such as the histological type and grade and the status of the ER and PR is still in dispute.<sup>101-106</sup> The prognostic and predictive value of p53 overexpression in breast carcinomas appears weaker than hoped.<sup>107</sup> Nevertheless, accumulation of p53 is usually associated with tumor grades and negative ER status.<sup>107</sup> In our series of breast tumor resections, no positive correlation was provided by the comparison between p53 protein accumulation and *H19* gene overexpression. Nevertheless, in another study we have demonstrated a down-regulation of the *H19* promoter by the wild-type p53 protein, but not by one p53 mutant (the 143 Ala mutant).<sup>108</sup> Discrepancies between our previous data and those reported in the present work can be explained by several outlines, not mutually exclusive. Our previous study<sup>108</sup> was concerned with a cell line (HeLa cells) transiently or stably transfected with a p53 recombinant vector, and it was focused on relationships between p53 protein and the *H19* promoter and displayed the effect of an accurate p53 mutation, exhibiting a thermosensitive phenotype. On the contrary, in the present study we considered *H19* gene expression in tissues originated from primary breast cancers, of which the causes are necessarily multifactorial. Furthermore, one must keep in mind that although any accumulation of p53 protein can be generally the consequence of a genetic or an epigenetic outcome, we have no indications that all of the p53 mutations induce necessarily an overexpression of the *H19* gene. Otherwise, p53 protein was located exclusively in epithelial cells, and positive correlation between p53 accumulation and a mutation of the p53 gene in breast cancers varied from 62% to 92%.<sup>109</sup> Finally, one must remember that *H19* gene overexpression was anyway rare in epithelial cells.

We consider now ISH data and a feature specific of cells in cycle. A monoclonal antibody, Ki-67, has been used to demonstrate that cells are in cycle. Ki-67 identifies a nuclear nonhistone protein of 395 and 345 kd present in the nucleoli of proliferative interphase cells as well as the condensed chromatin in mitotic cells. On the contrary, cells in quiescent phase G0 lack this antigen.<sup>110,111</sup> In this study, we used MIB-1, which is a monoclonal antibody raised against a recombinant part of the Ki-67 antigen.<sup>71</sup> As for p53 protein detection, the MIB-1 immunostaining labeled frequently tumor cells, independently of any ISH signal specific of the *H19* RNA equipment. Once more, we must remember that epithelial cells express rarely the *H19* gene. Consequently, the *H19* RNA seems to be not crucial in the maintenance of cells in cycle.

In conclusion, 1) *H19* gene overexpression is significantly correlated to the T values (TNM classification) and the presence of hormone receptors, but with neither the p53 tumor suppressor gene product nor with a protein indicating that cells are in cycle, 2) the frequent (92.2% of adenocarcinomas) overexpression of the *H19* gene in stroma could be one of the responses of mesenchymal cells to paracrine factors released by tumor epithelium (this is stressed by abundance of *H19* transcripts in mesenchymal cells adjacent to epithelial tissue), 3) *H19*



RNA accumulates rarely in epithelial cells (7.8% of cases, but in 2.9% in malignant cells only); the general silencing of *H19* in invasive cells is in agreement with considerations on which this gene has been proposed as a tumor suppressor candidate, and 4) the fold increase of a basal level of *H19* gene expression in the normal breast during adulthood, as the loss of regulation inducing a frequent but complex overexpression pattern of this gene in carcinomas, seems a result of puzzling processes, reflecting the fundamental relationships between cells with different phenotype. It is unlikely that any simple mechanism will explain all of the changes of the *H19* expression level that occur as the mammary gland differentiates, ages, or undergoes a neoplastic development.

### Acknowledgments

We thank Prof. Bénoni Boilly, Dr. David G. Fernig, and Dr. Jean-Philippe Peyrat for critical reading of the manuscript, Dr. Pellerin for providing us with resections of healthy breast from modeling surgery, Ghislaine Leroux de Bretagne, Chantal Pennel, and Alain Verdière for their help in histological methods, and Sylviane Derache for her help in the editing of the manuscript.

### References

- Pachnis V, Belayev A, Tilghman SM: Locus unlinked to  $\alpha$ -fetoprotein under the control of the murine *raf* and *Rif* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81:5523-5527
- Poirier F, Chan CTJ, Timmons PM, Robertson EJ, Evans MJ, Rigby PWJ: The murine *H19* gene is activated during embryonic stem cell differentiation *in vitro* at the time of implantation in the developing embryo. *Development* 1991, 113:1105-1114
- Rachmilevitz J, Goshen R, Ariel I, Schneider T, de Groot N, Hochberg A: Parental imprinting of the *H19* gene. *FEBS Lett* 1992, 309: 25-28
- Douc-Razy S, Coll J, Barrois M, Joubel A, Prost S, Dozier C, Stéhelin D, Riou G: Expression of the human fetal *BAC/H19* gene in invasive cancers. *Int J Oncol* 1993, 32:753-758
- Lustig O, Ariel I, Ilian J, Lev-Lehman E, de Groot N, Hochberg A: Expression of the imprinted gene *H19* in the human fetus. *Mol Reprod Dev* 1994, 38:239-246
- Dugimont T, Cury JJ, Wernert N, Delobelle A, Raes MB, Joubel A, Stéhelin D, Coll J: The *H19* gene is expressed within both epithelial and stromal components of human invasive adenocarcinomas. *Biol Cell* 1995, 85:117-124
- Pachnis V, Brannan CI, Tilghman SM: The structure and expression of a novel gene activated in early mouse embryogenesis. *EMBO J* 1988, 7:673-681
- Leibovitch M, Nguyen V, Gross M, Solhonne B, Leibovitch S, Bernheim A: The human ASM (adult skeletal muscle) gene: expression and chromosomal assignment to 11p15. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 180:1241-1250
- Zhang Y, Tycko B: Monoallelic expression of the human *H19* gene. *Nature Genet* 1992, 1:40-44
- Han DKM, Liau G: Identification and characterization of developmentally regulated genes in vascular smooth muscle cells. *Circulation Res* 1992, 71:711-719
- Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM: The product of the *H19* gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol* 1990, 10:28-36
- Joubel A, Cury JJ, Pelczar H, Bègue A, Lagrou C, Stéhelin D, Coll J: The 5' part of the human *H19* RNA contains cis-acting elements hampering its translatability. *Cell Mol Biol* 1996, 42:1159-1172
- Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM: Parental imprinting of the mouse *H19* gene. *Nature* 1991, 351:153-155
- Feinberg AP: Genomic imprinting and gene activation in cancer. *Nature Genet* 1993, 4:110-113
- Mannens M, Slater RM, Heyting C, Bliiek J, De Kraker J, Coad N, De Pagter-Holthuisen P, Pearson PL: Molecular nature of genetic changes resulting in loss of heterozygosity of chromosome 11 in Wilms' tumours. *Hum Genet* 1988, 81:41-48
- Reeve AE, Sih SA, Raizis AM, Feinberg AP: Loss of allelic heterozygosity at a second locus on chromosome 11 in sporadic Wilms' tumor cells. *Mol Cell Biol* 1989, 9:1799-1803
- Tycko B: Genomic imprinting: mechanism and role in human pathology. *Am J Pathol* 1994, 144:431-443
- Skinner MA, Vollmer R, Huper G, Abbott P, Inglehart JD: Loss of heterozygosity for genes on 11p and the clinical course of patients with lung carcinoma. *Cancer Res* 1990, 50:2303-2306
- Fujimori M, Tokino T, Hino O, Kitagawa T, Imamura T, Okamoto E, Mitsunobu M, Ishikawa T, Nakagama H, Harada H: Allelotyping study of primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1991, 51:89-93
- Ali IU, Lidereau R, Theillet C, Callahan R: Reduction to homozygosity of genes on chromosome 11 in human breast neoplasia. *Science* 1987, 238:185-188
- Ehlen T, Dubeau L: Loss of heterozygosity on chromosomal segments 3p, 6q and 11p in human ovarian carcinomas. *Oncogene* 1990, 5:219-223
- Reeve AE: Role of genomic imprinting in Wilms' tumour and overgrowth disorders. *Med Pediatr Oncol* 1996, 27:470-475
- Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE: Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumor. *Nature* 1993, 362:749-751
- Rainier S, Johnson L, Dobry C, Ping A, Gundry P, Feinberg AP: Relaxation of imprinting genes in human cancer. *Nature* 1993, 362: 747-749
- Leighton PA, Ingram RS, Eggenschwiller J, Efstratiadis A, Tilghman SM: Disruption of imprinting caused by deletion of the *H19* gene region in mice. *Nature* 1995, 375:34-39
- Leighton PA, Saam JR, Ingram RS, Stewart CL, Tilghman SM: An enhancer deletion affects both *H19* and *Igf2* expression. *Genes Dev* 1995, 9:2079-2089
- Moulton T, Crenshaw T, Hao Y, Moosikasuwan J, Lin N, Dembitzer F, Hensle T, Weiss L, McMorrow L, Loew T, Kraus W, Gerald W, Tycko B: Epigenetic lesions at the *H19* locus in Wilms' tumour patients. *Nature Genet* 1994, 7:440-447
- Steenman MJ, Rainier S, Dobry CJ, Grundy P, Horon IL, Feinberg AP: Loss of imprinting of *IGF2* is linked to reduced expression and abnormal methylation of *H19* in Wilms' tumour. *Nature Genet* 1994, 7:433-439
- Taniguchi T, Sullivan MJ, Ogawa O, Reeve AE: Epigenetic changes encompassing the *IGF2/H19* locus associated with relaxation of *IGF2* imprinting and silencing of *H19* in Wilms' tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:2159-2163
- Cui H, Hedborg F, He L, Nordenskjöld A, Sandstedt B, Pfeifer-Ohlsson S, Ohlsson R: Inactivation of *H19*, an imprinted and putative tumor repressor gene, is a preneoplastic event during Wilms' tumorigenesis. *Cancer Res* 1997, 57:4469-4473
- Okamoto K, Morison IM, Taniguchi T, Reeve AE: Epigenetic changes at the insulin-like growth factor II/*H19* locus in developing kidney is an early event in Wilms tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:5367-5371
- Kondo M, Suzuki H, Ueda R, Osada H, Takagi K, Takahashi T: Frequent loss of imprinting of the *H19* gene is often associated with its overexpression in human lung cancers. *Oncogene* 1995, 10: 1193-1198
- Zhan S, Shapiro DN, Helman LJ: Activation of the imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest* 1994, 94:445-448
- Zhan S, Shapiro D, Zhan S, Zhang L, Hirschfeld S, Ellassal J, Helman L: Concordant loss of imprinting of the human insulin-like growth factor II gene promoters in cancer. *J Biol Chem* 1995, 270:27983-27986
- Casola S, Pedone P V, Cavazzana AO, Basso G, Luksch R, d'Amore ESG, Carli M, Bruni CB, Riccio A: Expression and parental imprinting of the *H19* gene in human rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 1997, 14:1503-1510
- Rainier S, Dobry CJ, Feinberg AP: Loss of imprinting in hepatoblastoma. *Cancer Res* 1995, 55:1836-1838

37. Van Gurp RJHLM, Wolter Oosterhuis J, Kalscheuer V, Mariman ECM, Looijenga LHJ: Biallelic expression of the *H19* and *IGF2* genes in human testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 1994, 86:1070-1075
38. Elkin M, Shevelev A, Schulze E, Tykocinsky M, Cooper M, Ariel I, Pode D, Kopf E, de Groot N, Hochberg A: The expression of the imprinted *H19* and *IGF-2* genes in human bladder carcinoma. *FEBS Lett* 1995, 374:57-61
39. Douc-Razy S, Barrois M, Fogel S, Ahomadegbe JC, Stéhelin D, Coll J, Riou G: High incidence of loss of heterozygosity and abnormal imprinting of *H19* and *IGF2* genes in invasive cervical carcinomas: uncoupling of *H19* and *IGF2* expression and biallelic hypomethylation of *H19*. *Oncogene* 1996, 12:423-430
40. Hibi K, Nakamura H, Hirai A, Fujikase Y, Kasai Y, Akiyama S, Ito K, Takagi H: Loss of imprinting in esophageal cancer. *Cancer Res* 1996, 56:480-482
41. Wada M, Seeger RC, Mizoguchi H, Køffer HP: Maintenance of normal imprinting of *H19* and *Igf-2* genes in neuroblastoma. *Cancer Res* 1995, 55:3386-3388
42. Uyeno S, Aoki Y, Nata M, Sagisaka K, Kayama T, Yoshimoto T, Ono T: *Igf-2* but not *H19* shows loss of imprinting in human glioma. *Cancer Res* 1996, 56:5356-5359
43. Vu TH, Yballe C, Boonyanit S, Hoffman AR: Insulin-like growth factor II in uterine smooth-muscle tumors: maintenance of genomic imprinting in leiomyomata and loss of imprinting in leiomyosarcomata. *J Clin Endocrinol* 1995, 80:1670-1676
44. Yballe C, Vu TH, Hoffman AR: Imprinting and expression of insulin-like growth factor-II and *H19* in normal breast tissue and breast tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81:1607-1612
45. Ariel I, Lustig O, Schneider T, Pizov G, Sappir M, de-Groot N, Hochberg A: The imprinted *H19* gene as a tumor marker in bladder carcinoma. *Urology* 1994, 45:335-338
46. Cooper MJ, Fischer M, Komitowski D, Shevelev A, Schulze E, Ariel I, Tykocinski ML, Miron S, Ilan J, de Groot N, Hochberg A: Developmentally imprinted genes as markers for bladder tumor progression. *J Urol* 1996, 155:2120-2127
47. Liu J, Kahri A, Heikkilä P, Ilvesmäki V, Voutilainen R: *H19* and insulin-like growth factor-II gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80:492-496
48. Walsh C, Miller SJ, Flam F, Fisher RA, Ohlsson R: Paternally derived *H19* is differentially expressed in malignant and nonmalignant trophoblast. *Cancer Res* 1995, 55:1111-1116
49. Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E, Tycko B: Tumor suppressor activity of *H19* RNA. *Nature* 1993, 365:764-767
50. Reid LH, West A, Gioli DG, Phillips KK, Kelleher KF, Araujo D: Localization of tumor suppressor gene in 11p15.5 using the G401 Wilms' tumor assay. *Hum Mol Genet* 1996, 5:239-247
51. Ariel I, Ayesch S, Perlman EJ, Pizov G, Tanos V, Schneider T, Erdmann VA, Podeh D, Komitowski D, Quasem AS, de Groot N, Hochberg A: The product of the imprinted *H19* gene is an oncofetal RNA. *J Clin Pathol* 1997, 50:34-44
52. Verkerk AJMH, Ariel I, Dekker MC, Schneider T, van Gurp RJHLM, de Groot N, Gilly AJM, Oosterhuis JW, Hochberg AA, Looijenga LHJ: Unique expression patterns of *H19* in human testicular cancers of different etiology. *Oncogene* 1997, 14:95-107
53. Lustig-Yariv O, Schulze E, Komitowski D, Erdmann V, Schneider T, de Groot N, Hochberg A: The expression of the imprinted genes *H19* and *IGF-2* in choriocarcinoma cell lines. Is *H19* a tumor suppressor gene? *Oncogene* 1997, 15:169-177
54. Koi M, Johnson LA, Kalikin LM, Little PFR, Nakamura Y, Feinberg AP: Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transfectable DNA fragments from chromosome 11. *Science* 1993, 260:361-364
55. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ: *p57<sup>KIP2</sup>*, a structurally distinct member of the *p21<sup>cip1</sup>* cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995, 9:650-662
56. Matsuoka S, Thompson JS, Edwards MC, Barletta JM, Grundy P, Kalikin LM, Harper JW, Elledge SJ, Feinberg AP: Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, *p57<sup>KIP2</sup>*, on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:3026-3030
57. Chung WY, Yuan L, Feng L, Hensle T, Tycko B. Chromosome 11p15.5 regional imprinting: comparative analysis of *KIP2* and *H19* in human tissues and Wilms' tumors. *Hum Mol Genet* 1996, 5:1101-1108
58. Hatada I, Inazawa J, Abe T, Nakayama M, Kaneko Y, Jinno Y, Nikawa N, Ohashi H, Fukushima Y, Lida K, Yurani C, Takahashi SI, Chiba Y, Ohishi S, Mukai T: Genomic imprinting of human *p57<sup>KIP2</sup>* and its reduced expression in Wilms' tumors. *Hum Mol Genet* 1996, 5:783-788
59. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB: Expression of a single transcribed cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987, 51:987-1000
60. Kim D, Zhang L, Dzau VJ, Pratt RE: *H19*, a developmentally regulated gene, is reexpressed in rat vascular smooth muscle cells after injury. *J Clin Invest* 1994, 93:355-360
61. Eversole-Cire P, Ferguson-Smith AC, Surani MA, Jones PA: Coordinate regulation of *Igf-2* and *H19* in cultured cells. *Cell Growth Differ* 1995, 6:337-345
62. Voutilainen R, Ilvesmäki V, Ariel I, Rachmilevitz J, de Groot N, Hochberg A: Parallel regulation of parentally imprinted *H19* and *IGF-II* genes in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology* 1994, 134:2051-2056
63. Leibovitch MP, Solhonne B, Guiller M, Verelle P, Leibovitch SA: Direct relationship between the expression of tumor suppressor *H19* mRNA and *c-mos* proto-oncogene during myogenesis. *Oncogene* 1995, 10:251-260
64. Fernig DG, Smith JA, Rudland PS: Relationship of growth factors and differentiation in normal and neoplastic development of the mammary gland. *Regulatory Mechanisms in Breast Cancer*. Edited by Lippman M, Dickson R. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1991, pp 47-77
65. Rudland PS, Barraclough R, Fernig DG, Smith JA: Mammary stem cells in normal development and cancers. *Stem Cells and Cancer*. Academic Press, 1997, pp 147-232
66. Bloom HJ, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957, 11:359-377
67. Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F, Brunet M: Prognostic value of histologic grade nuclear components based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 1989, 64:1914-1921
68. Balaton AJ, Ochando F, Painchaud MH: Utilisation des micro-ondes pour aviver ou restaurer les antigènes avant la réaction immunohistochimique. *Ann Pathol* 1993, 13:188-189
69. Quéva C, Ness SA, Grässer FA, Graf T, Vandenbunder B, Stéhelin D: Expression patterns of *c-myc* and *v-myc* induced myeloid-1 (*mim-1*) gene during the development of the chick embryo. *Development* 1992, 114:125-133
70. Siegel S. (editor): *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. London, McGraw-Hill, 1956
71. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992, 168:357-363
72. McCormick D, Chong H, Hobbs C, Hall PA: Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB-1. *Histopathology* 1993, 22:355-360
73. Soon Lee C: Differences in cell proliferation and prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen immunoreactivity in *in situ* and invasive carcinomas of the extrahepatic biliary tract. *Cancer* 1996, 78:1881-1887
74. Moll UM, Riou G, Levine AJ: Two distinct mechanisms alter *p53* in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:7262-7266
75. Spanakis E, Brouty-Boyé D: Quantitative variation of proto-oncogene and cytokine gene expression in isolated breast fibroblasts. *Int J Cancer* 1995, 61:698-705
76. Santen RJ, Martel J, Hoagland M: Stromal spindle cells contain aromatase in human breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79:627-632
77. Rannov-Jessen L, Petersen OW, Koteliansky VE, Bissel MJ: The origin of myofibroblasts in breast cancer. *J Clin Invest* 1995, 95:859-873
78. Schurch W, Seemayer T, Gabbiani G: *Myofibroblast*. New York, Raven Press, 1992, pp 109-144

79. Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A, Elliot BE: Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 1996, 148:225-232
80. Delannoy-Courdent A, Fauquette W, Dong-Le Bourhis XF, Boilly B, Vandebunder B, Desbiens X: Expression of *c-ETS-1* and *uPA* genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Int J Dev Biol* 1996, 40:1097-1108
81. Van Roozendaal CEP, Klijn JGM, Sieuwerts AM, Henzen-Logmans SC, Foekens JA: Role of urokinase plasminogen activator in human breast cancer: active involvement of stromal fibroblasts. *Fibrinolysis* 1996, 10:79-83
82. Wang TN, Qian X, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Berger DH, Tuszynski GP: Inhibition of breast cancer progression by an antibody to a thrombospondin-1 receptor. *Surgery* 1996, 120:449-454
83. Vrana JA, Stang MT, Grande JP, Getz MJ: Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor- $\beta$  family. *Cancer Res* 1996, 56:5063-5070
84. Sasano H, Frost AR, Saitoh R, Harada N, Poutanen M, Vihko R, Bulun SE, Silverberg SG, Nagura H: Aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81:4042-4046
85. Singer C, Rasmussen A, Smith HS, Lippman ME, Lynch HT, Cullen KJ: Malignant breast epithelium selects for insulin-like growth factor II expression in breast stroma: evidence for paracrine function. *Cancer Res* 1995, 55:2448-2454
86. Van den Hoff A: Stromal involvement in malignant growth. *Adv Cancer Res* 1988, 50:159-196
87. Clarke R, Dickson RB, Lippman ME: Hormonal aspects of breast cancer: growth factors, drugs and stromal interactions. *Crit Rev Oncol Hematol* 1992, 12:1-23
88. Ellis MJC, Singer C, Hornby A, Rasmussen A, Cullen KJ: Insulin-like growth factor mediated stromal interactions in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994, 31:249-261
89. Dickson RB, Lippman ME: Growth factors in breast cancer. *Endocrinol Res* 1995, 16:559-589
90. Mentzel T, Fletcher CDM: The emerging role of myofibroblasts in soft tissue neoplasia. *Am J Clin Pathol* 1996, 107:2-5
91. Han DKM, Khaing ZZ, Pollock RA, Haudenschield CC, Liao G: *H19*, a marker of developmental transition, is reexpressed in human atherosclerotic plaques and is regulated by the insulin family of growth factors in cultured rabbit smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996, 97:1276-1285
92. Grévin D, Chen JH, Raes MB, Stéhelin D, Vandebunder B, Desbiens X: Involvement of the proto-oncogene *c-ets-1* and the *urokinase plasminogen activator* during mouse implantation and placentalation. *Int J Dev Biol* 1993, 37:519-529
93. Wernert N, Gilles F, Fafeur V, Bouali F, Raes MB, Pyke C, Dupressoir T, Seitz G, Vandebunder B, Stéhelin D: Stromal expression of *c-ets-1* transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res* 1994, 54:5683-5688
94. Isfort RJ, Kerckaert GA, Tycko B, LeBoeuf RA: Role of the *H19* gene in Syrian hamster embryo cell tumorigenicity. *Mol Carcinog* 1997, 20:189-193
95. Görlich M, Jandrig B: Estradiol receptors and metastasis in human breast cancers. *Folia Histol (Prague)* 1996, 42:3-10
96. O'Neill JS, Elton RA, Miller WR: Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: a link with tumor site. *Br Med J* 1988, 296:741-743
97. Bulun SE, Price TM, Mahendroo MS, Aitken J, Simpson ER: A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 77:1622-1628
98. Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR, Simpson ER: Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PEG2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter of the *CYP19* aromatase gene. *Endocrinology* 1996, 137:5739-5742
99. Simpson ER, Bulun SE, Nichols JE, Zhao Y: Estrogen biosynthesis in adipose tissue: regulation by paracrine and autocrine mechanisms. *J Endocrinol* 1996, 150:51-57
100. Adriaenssens E, Dumont L, Fauquette W, Le Bourhis X, Dugimont T, Coll J, Cury JJ: Modulations of the *H19* gene expression in normal or malignant mammary epithelial cells. *Biol Cell* 1996, 88:80a
101. Crowford LV, Pim DC, Bulbrook RD: Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982, 30:403-408
102. Barnes DM, Dublin EA, Fischer CJ, Levison DA, Millis RR: Immunohistological detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? *Human Pathol* 1993, 24:200-206
103. Domalaga W, Harezga B, Szadowska A, Markiewski M, Weber K, Osborn M: Nuclear p53 protein accumulates preferentially in medullary and high-grade ductal but rarely in lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* 1993, 142:669-674
104. Hurlimann J: Prognostic value of p53 protein expression in breast carcinomas. *Pathol Res Pract* 1993, 198:996-1003
105. Silvestrini R, Benini E, Davidone MG: p53 as an independent prognosis marker in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993, 965-970
106. Caleffi M, Teague MW, Jensen RA, Vnencak-Jones CL, Dupont WD, Pearl FF: p53 gene mutations and steroid receptor status in breast cancer: clinicopathological correlations and prognostic assessment. *Cancer* 1994, 73:2147-2156
107. Barbareschi M: Prognostic value of the immunohistochemical expression of p53 in breast carcinomas: a review of the literature involving over 9,000 patients. *Appl Immunohistochem* 1996, 4:106-116
108. Dugimont T, Montpellier C, Adriaenssens E, Lottin S, Dumont L, Iotsova V, Lagrou C, Stéhelin D, Coll J, Cury JJ: The *H19* TATA-less promoter is efficiently repressed by the wild-type tumor suppressor gene product p53. *Oncogene* 1998, 16:2395-2401
109. Soong R, Robbins PD, Dix BR, Griew F, Lim B, Knowles S, Williams KE, Turbett GR, House A, Iacopetta BJ: Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. *Hum Pathol* 1996, 27:1050-1055
110. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983, 31:13-20
111. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984, 133:1710-1715

## STEROID HORMONES MODULATE *H19* GENE EXPRESSION IN BOTH MAMMARY GLAND AND UTERUS

ADRIAENSSENS E.<sup>1</sup>, LOTTIN S.<sup>1</sup>, DUGIMONT T.<sup>1,2</sup>, FAUQUETTE W.<sup>1</sup>, COLL J.<sup>3</sup>,  
DUPOUY J.P.<sup>4</sup>, BOILLY B.<sup>1</sup> AND CURGY J.J.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de Biologie Cellulaire, Unité Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses, U.S.T. de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex. France.

<sup>2</sup> Faculté des Sciences Jean Perrin, Université d'Artois, 62307 Lens cedex. France.

<sup>3</sup> Immunopathologie Cellulaire des Maladies Infectieuses, URA1854, BP447, 59021 Lille cedex. France.

<sup>4</sup> Centre de Biologie Cellulaire, Laboratoire de Neuroendocrinologie du Développement, U.S.T. de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex. France.

**Running title :** STEROID HORMONES MODULATE *H19* GENE EXPRESSION

**Keys words :** *H19* gene regulation ; Mammary gland ; Uterus ; Steroid hormones ; Mammary cells ; Nuclear receptors.

\* Correspondence author

## ABSTRACT

*H19* is an imprinted and developmentally regulated gene whose product remains apparently untranslated. In a previous study on breast adenocarcinomas, we reported that overexpression of the *H19* gene was significantly correlated with the presence of steroid receptors, suggesting the putative role of hormones in *H19* transcription. To determine the mode of steroid action, we have detected levels of *H19* RNA synthesis during mammary gland development by *in situ* hybridization (ISH): two peaks of *H19* transcription occur during puberty and during pregnancy. Furthermore, we demonstrated by ISH that in the uterus *H19* RNA synthesis is high during estrus and metestrus phases. To test steroid control of *H19* transcription, ovariectomized and adrenalectomized mice were supplemented, one week after surgery, with 17- $\beta$ -estradiol (E2, 20  $\mu$ g/kg/day), progesterone (P, 1 mg/kg/day) or corticosterone (B, 0.3 mg/kg/day) for two weeks. According to ISH data, E2 and to a lesser extent B stimulated *H19* transcription in the uterus, whereas P inhibited it. To confirm the *in vivo* results, *in vitro* experiments were performed using cultures of MCF-7 cells (a hormone-sensitive mammary cell line). E2 stimulated the endogenous *H19* gene of this cell line. We performed transient cotransfections in MCF-7 with different constructs of ER (WT or mutated) and PR, in presence or absence of steroid hormones. We demonstrated that ER up-regulated the *H19* promoter whereas PR inhibited it. In addition, our data indicate that this activation is partly ligand-independent. We have thus demonstrated that *H19* gene expression is controlled by steroid hormones; furthermore, this gene is highly expressed in hormone-sensitive organs when the hormonal stimulation is accompanied by morphological repair.

## INTRODUCTION

The *H19* gene maps to human chromosome 11p15.5 (Glaser *et al.*, 1989) and to the distal part of chromosome 7 in the mouse (Pachnis *et al.*, 1984). In human and mouse, *H19* is located in the vicinity of *IGF-2* and the two genes are imprinted (Bartolomei *et al.*, 1991 ; Zhang and Tycko, 1992). Although *H19* and *IGF-2* are contiguous, *H19* is exclusively expressed from the maternal allele (Bartolomei *et al.*, 1991), whereas *IGF-2* is only expressed from the paternal allele (DeChiara *et al.*, 1991). In fact, these two genes share a common set of enhancers and this opposite regulation can be explained by a promoter/enhancer competition (Zemel *et al.*, 1992 ; Bartolomei *et al.*, 1993 ; Eversole-Cire *et al.*, 1995 ; Leighton *et al.*, 1995 ; Webber *et al.*, 1998).

The *H19* gene codes for a capped, spliced and polyadenylated RNA. A particularity of this product is its apparent inability to be translated when the UTR 5' is not experimentally altered (Brannan *et al.*, 1990 ; Joubel *et al.*, 1996). As a consequence, it has been proposed that this gene could act as a "riboregulator" (Brannan *et al.*, 1990).

*H19* is expressed in most fetal tissues, except in the thymus, and is repressed in almost all adult organs except the cardiac and skeletal muscles (Pachnis *et al.*, 1988 ; Leibovitch *et al.*, 1991), the uterus (Ariel *et al.*, 1997), to a lesser extent the kidney, adrenal glands and lung (Zhang and Tycko, 1992) and the mammary gland, where a basal but significant expression has been detected (Douc-Rasy *et al.*, 1993 ; Dugimont *et al.*, 1995 ; Adriaenssens *et al.*, 1998). This pattern of expression suggests that *H19* could be implicated in fetal development, as well as in postnatal development while the organ concerned continually undergoes repair, as for instance is the case with the mammary gland. In other respects, several authors observed an overexpression or a reexpression of the *H19* gene in a wide variety of cancers ; thus *H19* could also be involved in the pathological processes leading to tumor formation (Douc-Rasy *et al.*, 1993 ; Cooper *et al.*, 1996 ; Ariel *et al.*, 1997). This overexpression of *H19* in tumors may or not be associated with a loss of imprinting, a loss of heterozygosity or both phenomenons (Ariel *et al.*, 1994 ; Kondo and Takahashi, 1996 ; Wang *et al.*, 1996 ; Yballe *et al.*, 1996). In fact, the imprinting status of the *H19* gene in tumors seems to depend on the organ considered.

To date, the function of this gene remains unestablished. A tumor suppressor role was proposed by Hao *et al.* (1993), who observed a decrease of tumorigenicity of a cancerous cell line (G401) in which an ectopic *H19* gene was overexpressed. Rather indirect results obtained by several groups are in agreement with the tumor suppressor property of *H19* (Moulton *et al.*, 1994 ; Taniguchi *et al.*, 1995 ; Cui *et al.*, 1997). In contrast, Biran *et al.* (1994) and Cooper *et al.* (1996) considered this gene as a tumoral marker, since its overexpression was correlated with the tumor progression in urothelial and bladder carcinomas. Furthermore, Lustig-Yariv *et al.* (1997) denied the hypothesis of *H19* as a tumor suppressor gene because the tumorigenicity of choriocarcinoma cell lines was accompanied with a high level of *H19* RNA synthesis. Expression of the *H19* gene in fetal tissues and its overexpression in tumors derived from these tissues induced Ariel *et al.* (1997) to consider the *H19* product as an "oncofetal RNA". However, this notion of "oncofetal RNA" defines the pattern of *H19* expression rather than bringing any knowledge about the accurate function of the gene. Consequently, to date it remains difficult to propose a clearcut role for *H19*.

Elsewhere, some authors described an up-regulating action of IGFs, insulin and protein kinase A, or a down-regulating action of growth factors (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ 1), serum, protein kinase C on the *H19* gene expression in different models (Voutilainen *et al.*, 1994 ; Han *et al.*, 1996). Nevertheless, up to the recent past, no active factor responsible for the regulation of the *H19* promoter has been identified. In this line of evidence, Kopf *et al.* (1998) reported recently that the human *H19* promoter is indirectly activated by retinoic acid (RA). This effect is under the control of both the promoter and a 3' downstream region. In addition, we recently demonstrated that the p53 protein down-regulates the *H19* promoter and based on this result, it has been proposed that *H19* could be implicated in the cell cycle (Dugimont *et al.*, 1998).

We have previously reported that in breast adenocarcinomas, overexpression of *H19* is significantly correlated with the presence of estrogen and progesterone receptors (Adriaenssens *et al.*, 1998). To determine the role of these receptors and their ligands on the *H19* gene expression, we studied *H19* activity in two healthy steroid hormone-sensitive organs (mammary gland and uterus). Indeed, although numerous data have been published about expression modalities of this gene in cancers or cancerous cell lines, little is known about its activity in normal tissues.

The advantage of the mammary gland comes from its physiological properties : it is a unique organ as its development occurs mainly in the adult. Its development depends on three major phenomena : 1) interactions between the epithelium and the underlying mesenchymal tissue (Sakakura *et al.*, 1991 ; Cunha *et al.*, 1992), 2) hormone and growth factor stimulations (Nandi *et al.*, 1958 ; Haslam, 1987 ; Snedeker *et al.*, 1991 ; Daniel and Robinson, 1992), 3) regulatory interactions with components of the extracellular matrix (Jones *et al.*, 1993 ; Thesleff *et al.*, 1995). The fetal development of the mammary gland is not controlled by hormones. On the contrary, its major morphological and functional modifications which occur during adulthood are hormone dependent ; steroid, corticoid, pituitary and placental hormones are involved (Topper and Freeman 1980). Steroid hormones act on the epithelial cells, but also on the adjacent mesenchymal cells. Their action may be direct, provoking a proliferation and/or a differentiation of the epithelial cells, but it may also be indirect, inducing a production of paracrine growth factors which then stimulate the epithelial cells. These stimulations result in the development of the mammary gland during puberty, estrus cycle, pregnancy and lactation. During the latter, the mammary gland achieves its maximum differentiation and ensures a nutritive function.

In parallel, steroid hormones control the development and functions of ovaries and the female genital tract throughout the sexual life of the organism. Indeed, follicle differentiation in ovaries and the blastocyst implantation which requires a peculiar physiological state of the uterus are regulated by steroid hormones.

Aware of the advantages of the mentioned organs, in the first section of this study, we determined by *in situ* hybridization (ISH) *H19* gene expression during mouse mammary gland development. The observed modulations suggested that steroid hormones are involved in the control of *H19* RNA synthesis. To test this hypothesis, in the second section we determined the modulations of the *H19* gene expression during the normal physiological variations of hormone levels throughout the estrus cycle. In the third section, we determined the role of three steroid hormones (corticosterone, 17- $\beta$ -estradiol, progesterone) on *H19* RNA synthesis in ovariectomized and adrenalectomized mice. Finally, in the last section, we followed an *in vitro* strategy to confirm the *in vivo* results. To this end, we demonstrated the control of the endogenous *H19* gene expression by hormones in cultured cells and performed cotransfection



experiments by using a reporter gene (*luciferase*) driven by the minimal *H19* promoter and different estrogen or progesterone receptor expression vectors (wild-type or mutated sequences). These experiments confirmed the activity of steroid hormones, *via* their nuclear receptors, on the *H19* promoter.

## RESULTS

### *H19 gene expression during the mammary gland development*

As a first approach, we studied by ISH the *H19* gene expression during mammary gland development. In 14.5-day-old female fetus, we observed a high ubiquitous expression of *H19* within primary mammary buds, and also in adjacent tissues (Fig 1, row 1). At birth, the *H19* gene was repressed in most tissues, including in the mammary gland where *H19* RNA quantity was dramatically reduced in epithelial and mesenchymal cells (Fig 1, row 2). This pattern of expression continued until puberty (Fig 1, row 3, a 25-day-old female). During puberty, beginning at the fifth week, the mammary epithelium grew extensively and ramified throughout the mammary fat pad. This growth was correlated with an increase of *H19* gene expression, especially in terminal-end-buds newly formed, whereas the activity of the gene remained unchanged in mesenchymal cells (Fig 1, row 4, a 35-day-old female). In mature virgin mice, the arrest of ductal development was concomitant with a decrease of *H19* RNA synthesis, which reached basal levels observed before puberty (data identical to that observed in Fig 1, row 3). In pregnant mice, the development of lobulo-alveolar structures was accompanied with a very high expression of *H19* in epithelial cells forming the acini, whereas in mesenchymal cells the *H19* expression rate did not vary (Fig 1, row 5). After parturition, *H19* RNA synthesis decreased rapidly and the transcripts became almost undetectable during lactation (Fig 1, row 6). After weaning, *H19* expression increased once more, throughout the involution phases, up to the pre-pregnancy level (Fig 1, rows 7 and 8, 5th and 15th days after weaning respectively). At the onset of involution, we noticed an intense *H19* signal in some epithelial cells forming clusters. Variations of *H19* gene expression are summarized in Table I. These observations led us to propose the hypothesis of a control of the *H19* gene expression by steroid hormones during the different stages of the mammary gland development after birth and during the various physiological states of the adult female.

### *H19 gene expression during the estrus cycle.*

To test the action of steroid hormones on *H19* gene expression, we determined by ISH, *H19* RNA quantities in the mammary gland and uterus at each stage of the estrus cycle.

In the mammary gland of mature virgin mice, few significant variations in *H19* RNA synthesis were observed during the estrus cycle (Fig 2) and the *H19* gene expression level remained almost constant. However, in metestrus, the *H19* level appeared higher than in other stages (Fig 2, row 2). In contrast, in the uterus, it was quite obvious that the *H19* gene activity, which was detected in the endometrial stroma and in myometrium but not in luminal and glandular epithelium, varied enormously during the estrus cycle (Fig 3). The *H19* transcripts were only localized in some clustered cells. The large variations of *H19* gene expression were correlated with the morphological alterations of the endometrium. A moderate expression of *H19* was found in stromal cells and the myometrium during the proestrus (Fig 3, row 4) and the level of *H19* transcription increased gradually during the proliferative phase until ovulation (estrus, Fig 3, row 1). After the latter, *H19* RNA synthesis remained high during the early secretory phase (metestrus ; Fig 3, row 2), whereas during the late secretory phase it was dramatically reduced (diestrus ; Fig 3, row 3). Then, variations of *H19* gene expression in the uterus during the estrus cycle could be related to the actions of steroid hormones on this organ.

***Effects of steroid hormones on the H19 gene expression in both ovariectomized and adrenalectomized animals.***

To investigate more precisely the role of steroid hormones on *H19* gene expression, we performed an *in vivo* study using animals with complete hormonal depletion after surgical castration and adrenalectomy, followed by steroid replacement. Mature virgin mice were ovariectomized, adrenalectomized and then were treated with 17- $\beta$ -estradiol (E2), progesterone (P) and corticosterone (B), either alone or in combination of two or three molecules. Mammary gland and uterus were collected and prepared for ISH ; in parallel, rates of circulating hormones were measured by radio-immuno assay (Table 2). These hormonal rates in plasma were compatible with the injected doses. Table 2 shows the effect of the different treatments on uterus weight and figure 4 reports correlated variations in the morphology of the uterus. In operated mice injected with the solvent only, the hormonal depletion led to a regression of the uterus (compare Fig 4 A with B). E2 provoked a high increase of the weight of the uterus (Table 2 and Fig 4 C), reflecting a proliferative activity of this hormone (Fig 5). P led to an increase of uterus weight, which was weaker than that induced by E2. A treatment with B alone or in combination with E2

and P restored the normal weight of the uterus (Table 2). These results are consistent with our knowledge about steroid action on the uterus and validate our experiments.

In mammary glands, no *H19* RNA synthesis was detectable in the animals which were treated differently (data not shown). In addition, the hormonal treatments seemed to have had few effects on mammary gland morphology. On the contrary, in the uterus, all treatments dramatically affected the development of this organ (Fig 5, column I). These morphological and probably physiological changes were accompanied with obvious modulations of the *H19* expression which occurred in the uterus. In the uterus of sham-operated mice treated with solvent only, no significant difference in *H19* labeling was observed compared with that reported for non-operated animals (Fig 3). Eventual individual variations of labeling in these mice could be the consequence of steroid modulations during the estrus cycle as it has been reported above (Fig 3). The hormonal depletion after the mentioned ablations led to an important repression of *H19* gene (Fig 5, row 1). The normal pattern of *H19* gene expression was restored by injections of E2 (Fig 5, row 3); *H19* RNA synthesis reached a level comparable or even greater to that one observed in estrus or metestrus stages of normal cycling mice (Fig 3, rows 1 and 2). B injections gave roughly the same general pattern of *H19* gene expression (Fig 5, row 2), but the labeling was weaker than that observed after the E2 treatment alone. Injections of P alone were not able to restore the normal *H19* RNA synthesis (Fig 5, row 4) and even, in combination with E2 or E2+B, this hormone inhibited, at the dose used, the *H19* gene expression (Fig 5, rows 5 and 6 respectively).

#### ***In vitro study of steroid regulation of the H19 gene expression.***

To show that steroid hormones could up- and down-regulate *H19* expression with respectively 17- $\beta$ -estradiol and progesterone, we performed *in vitro* experiments.

For this purpose, we first analyzed by Northern-blot the *H19* RNA synthesis in a human hormone-sensitive mammary epithelial cell line, MCF-7. A weak *H19* expression was observed in these cells cultured in normal medium. This signal was reduced when serum-free medium was used. When 17- $\beta$ -estradiol ( $10^{-8}$  M) was added to this medium, a net increase of *H19* gene expression was observed (Fig 6). This effect of 17- $\beta$ -estradiol was reduced but not fully abolished by the anti-estrogen tamoxifen ( $10^{-6}$  M).

Cotransfection experiments were then performed in MCF-7 cells : *H19* promoter coupled with the *luciferase* gene was cotransfected with a wild-type (WT) or a mutated estrogen receptor (ER) construct or with a WT progesterone receptor (PR). In normal medium, WT ER induced a six-fold increase of *H19* gene activity ; on the contrary WT PR down-regulated the *H19* promoter, and cotransfection of the both receptors attenuated the up-regulation provided by ER alone (Fig 7A).

To gain more insight into the positive regulation of the *H19* promoter by E2 and ER we performed other experiments in MCF-7 cells by using different mutated ER versions, in the presence or in the absence of hormonal stimulation (Fig 7B). In estrogen-free medium, transfection of WT ER provoked a 2.5 fold increase of *H19* promoter activity, whereas E2 added to the medium, further enhanced this positive regulation (about 3.5 fold). In estrogen-free medium, the different mutated versions of ER led to an increase of *H19* promoter activity, but weaker than that induced by WT ER. On the contrary, in E2 added medium, WT and mutated ER up-regulated similarly the *H19* promoter.

## DISCUSSION

Several data have been reported on status of *H19* gene expression in carcinomas and cancerous cell lines, but little is known about its expression in healthy tissues and the factors implicated in this regulation. In a previous study, we demonstrated that in breast adenocarcinomas the *H19* gene overexpression was significantly correlated with the presence of estrogen and progesterone receptors (Adriaenssens *et al.*, 1998). To determine more precisely the effects of steroid hormones on the *H19* gene expression, we observed modulations of the *H19* RNA synthesis in two hormone-sensitive organs (mammary gland and uterus) at different normal stages of life in mice ; then we went further into the details of the role of steroid hormone in ovariectomized and adrenalectomized animals in hormone replacement experiments ; finally we analyzed the control of steroid hormones, *via* their receptors, on the *H19* promoter.

ISH results showed that during the genesis of the mammary gland, *H19* gene expression depends on the stage of development. In the fetus, *H19* gene activity is high in the mammary bud and in adjacent tissues. This result is in agreement with previous studies which demonstrated that most of fetal tissues (except the thymus and the nervous system) strongly expressed this gene (Pachnis *et al.*, 1988). As the fetal mammary gland development is not underlying with hormonal stimulation (Topper and Freeman, 1980), we can speculate that during fetal life, the strong *H19* expression is independent of hormonal actions. At birth, the *H19* RNA synthesis is strongly attenuated and although this repression is general, its rate depends on the organ. This repression is not complete in the mammary cord (Fig 1) and a basal transcription level persists in the adult, as previously described (Douc-Rasy *et al.*, 1993 ; Dugimont *et al.*, 1995 ; Adriaenssens *et al.*, 1998). This pattern of expression remains all along the prepubertal development and during this stage the mammary gland growth is isometric and no morphological or fonctionnal variations occur. At the time of sexual maturation, the terminal extremity of the mammary ducts grows up again and forms the terminal end buds which then invades the fat pad ; simultaneously the branching degree of the canal increases. All these phenomenons need proliferation, migration and differentiation of the epithelial cells and are correlated with a high expression of the *H19* gene, especially in terminal end buds (Figure 1, row 4). These results suggest that the *H19* gene could be implicated in one or more of these mechanisms. In mature virgin mice, after the arrest of ductal

growth, the *H19* gene expression becomes weak and remains constant. This observation is discussed further on. In pregnant mice, the mammary ducts differentiate in lobulo-alveolar structures and the adipocyte part is dramatically reduced ; at this stage the *H19* gene is strongly expressed (Fig 1, row 5). It must be underlined that high rates of *H19* RNA synthesis in the mammary gland occurred at puberty and pregnancy, which are two preferential stages in which steroid hormones exhibit a high activity. During lactation, the lobular system differentiates to form acini producing milk. At this stage, the mammary gland reaches its complete stage of differentiation ensuring a nutritive function. All along this stage, the *H19* gene expression is completely repressed in all mammary components. Thus, it seems that *H19* is not associated with the terminal differentiation of epithelial cells, which arises during lactation. At the time of involution, a disorganization of the epithelial lobulo-alveolar structures occurs and the mammary gland recovers its pre-pregnancy status ; these phenomena are accompanied with a return to basal levels of the *H19* gene expression. It is well known that estrogens stimulate the ductal development during puberty, whereas progesterone, in combination with estrogens, regulates the lobulo-alveolar development during pregnancy (Nandy, 1958 ; Haslam and Shyamala, 1980 ; McCormack and Greenwald, 1974). Thus, the high expression of *H19*, particularly during these two stages, argues in favor of a role of *H19* gene in the mammary gland development and suggests that this developmental regulation is under endocrine control.

To ascertain this hypothesis, we studied by ISH the *H19* gene expression in mammary gland and uterus during the estrus cycle. In the mammary gland of mature virgin mice, no real significant variations of *H19* gene expression were observed at the different stages of the estrus cycle, except a weak increase of labeling during the metestrus. This absence of a large variation can be correlated with the absence of high morphological repair during the estrus cycle in this organ. It appears then that *H19* is highly expressed in the mammary gland only when canals differentiation occurred, but its expression remains rather weak and constant during periods of comparative rest. Consequently, the *H19* RNA synthesis seems to be sensitive to high doses of hormones (for instance during puberty or pregnancy), but not to more moderate variations of hormone concentrations (in the estrus cycle). We demonstrated on the contrary that in the uterus *H19* labeling varied during the estrus cycle. During the proliferative phase (proestrus, estrus) and

early secretory phase (metestrus), the *H19* RNA synthesis increased gradually, whereas in diestrus (late secretory phase) the *H19* labeling was the weakest. In view of these results, we hypothesized that the cyclic changes of the *H19* expression can be assigned to hormonal variations. Furthermore, discrepancies observed between responses of the *H19* gene in the mammary and uterine tissues during the estrus cycle could account for the higher sensitivity of the uterus to hormone variations, compared to the mammary gland. Otherwise, some of our results obtained in mouse differ from those observed by Ariel *et al.* (1997) in humans. Indeed, in humans, the *H19* labeling is ubiquitous in the stromal component of the uterus, whereas in the mouse only some cells forming clusters express *H19* (Fig 3 and 5). In addition, the *H19* activity in myometrium seems to be specific to the mouse model. Likewise, the modulations of *H19* gene expression in the murine uterus is not in agreement with that reported in the human uterus (Ariel *et al.*, 1997): in human endometrium, a peak of *H19* expression arises at the late secretory phase and the weakest *H19* RNA synthesis appears at the beginning of this phase; on the contrary, in the murine homologue tissue, the high and low levels of *H19* activity are observed at the early and late secretory phases respectively. These discrepancies can be explained by the differences between the human and the mouse sexual cycle. Indeed, the murine estrus cycle differs considerably from the human menstrual cycle, in particular, its short duration (4 days) does not sufficiently prepare the endometrium for the nesting of the blastocysts. The differentiation of the uterus appears to be unfinished in the mouse at the end of the cycle, whereas in humans, the uterus is ready to accept the embryo at the end of the luteinic phase. Therefore, the *H19* expression patterns in mouse and human uterus seem to be species specific.

To determine which steroid hormones could be implicated in the regulation of the *H19* gene, we performed hormonal replacements in ovariectomized and adrenalectomized animals. In the mammary gland, no *H19* RNA synthesis was observed regardless of the injected hormones (17- $\beta$ -estradiol: E2, progesterone: P, corticosterone: B). The same results were obtained in prepubertal mice (24-days old animals) ovariectomized and adrenalectomized and similarly treated with hormones (data not shown). Several reasons could explain these results in the mammary gland : either artificial hormone treatments were not able to reproduce the appropriate normal conditions arising during puberty or pregnancy, or the hormonal dosage must be very accurate to



induce an obvious up regulation of the *H19* gene, or hormones may act in synergy with other mediators which are absent from our injection experiments. However, according to these data we can not exclude that in mammary gland the *H19* gene expression is not directly influenced by steroid hormones. On the contrary, injected hormones provoked modulations of *H19* gene expression in the uterus, an *a priori* more sensitive organ. The hormonal depletion led to the absence of *H19* labeling in this organ. E2 and B were responsible for an up-regulation of *H19*, whereas P repressed the gene. Compared to the normal situation, the injection of E2 or B provoked an increase in the labeling of cells gathered in clusters, but not a recruitment of more cells expressing the gene. Consequently, *H19* could be used as a marker of hormone-sensitive cells in the uterus of mice. It is interesting to notice that when the mouse is treated with B or E2, dramatic morphological changes and differentiation in the uterus are accompanied with a recovery of *H19* gene expression, whereas when mice are treated with P, few changes occur and *H19* gene expression remains null. In addition, these data can explain the modulations of *H19* RNA synthesis observed in the estrus cycle. Indeed during the cycle, the *H19* expression is under the control of two opposite actions : an up-regulation by E2 and a down-regulation by P. Likewise, we noticed that the high *H19* expression (during estrus and metestrus) did not coincide exactly with the peak of estrogen (proestrus-estrus). This discrepancy can be explained by the action of other factors modulating hormonal actions themselves, by the delay required for the synthesis of *H19* RNA after hormonal stimulations, or by the half-life of the RNA. If we hypothesize that E2 and P have similar actions in mammary gland (at high doses) and in uterus, we can explain the high *H19* expression during puberty and pregnancy by a high estrogen stimulation, in spite of the presence of progesterone. Development of the mammary gland and the uterus involve proliferation and differentiation of cells. These two mechanisms are usually associated, and it is commonly admitted that estrogens drive rather cell proliferation, whereas progesterone provokes cell differentiation (Haslam, 1987). Although our results do not confer an accurate function to the *H19* gene, the up-regulation by estrogens and the down-regulation by progesterone suggest an implication of *H19* in some proliferation processes, at least in the uterus where the hormonal control of *H19* gene expression is unambiguous. Nevertheless, using antibodies raised against Ki-67, a cell cycle marker protein, we have determined that *H19* gene expression is not correlated

with this cell cycle marker (data not shown). Then, relationships between *H19* gene expression and proliferation processes remain a matter of debate.

Finally, we report that E2 stimulated the *H19* RNA synthesis in MCF-7, a hormone-sensitive mammary epithelial cell line, whereas tamoxifen reduced this estrogen-induced synthesis. Consequently, we performed cotransfection assays and we investigated further the steroid hormones and their specific nuclear receptors acting on an ectopic *H19* promoter. In MCF-7 cells, we demonstrated that transfection of wild-type estrogen receptor (ER) was followed by an increase of the *H19* promoter activity and that experiments involving the progesterone receptor (PR) led to a decrease of this activity. These results are in agreement with the up- and the down-regulation of *H19* observed after E2 and P *in vivo* systemic stimulations, respectively. We went thoroughly into the E2-ER control of the *H19* promoter with cotransfections of various mutated ER constructs. In the absence of E2 stimulation, ER WT as the mutated forms induced an increase of *H19* promoter activity, but all the altered ER were less effective. This up-regulation is then ligand-independent, and this property can explain the results obtained with ER mutant : indeed, in the three altered versions used, the mutation maps were within the E sequence of the nuclear receptor, sequence which contains the hormone-dependent transactivating region. Consequently, it is conceivable that these mutations lead to an actual hormone-independent transactivation. On the contrary, when cotransfected cells were stimulated by E2, WT and mutant ER transactivated the *H19* promoter in the same manner. These similar responses can only be explained by a transactivation of the *H19* promoter by the bulk of endogenous ER, which in the presence of E2, mask the mutant effect. The discrepancy between luciferase activities after cotransfection with ER in normal medium with 10% serum (Fig 7A), and in a serum-free medium plus 17- $\beta$ -estradiol (Fig 7B) suggests the presence in serum of co-activators responsible for an increase of *H19* gene activation. For example, estrogens are required for converting the ER to a transcriptionally active form able to stimulate many genes. Furthermore, numerous data indicate that nuclear receptors, in particular the estrogen receptor, can be activated in the absence of their specific ligand (Weigel and Zhang, 1998 ; El Tanani and Green, 1997 ; Lee and Yee, 1995). In this case, other mediators seem to be necessary to activate the nuclear receptor (dopamine, antiestrogen, IGFs, EGF and cAMP). These factors provoke a conformational change in the receptor which becomes able to

transactivate targeted genes. Although no component responsible for this phenomenon has been identified, we have demonstrated *in vitro* that *H19* gene can be activated by ER in a cognate-ligand-independent manner. It is clear that the latter is not an unique pathway because *in vivo* studies have shown a response of *H19* gene to estradiol. It seems then that *H19* gene could be activated by the estrogen receptor in the both ligand-independent and ligand-dependent manners. In addition, our results can explain several observations of *H19* gene regulation reported in different models : as PKA and IGFs increase the *H19* gene expression (Voutilainen *et al.*, 1994), it is conceivable that these factors act through the estrogen receptors. Finally, even if mutants involved in our study have been previously described as exhibiting a negative transdominant role on an artificial promoter containing canonical estrogen responsive element, ERE, (Schodin *et al.*, 1995 ; Ince *et al.*, 1995), we demonstrated that these mutants can transactivate the minimal *H19* promoter through their non hormone-sensitive transactivating region. The *H19* promoter is devoid of canonical estrogen responsive elements, but exhibit several consensual or degenerated half-sites. Some studies have shown that the estrogen receptor can bind various direct or inverted repeats of the ERE half-sites (Kato *et al.*, 1995 ; Aumais *et al.*, 1996), so ER could act too on *H19* promoter by a direct manner.

In conclusion, this study demonstrates that steroid hormones regulate *H19* gene expression. It is obvious that in the uterus, 17- $\beta$ -estradiol enhances the *H19* RNA synthesis, whereas progesterone represses it. Both these actions, experimentally demonstrated *in vivo*, explain the modulations observed during the estrus cycle. It appears that *H19* is highly expressed when an organ (mammary gland or uterus) undergoes an extensive remodeling of its morphology and/or physiological state. It seems that alterations of the mammary gland are too weak during the estrus cycle to allow an overexpression of the *H19* gene at a peculiar stage. However, an actual steroid regulation of the gene must exist in the mammary gland as modulations of *H19* RNA synthesis have been observed all throughout the normal physiological stages of life of female mice. Finally, *in vitro* experiments confirmed that estradiol and progesterone exerted opposite roles on the *H19* promoter. Nevertheless, these experiments do not distinguish between a direct or an indirect action of steroid hormones on *H19* gene expression since these hormones can transactivate transcription factor gene expression which then regulate the *H19* gene. The

differences between *in vivo* and *in vitro* manipulations can explain the absence of an estrogenic activation in the mammary gland in ovariectomized and adrenalectomized animals after hormonal replacements, whereas in mammary cultured cells this activation is obvious. Indeed, we can suppose that in *in vitro* experiments some cofactors are missing, which however are present *in vivo*. Likewise, the vector used in the cotransfection experiments contained only the minimal *H19* promoter, but a *cis*-regulating region, missing *in vitro*, may be implicated *in vivo*. The cooperation of the 5' upstream and the 3' downstream regions of the mouse *H19* gene was previously described by Yoo-Warren *et al.* (1988). More recently, the implication of a *cis*-acting region in the *H19* activation was demonstrated since the up-regulation of human *H19* promoter by retinoic acid is dependent upon the 3' downstream domain (Kopf *et al.*, 1998). Finally, although evidence obtained either without hormonal stimulation or with mutant receptors substantiate a partially hormono-independent action of ER, *in vivo* and *in vitro* experiments clearly demonstrate the regulation of *H19* gene by steroid hormones.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals in normal physiological states**

The mammary gland (inguinal pairs 4 and 5) of Swiss 3T3 were collected at the following stages : embryonic life (E14.5), at birth (D0), before, during and after puberty (D25, D35 and mature virgin animals, respectively), during pregnancy (14<sup>th</sup> day), lactation (10<sup>th</sup> day after parturition), and involution (5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> days after weaning).

During the estrus cycle, mammary gland and uterus were collected on mature virgin mice. Each stage of the cycle (estrus, metestrus, diestrus and proestrus) was determined by vaginal smears from twelve-week old mice.

### **Hormone-treated animals**

Twelve-week old mice were ovariectomized and adrenalectomized or sham-operated under ether anaesthesia. One week after surgery, we proceeded to the following treatments : subcutaneous injection of 17- $\beta$ -estradiol (20  $\mu$ g/kg/day), or progesterone (1 mg/kg/day), or both in 10  $\mu$ l of sesame oil as solvent. In parallel, some animals were treated with corticosterone (0.3 mg/kg/day) dissolved in 10  $\mu$ l of the following solvent : absolute ethanol/0.9% NaCl (1:49 v/v). The latter hormone was injected either alone or in combination with estradiol and progesterone. Two control experiments were performed by injection of 10  $\mu$ l of solvent in operated or sham-operated mice. After two weeks of treatment, inguinal mammary glands and uterus were collected on sacrificed animals. All steroids purchased from Sigma.

### **Quantitative determination of circulating hormones**

Corticosterone and estradiol concentrations in plasma were measured by radio-immuno assay as previously described (Bernet *et al.*, 1994, Lesage *et al.*, 1996, respectively). Quantitative determination of progesterone in the plasma has been performed by a radio-immuno assay kit (PROG-CTRIA) purchased from Cis Bio International (Gif-sur-Yvette, France). The polyclonal anti-progesterone antibody presents the following cross-reactions at B/B0 = 0.5 : progesterone

100, deoxycorticosterone 6.2, 20  $\alpha$ -dihydroprogesterone 2.2, 6  $\beta$ -dihydroprogesterone 2.1, 16  $\alpha$ -hydroxyprogesterone 1.6, 5  $\beta$ -dihydroprogesterone 0.7, 17  $\beta$ -hydroxyprogesterone 0.5, testosterone 0.09, cortisol, estradiol and pregnenolone < 0.02. The variability was 3.5% (intra-assay) and 4.5% (inter-assay).

### **Cell cultures**

Human mammary epithelial cells, MCF7, were obtained from ATCC (USA). They were cultured in MEM supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS), 2 mM glutamine, 100 U-100  $\mu$ g/ml penicillin-streptomycin, 1% non essential amino acids (all purchased from Eurobio), and 5  $\mu$ g/ml insulin (Endopancrine, Organon). Cells were plated in 100 mm dishes and were grown to subconfluent stages.

In some experiments the culture medium was replaced by phenol-red free medium (Eurobio), supplemented with bovine serum albumin (BSA fraction V) at 2g/l, penicillin-streptomycin, glutamine, non essential amino acids, insulin and human transferrin (10 mg/l). After 48 h, cells were treated with hormones for 24 h and harvested.

### **Fixation, embedding and section of organs**

Mammary gland and uterus were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde-PBS, rinsed in PBS, dehydrated through increasing ethanol concentrations, embedded in paraffin and serially cut. Seven  $\mu$ m-sections were transferred to "SuperFrost plus" coated slides (Polylabo), incubated at 37°C one week and stored at 4°C until use.

### **Histological colorations**

Picro-indigo-carmin (PIC) or hemalun-phloxine-safran (HPS) staining was performed on one section of each sample in order to determine histological structures and to precisely localize the interesting areas for *in situ* hybridization.

### ***In situ* hybridization (ISH)**

ISH was performed as previously described by Quéva *et al.* (1992). Labeled probes were obtained as follow : antisense and sense  $^{35}\text{S}$ -CTP RNA probes were transcribed by SP6 polymerase from a 1.3 kb *Stu* I fragment of the human *H19* cDNA cloned at a *Sma* I site into pSP64 vector (Promega). Before *in vitro* transcription, the vector was linearized by *Hind* III. The 77%-nucleotide conservation between murine and human *H19* genes account for the cross-hybridization between *in situ* murine *H19* RNA and the human *H19* probe.

After dipping in a nuclear-track emulsion (Kodak NTB2), the slides were exposed for 3 weeks at 4°C before development. They were then stained by the intercalating dye Hoechst 33258, mounted in Glycergel (Dako) and observed under a double illumination using an Olympus BH2 photomicroscope, with epifluorescence for Hoechst staining and a dark-field condenser for silver grain detection.

### **Northern blot analysis**

Total RNAs were prepared from MCF-7 cells by the guanidium isothiocyanate-CsCl gradient method (Sambrook *et al.*, 1989). RNAs (20 µg) were separated on a 1.2% agarose/formaldehyde gel and transferred overnight onto a nitrocellulose membrane (Hybond-C-extra, Amersham). The membrane was placed at 80°C for 2 h and hybridized at 42°C with  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP labeled random primed cDNA probe (Megaprime Labeling System, Amersham). *H19* probe was a *Pst* I fragment (1.2 Kb) obtained by digestion of the pSP64 vector mentioned above. A GAPDH (Glyceraldehyde-3'-Phosphate Dehydrogenase) probe was used to quantify the *H19* RNA.

### **Cotransfection experiments**

MCF-7 cells were transiently cotransfected with the pGL2 plasmid containing the *H19* minimal promoter region (823 bp) associated with the *luciferase* reporter gene and the pCMV5 plasmid containing a sequence coding for different transcripts of the *estrogen receptor* (ER) gene : *i.e.* wild-type, a frame-shifted ER (S554fs), a point mutated ER (L540Q) and a truncated ER (ER1-530), or a pKSV10 plasmid in which a wild-type *progesterone receptor* cDNA was inserted. Information on pGL2 recombinant vectors can be obtained in Dugimont *et al.* (1998). pCMV 5

and pKSV10 recombinant vectors are described in Reese *et al.* (1991) and in Guiochon-Mantel *et al.* (1988) respectively.

Cotransfections were performed by using FuGENE™ 6 reagent (Boehringer Mannheim, USA): 1.75 µg of *H19-luciferase* plasmid and 0.35 µg of the tested plasmid were used for the cotransfections of cells plated in a six-well dish. Controls were performed by using empty plasmids. Cells were incubated with reagents 6h at 37°C, then the culture medium was changed. 48h after transfections, cells were harvested with a reporter lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA). Luc assay was performed by using a *luciferase* assay system (Promega kit) and Luc activities were measured by a lumat LB 9501 (Berthold). Luc activities were normalized with total protein concentrations determined by densitometry (DU\*64 spectrophotometer, Beckman) at 595 nm wavelength.



## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Anne Chauchereau (INSERM U135, University Paris-sud, Le Kremlin-Bicêtre) and Dr Jean-Marc Vanacker (ENS, Lyon) for graciously providing progesterone receptor and wild-type or mutated estrogen receptors, respectively. We thank also Dr Julie Kerr-Conte and Dr Victor Nurcombe for critical reading of the manuscript. We are indebted to Dr Bernard Vandebunder, Director of the laboratory « Régulation des processus invasifs, de l'angiogenèse et de l'apoptose », (Institut de Biologie Moléculaire, Lille) for our training in his laboratory and to Fatima Bouali for her help in *in situ* hybridization technique. We are grateful to Chantal Pennel (Centre anti-cancéreux Oscar Lambret, Lille) and Isabelle Pollet for their help in histological methods. This work was supported by grants from Pasteur Institute of Lille. J.J. Curgy holds grant from the Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (Fé-GEFLUC) and from the NORGINE PHARMA laboratories (Paris). E. Adriaenssens is a recipient of an ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) fellowship.

## LEGENDS OF THE TABLES.

**Table 1** : Semi-quantitative evaluations of *H19* gene expression in epithelial and stromal components of the mouse mammary gland at various stages of life.

<sup>1</sup> Expression depends on the cellular type : average in adipocytes and blood vessel cells, non-ubiquitous in other cells.

<sup>2</sup> Very rare mesenchymal cells are observed at this stage.

T E B : terminal end buds.

**Table 2** : Circulating hormone rates measured by radio-immuno assay and weight of the uterus.

N D : no determination.

B : corticosterone ; E2 : 17- $\beta$ -estradiol ; P : progesterone ; S : solvent.

Values are the mean  $\pm$  S.D. of two or three animals.

## LEGENDS TO THE FIGURES.

**Figure 1 :** *H19* gene expression during mouse mammary gland development.

I : histological coloration. II : Hoechst staining. III : *in situ* hybridization with an antisense *H19* riboprobe. Mammary gland at different stages of development : 1) a mammary bud (arrow) of a mouse embryo (E 14.5) ; 2) mammary cord of a new-born mouse (D0) ; 3 to 6) mammary glands of mice before (D25) or during (D35) puberty, during pregnancy, and lactation respectively ; 7 and 8) mammary gland during involution, 5th and 15th days after weaning respectively.

*H19* was highly expressed in the fetus (1), during puberty (4), particularly in the terminal end bud (arrow-head) and in acini during pregnancy (5). This expression was reduced in all other stages and null during lactation in lobulo-alveolar structures (6). Magnification in rows 1, 2 and in I-3 is defined by bar the in I-3 = 275  $\mu\text{m}$ . Magnification in other panels (rows 4 to 8, II-3 and III-3) is defined by the bar in I-4 = 120  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2 :** *H19* gene expression in mammary gland of mature virgin mice during the estrus cycle.

I : Hoechst staining. II : *in situ* hybridization with antisense *H19* riboprobe. 1 to 4 : mouse mammary gland during estrus, metestrus, diestrus and proestrus respectively.

*H19* expression was very weak in all stages. Nevertheless, *H19* RNA synthesis increased very slightly during the metestrus (2). Magnification is defined by the bar in I-1 = 160  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3 :** *H19* gene expression in the uterus of mature virgin mice during estrus cycle.

I : histological coloration. II : Hoechst staining. III : *in situ* hybridization with antisense *H19* riboprobe. 1 to 4 : mouse uterus during estrus, metestrus, diestrus and proestrus respectively.

*H19* was expressed in the stroma (arrow) and in the myometrium (double arrows), but not in glandular and luminal epithelium (arrow-head) (metestrus, 2). *H19* expression levels were high in estrus and metestrus (1 and 2), weaker in proestrus (4) and the weakest in diestrus (3). These modulations were linked to major morphological changes in the uterus during the estrus cycle (I).

Magnification in column I is defined by the bar in I-1 = 350  $\mu\text{m}$ . Magnification in column II and III is defined by the bar in II-1 = 160  $\mu\text{m}$ .

**Figure 4 :** Effects of hormonal treatments on the morphological aspect of the uterus.

A : uterus and ovaries of sham-operated mice as control. B : uterus of mice ovariectomized (OVX) and adrenalectomized (ADX) and then treated with solvent only. C : uterus of OVX and ADX mice treated with 17- $\beta$ -estradiol.

The atrophy of uterus can be observed after the surgical act (compare A with B), and its hypertrophy (larger than the control), after 17- $\beta$ -estradiol treatment (compare A with C). Scale at the top of the panels = 2 cm.

**Figure 5 :** *H19* gene expression in mouse uterus after hormonal treatment.

I : histological coloration. II : Hoechst staining. III : *in situ* hybridization with antisense *H19* riboprobe. 1 to 4 : uterus of mice OVX and ADX and treated with solvent, corticosterone (B), 17- $\beta$ -estradiol (E2) and progesterone (P) respectively. 5 : uterus of operated animals treated with E2 and P. 6 : uterus of operated animals treated with B, E2 and P.

*H19* gene expression was reduced after operation (compare row 1 with Fig 3). E2, and to a lesser extent B, restored the *H19* RNA synthesis in stroma and myometrium (rows 3 and 2 respectively). P had no effect on this synthesis when it was administered alone (4), and it inhibited the action of E2 and B (5 and 6). Magnification in column I is defined by the bar in I-1 = 350  $\mu\text{m}$ . Magnification in column II and III is defined by the bar in II-1 = 160  $\mu\text{m}$ .

**Figure 6 :** Northern-blot analysis of endogenous *H19* gene expression in MCF-7 cells after hormonal treatment.

Lane 1 : RNA isolated from HeLa cells used as a control of a high *H19* RNA synthesis. Lane 2 to 5 : RNA of MCF-7 cells cultured : (2) in normal medium; (3) in serum-free medium ; (4) in serum-free medium supplemented with 17- $\beta$ -estradiol ( $10^{-8}$  M) and (5) this latter medium supplemented with tamoxifen ( $10^{-6}$  M).

*H19* signal was detected in MCF-7 in the presence of serum. This level was diminished in serum-free medium. *H19* gene expression was increased when cells were stimulated by 17- $\beta$ -estradiol and tamoxifen slightly reduced this stimulation.

**Figure 7 :** A) Action of WT estrogen and progesterone receptors, ER and PR respectively, on the *H19* promoter in transfected MCF-7 cells cultured in normal medium. pGL2 : empty vector control.

B) Action of WT and mutant (ER1-530, ER L540Q, ER S554fs) estrogen receptors (ER) on the *H19* promoter in the presence or in the absence of 17- $\beta$ -estradiol (E2).

H19-Luc : *H19-luciferase* reporter gene.

All values are normalized to 100% *luciferase* activity measured in cells transfected with the reporter construct only and are the means of three independent experiments.

## REFERENCES

- Adriaenssens E, Dumont L, Lottin S, Bolle D, Leprêtre A, Delobelle A, Bouali F, Dugimont T, Coll J and Cury JJ. (1998). *Am. J. Pathol.*, In press.
- Ariel I, Lustig O, Oyer CE, Elkin M, Gonik J, Rachmilewitz J, Biran H, Goshen R, de Groot N and Hochberg A. (1994). *Gynecol. Oncol.*, **53**, 212-219.
- Ariel I, Ayesh S, Perlman EJ, Pizov G, Tanos V, Schneider T, Erdmann VA, Podeh D, Komitowski D, Quasem AS, de Groot N and Hochberg A. (1997). *Mol. Pathol.*, **50**, 34-44.
- Ariel I, Weinstein D, Voutilainen R, Schneider T, Lustig-Yariv O, de Groot N and Hochberg A. (1997). *Diagn. Mol. Pathol.*, **6**, 17-25.
- Aumais JP, Lee HS, DeGannes C, Horsford J and White H.J. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 12568-12577.
- Bartolomei MS, Zemel S and Tilghman SM. (1991). *Nature*, **351**, 153-155.
- Bartolomei MS, Webber AL, Brunkow ME and Tilghman SM. (1993). *Genes Dev.*, **7**, 1663-1673.
- Bernet F, Maubert E, Bernard J, Montel V and Dupouy JP. (1994). *Regul. Peptides*, **52**, 187-193.
- Biran H, Ariel I, de Groot N, Shani A and Hochberg A. (1994). *Tumour Biol.*, **15**, 123-134.
- Brannan CI, Dees EC, Ingram RS and Tilghman SM. (1990). *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 28-36.
- Cooper MJ, Fischer M, Komitowski D, Shevelev A, Schulze E, Ariel I, Tykocinski ML, Miron S, Ilan J, de Groot N and Hochberg A. (1996). *J. Urol.*, **155**, 2120-2127.
- Cui H, Hedborg F, He L, Nordenskjöld A, Sandstedt B, Pfeifer-Ohlsson S and Ohlsson R. (1997). *Cancer Res.*, **57**, 4469-4473.
- Cunha GR, Young P, Hamamoto S, Guzman R and Nandi S. (1992). *Epith. Cell Biol.*, **1**, 105-118.
- Daniel CW and Robinson SD. (1992). *Mol. Reprod. Dev.*, **32**, 145-151.
- DeChiara TM, Robertson EJ and Efstratiadis A. (1991). *Cell*, **64**, 849-859.
- Douc-Rasy S, Coll J, Barrois M, Joubel A, Prost S, Dozier C, Stéhelin D and Riou G. (1993). *Int. J. Oncol.*, **2**, 753-758.
- Dugimont T, Cury JJ, Wernert N, Delobelle A, Raes MB, Joubel A, Stéhelin D and Coll J. (1995). *Biol. Cell*, **85**, 117-124.
- Dugimont T, Montpellier C, Adriaenssens E, Lottin S, Dumont L, Iotsova V, Lagrou C, Stéhelin D, Coll J. and Cury JJ. (1998). *Oncogene*, **16**, 2395-2401.
- El Tanani MK and Green CD. (1997). *Mol. Endocrinol.*, **11**, 928-937.
- Eversole-Cire P, Fergusson-Smith AC, Surani MA and Jones PA. (1995). *Cell Growth Differ.*, **6**, 337-345.
- Glaser T, Housman D, Lewis WH, Gerhard D and Jones C. (1989). *Somat. Cell. Mol. Genet.*, **15**, 477-501.

- Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Ragot T, Bailly A, Atger M, Misrahi M, Perricaudet M and Milgrom E. (1988). *Nature* , **336**, 695-698.
- Han DKM, Khaing ZZ, Pollock RA, Haudenschild CC and Liau G. (1996). *J. Clin. Invest.*, **97**, 1276-1285.
- Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E and Tycko B. (1993). *Nature* , **365**, 764-767.
- Haslam SZ and Shyamala G. (1980). *J. Cell Biol.*, **86**, 730-737.
- Haslam SZ. (1987). *The Mammary Gland: Development, Regulation and function*. Neville MC and Daniel CW (ed). Plenum Press: New York, pp. 499-533.
- Ince BA, Schodin DJ, Shapiro DJ and Katzenellenbogen BS. (1995). *Endocrinology* , **136**, 3194-3199.
- Jones CM, Lyons KM and Hogan BLM. (1991). *Development* , **111**, 531-542.
- Joubel A, Curgy JJ, Pelczar H, Begue A, Lagrou C, Stéhelin D and Coll J. (1996). *Cell. Mol. Biol.*, **42**, 1159-1172.
- Kato S, Sasaki H, Suzawa M, Masushige S, Tora L, Chambon P and Gronemeyer H. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5858-5867.
- Kondo M and Takahashi T. (1996). *Nippon Rinsho* , **54**, 492-496.
- Kopf E, Bibi O, Ayesh S, Tykocinski M, Vitner K, Looijenga LHJ, de Groot N and Hochberg A. (1998). *FEBS Lett.*, **432**, 123-127.
- Lee AV and Yee D. (1995). *Biomed. Pharmacother.*, **49**, 415-421.
- Leibovitch MP, Nguyen VC, Gross MS, Solhonne B, Leibovitch SA and Berheim A. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**, 1241-1250.
- Leighton PA, Saam JR, Ingram RS, Stewart CL and Tilghman SM. (1995). *Genes Dev.*, **9**, 2079-2089.
- Lesage J, Bernet F, Montel V and Dupouy JP. (1996). *Neurochem. Res.*, **21**, 87-96.
- Liu J, Kahri AI, Heikkila P, Ilvesmaki V and Voutilainen R. (1995). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **80**, 492-496.
- Lustig-Yariv O, Schulze E, Komitowski D, Erdmann V, Schneider T, de Groot N and Hochberg A. (1997). *Oncogene* , **15**, 169-177.
- McCormack JT and Greenwald GS. (1974). *J. Endocrinol.*, **62**, 101-107.
- Moulton T, Crenshaw T, Hao Y, Moosikasuwon J, Lin N, Dembitzer F, Hensle T, Weiss L, McMorrow L, Loew T, Kraus W, Gerald W and Tycko B. (1994). *Nature Genet.*, **7**, 440-447.
- Nandi S. (1958). *J. Natl. Cancer Inst.*, **21**, 1039-1063.
- Pachnis V, Belayew A and Tilghman SM. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **81**, 5523-5527.
- Pachnis V, Brannan CI and Tilghman SM. (1988). *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 4707-4715.
- Quéva C, Ness SA, Grässer FA, Graf T, Vandenbunder B and Stéhelin D. (1992). *Development*, **114**, 125-133.
- Reese JC and Katzenellenbogen BS. (1991). *J. Biol. Chem.*, **266**, 10880-10887.
- Sakakura T. (1991). *Int. Rev. Cytol.*, **125**, 165-201.

- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989). Cold Spring Harbor Laboratory Press : 2nd Ed. CSH Press, Plainview, New York, 7.19-7.22.
- Schodin DJ, Zhuang Y, Shapiro DJ and Katzenellenbogen BS. (1995). *J. Biol. Chem*, **270**, 31163-31171.
- Snedeker SM, Brown CF and DiAugustine RP. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 276-280.
- Taniguchi T, Sullivan MJ, Ogawa O and Reeve AE. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2159-2163.
- Thesleff I, Vaahtokari A and Partanen AM. (1995). *Int. J. Dev. Biol.*, **39**, 35-50.
- Topper YJ and Freeman CS. (1980). *Physiol. Rev.*, **60**, 1049-1106.
- Voutilainen R, Ilvesmaki V, Ariel I, Rachmilewitz J, de Groot N and Hochberg A. (1994). *Endocrinology* , **134**, 2051-2056.
- Wang WH, Duan JX, Vu TH and Hoffman AR. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 27863-27870.
- Webber AL, Ingram RS, Levorse JM and Tilghman SM. (1998). *Nature* , **391**, 711-715.
- Weigel NL and Zhang Y. (1998). *J. Mol. Med.*, **76**, 469-479.
- Yballe CM. Vu TH and Hoffman AR. (1996). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 1607-1612.
- Yoo-Warren H, Pachnis V, Ingram RS and Tilghman SM. (1988). *Mol. Cell Biol.* , **8**, 4707-4715.
- Zemel S, Bartolomei MS and Tilghman SM. (1992). *Nat. Genet.*, **2**, 61-65.
- Zhang Y and Tycko B. (1992). *Nat. Genet.*, **1**, 40-44.

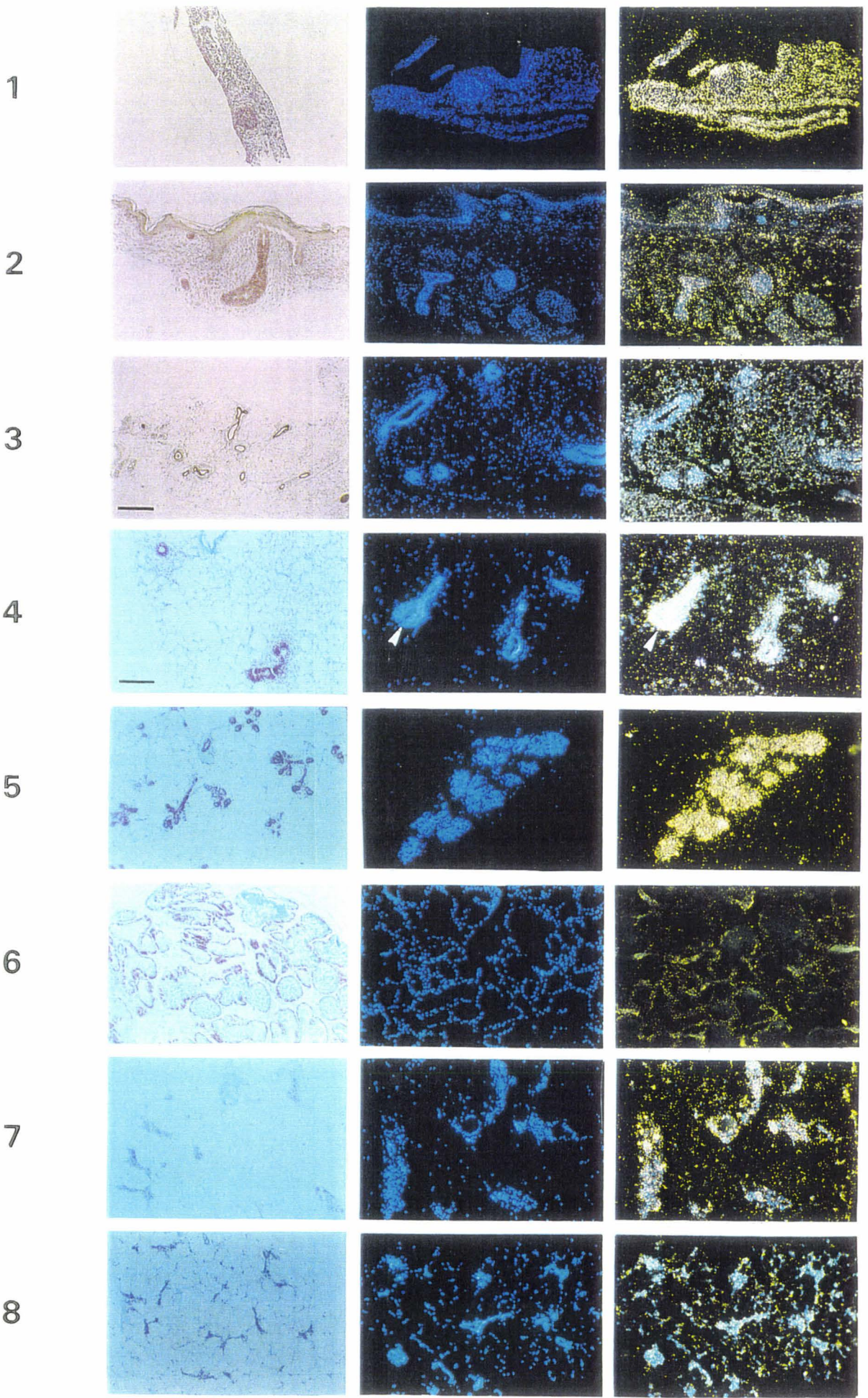


Stage	Epithelial cells	Mesenchymal cells
During fetal life	High	High
After birth until puberty	Basal level	Weak <sup>1</sup>
During puberty	High in epithelial duct in growing (T.E.B.)	Weak <sup>1</sup>
In mature virgin mice	Basal level	Weak <sup>1</sup>
During pregnancy	Very high in acini	Weak <sup>1</sup>
During lactation	Null	- <sup>2</sup>
During involution	Return to basal level	Weak <sup>1</sup>

**Table 1:**

Mice	Treatments	Circulating hormone rates			Uterus weight (mg)
		B (ng/ml)	E2 (pg/ml)	P (ng/ml)	
Sham-operated	S	25.5 ± 17.2	143 ± 20.5	83.3 ± 25.6	66 ± 1
Ovariectomized and Adrenalectomized	S	ND	49 ± 22.6	ND	20.5 ± 0.5
	B	11.1 ± 6.5	50.6 ± 16.7	6.6 ± 3.3	65.6 ± 14.2
	E2	5.2 ± 2.3	19885 ± 869	5.1 ± 2.3	92 ± 12.7
	P	4.7 ± 3.3	406 ± 127	510 ± 30	41.3 ± 3.05
	E2 + P	6.2 ± 5.6	11673 ± 7533	620 ± 187	71.6 ± 13.3
	E2 + P + B	17.6 ± 6.4	> 20000	709 ± 357	72.6 ± 12.05

Table 2



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

I

II

III



FIG 1



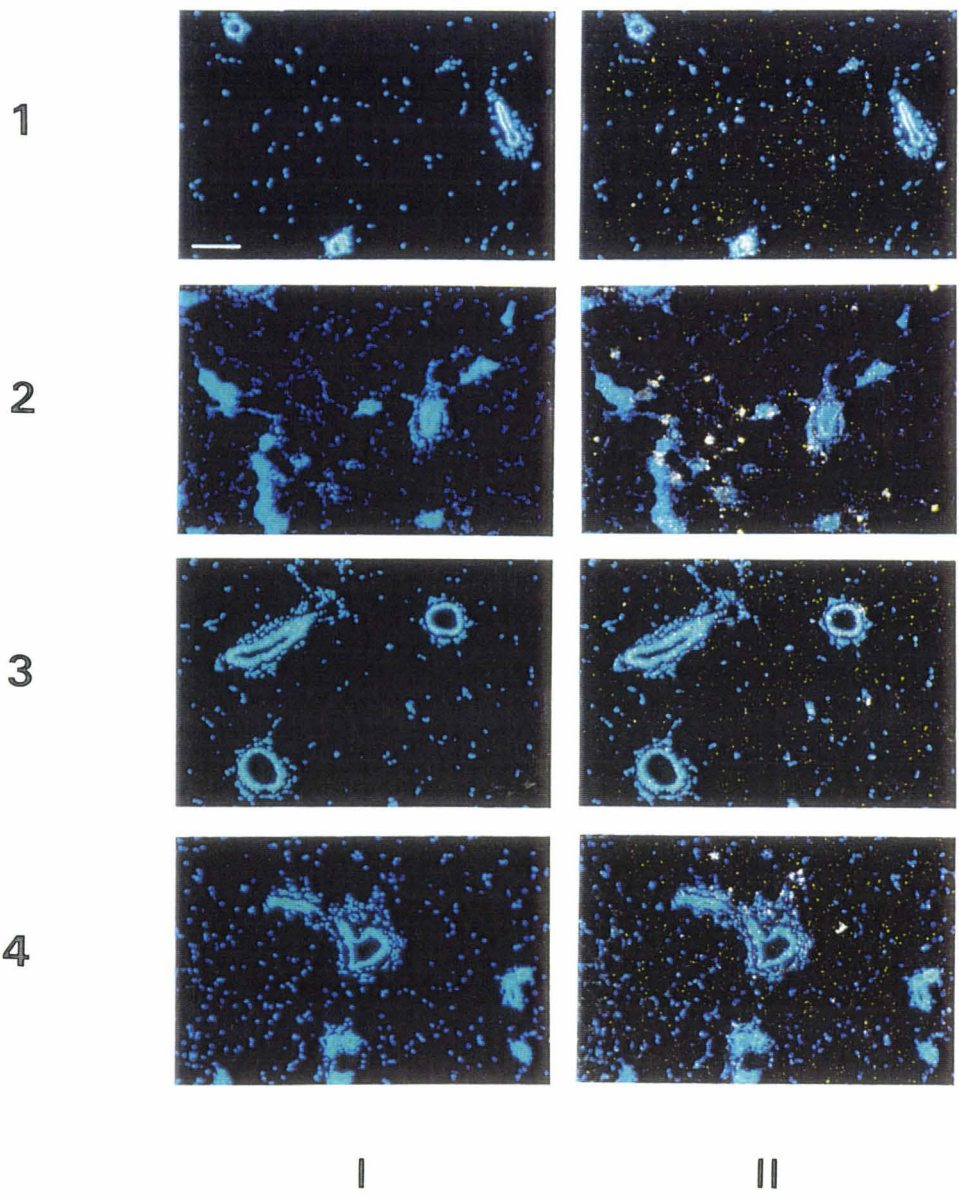


FIG 2

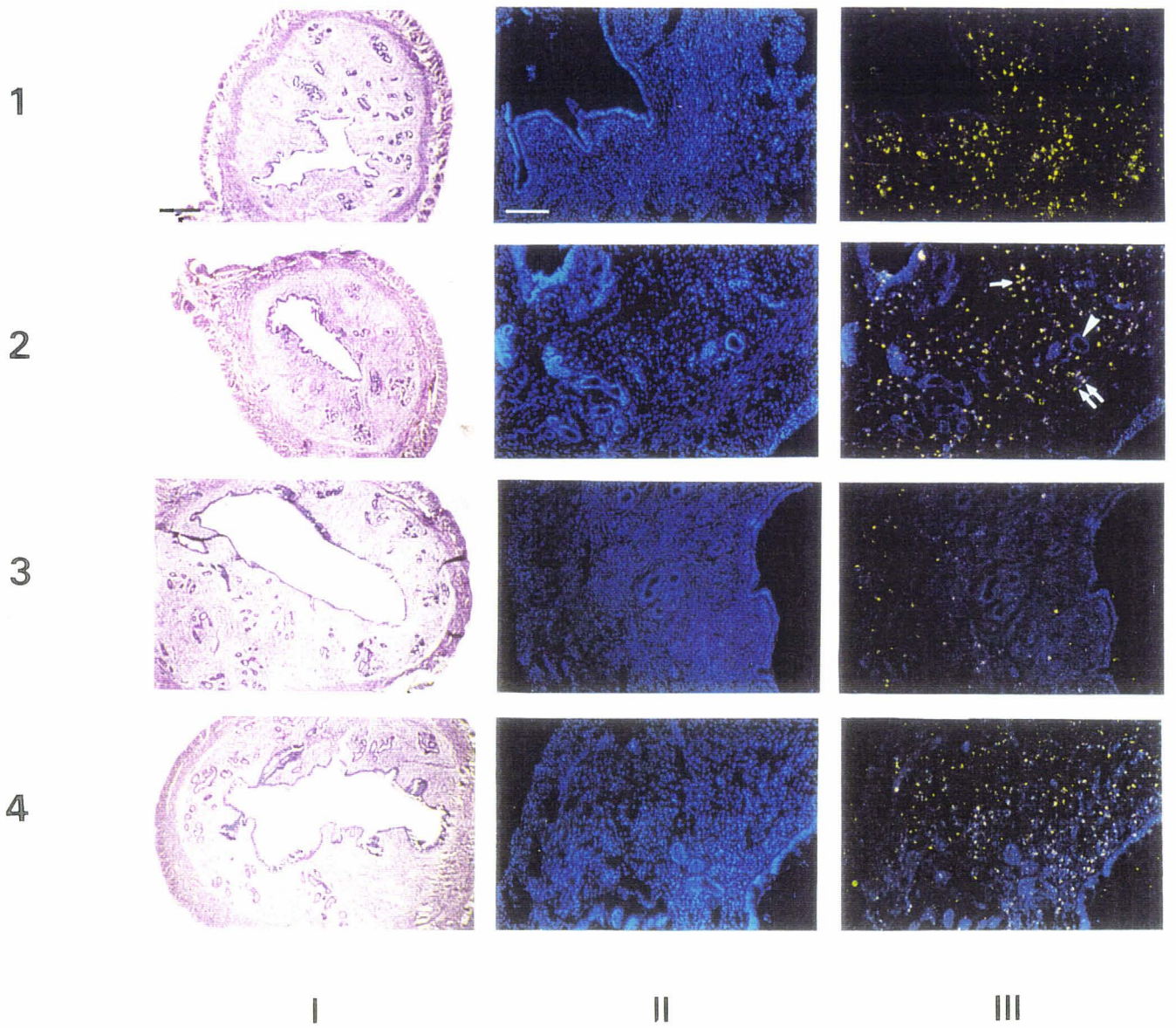
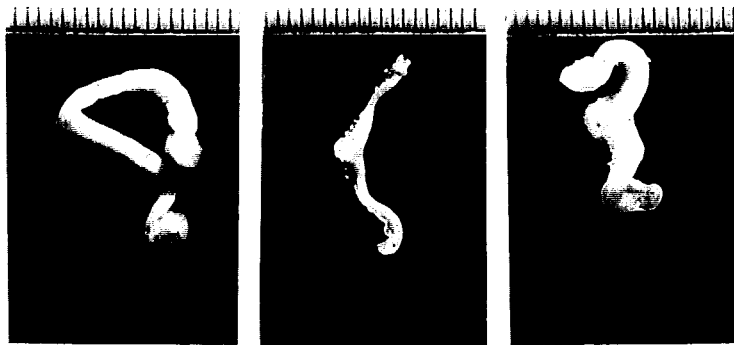


FIG 3



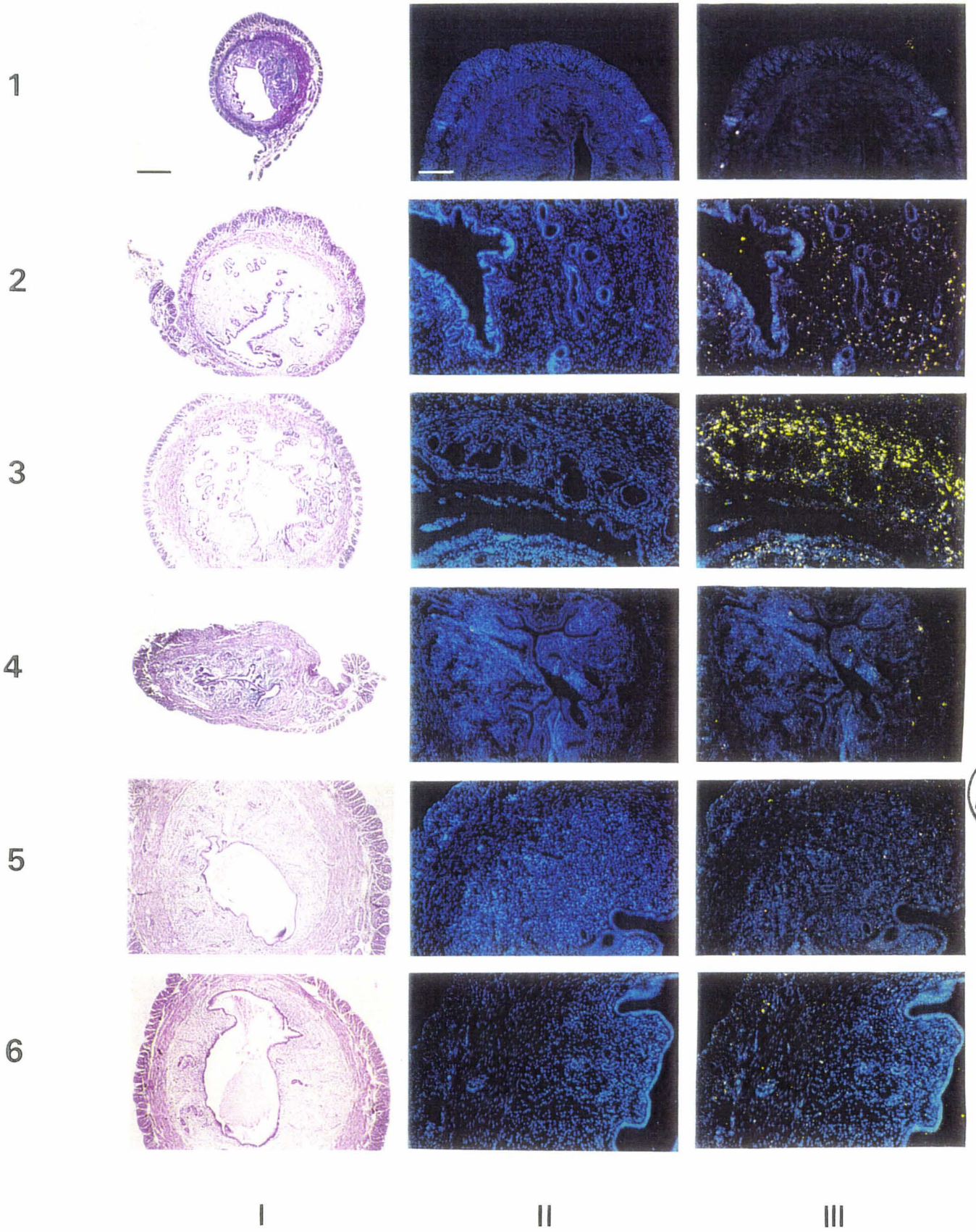
A

B

C

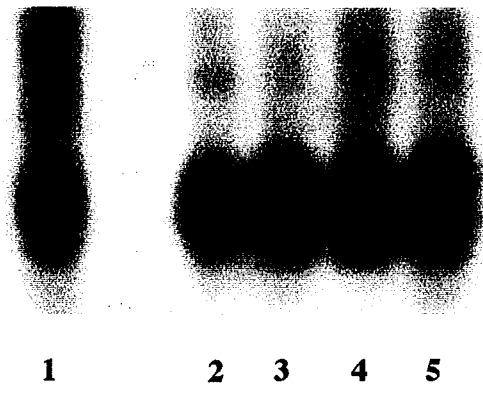






BU  
LILLE I

FIG 5



**H19**

**GAPDH**

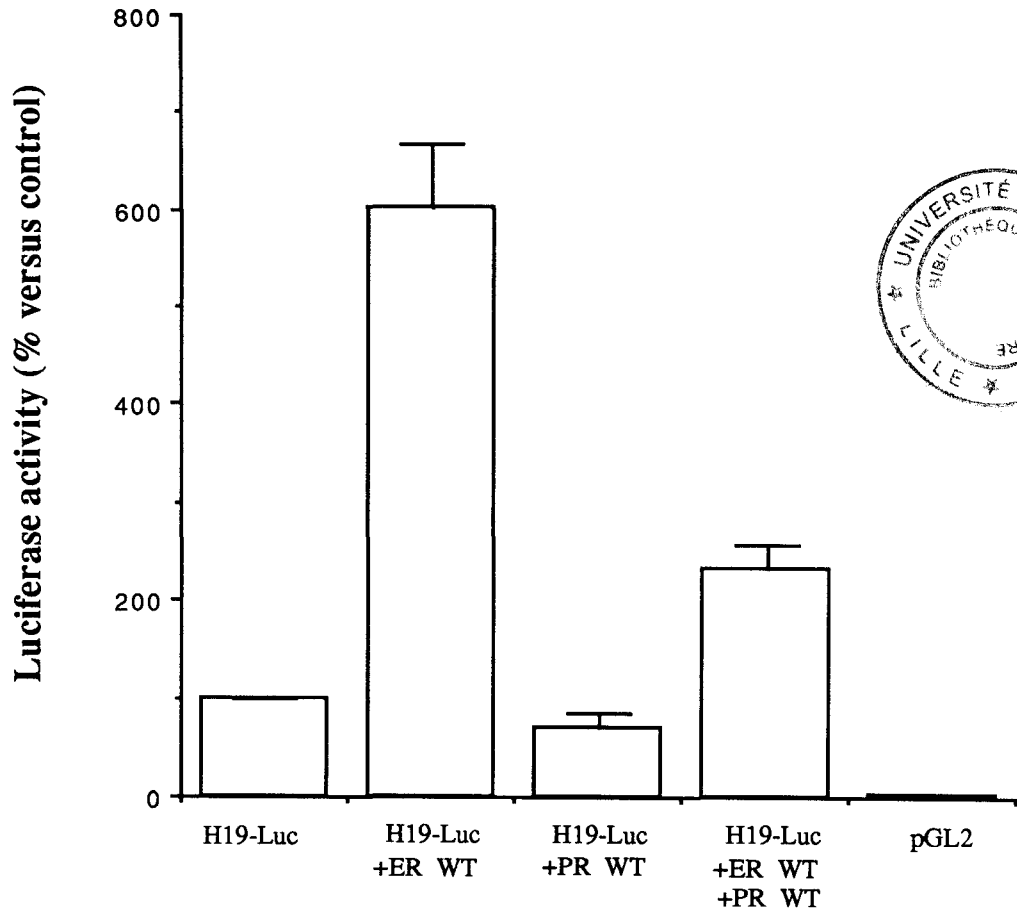


**FIG 6**

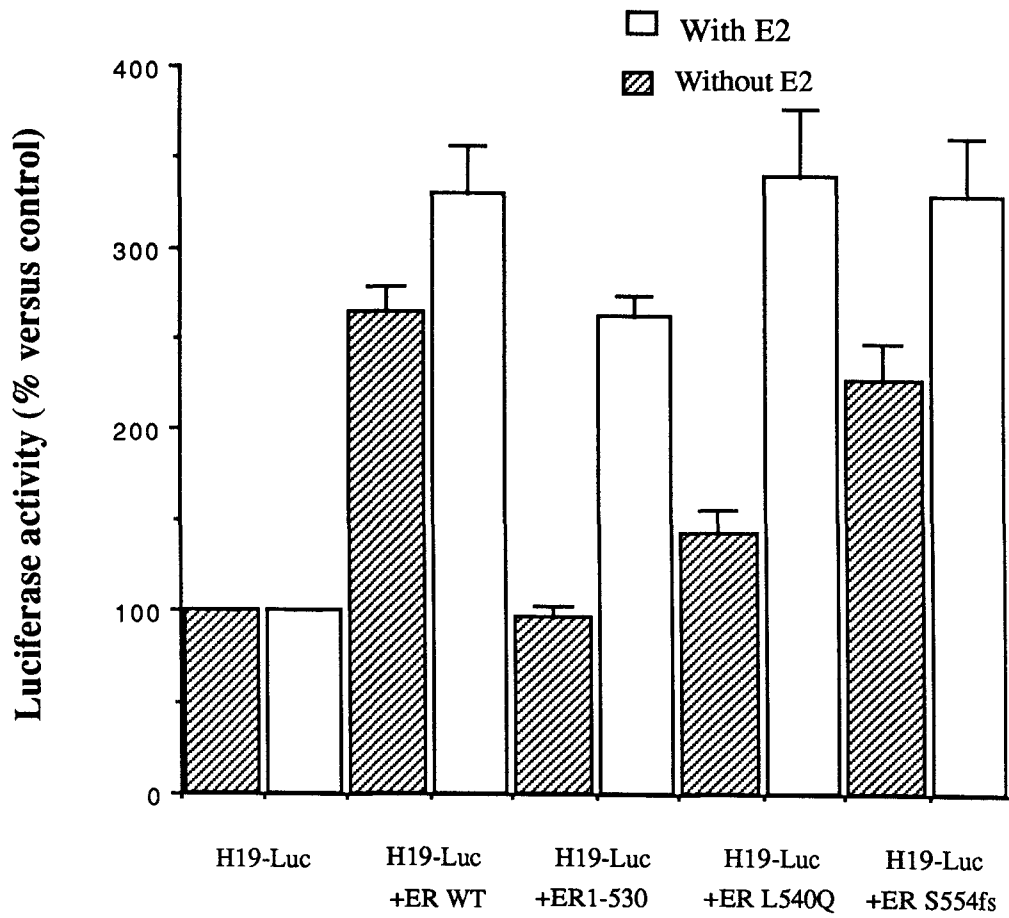




**A**



**B**



**FIG 7**