

NOUVELLE

Régulation épigénétique de la pluripotence chez l'embryon de souris

Jérôme Collignon, Aitana Perea-Gomez



Département de Biologie du développement,
Institut Jacques Monod, CNRS, Université Paris 7,
Université Paris 6, 2, place Jussieu, Tour 43,
75251 Paris Cedex 05 France.
collignon@ijm.jussieu.fr



> Une étape importante pour la compréhension du rôle des modifications épigénétiques de la chromatine dans la régulation de la pluripotence des cellules de l'embryon de mammifère a été franchie avec une étude publiée récemment dans le journal *Nature* par l'équipe de M. Zernicka-Goetz [1]. Les bases de ce travail avaient été posées en 2005 avec la publication par cette même équipe d'une étude établissant qu'en fonction de l'orientation et de la séquence des clivages qui leur donnent naissance, les blastomères composant l'embryon de souris au stade 4 n'ont pas les mêmes capacités développementales, et que les destins de leur descendance peuvent être drastiquement différents [2].

Le premier plan de clivage du zygote, environ vingt-quatre heures après la fécondation, passe par son axe animal-végétal (AV), marqué au pôle animal par la présence du second globule polaire. Ce type de clivage est dit méridional (M). Le clivage de chacun des deux blastomères résultant peut être soit méridional, soit équatorial (E), c'est-à-dire perpendiculaire à l'axe AV (Figure 1A). Ces deux blastomères ne se divisent pas en même temps et l'embryon passe donc par un stade intermédiaire où il ne compte que trois blastomères.

Au stade 4, trois morphologies embryonnaires sont distinguées, que l'on peut décrire comme tétraédrique, plane et en étoile (Figure 1A). Des études de lignage, après marquage d'une cellule au stade 2 blastomères, ont permis de

comprendre leur origine [3]. La majorité (81 %) des embryons au stade 4 ont une morphologie tétraédrique qui résulte d'une séquence de clivage ME ou EM. Les embryons dont la morphologie est en étoile (11 %) sont le résultat d'une séquence MM, les embryons dont la morphologie est plane (8 %), d'une séquence EE. Il avait été noté précédemment que pour une proportion importante des embryons, la descendance du premier blastomère à s'être divisé contribue de façon majoritaire à la région embryonnaire du blastocyste, comprenant la masse cellulaire interne (MCI, dont les descendants formeront les tissus fœtaux) et le trophoctoderme polaire (tissu extra-embryonnaire). Dans ce cas, la descendance du deuxième blastomère contribue préférentiellement à la région ab-embryonnaire, comprenant la partie de la MCI bordant la cavité du blastocèle et le trophoctoderme mural. Cependant, ce type de répartition dépend très étroitement de la façon dont les deux premiers blastomères se sont divisés et ne représente pas le schéma général pour tous les embryons. De façon remarquable, il a été montré que c'est seulement dans le cas d'une séquence de clivage ME qu'il est possible de prédire la future polarité du blastocyste (Figure 1B). Dans le cas d'un clivage EM, la descendance du premier blastomère a des chances égales de contribuer soit à la région embryonnaire, soit à la région ab-embryonnaire du blastocyste. Pour les séquences de clivage MM et EE,

l'allocation des cellules descendant des deux premiers blastomères n'est pas restreinte à l'une ou l'autre de ces régions.

Les embryons ME sont donc les seuls permettant de prédire le destin de chacun des quatre blastomères les constituant. Des expériences d'agrégation ont permis de préciser les capacités développementales de chacun de ces blastomères [2]. Le blastomère e2, résultant de la division E et héritant de la majorité du cytoplasme de la région végétative, contribue principalement au trophoctoderme mural, et ne permet que rarement d'obtenir un embryon viable lorsqu'il est agrégé à trois autres cellules d'origine identique (Figure 1C). En revanche, l'agrégation de blastomères m, issus de la division M, permet d'obtenir avec un taux comparable aux contrôles le développement à terme des embryons chimères résultants. Il semble donc que ces blastomères diffèrent dans leur capacité à permettre le développement d'un embryon, ce qui suggère le partage inégal entre eux d'une information ou d'une activité préexistante.

Les marques épigénétiques qui décorent la chromatine ont souvent été proposées comme étant susceptibles de véhiculer une information importante pour la régulation de la pluripotence des cellules embryonnaires. Tirant parti de leur connaissance approfondie des séquences de clivage chez l'embryon de souris, Torres-Padilla et al. se sont intéressés à la distribution au stade 4 de trois modifications de l'histone H3, résultant de la méthylation d'arginines aux

positions 2, 17 ou 26. L'utilisation d'anticorps spécifiques pour chacune de ces modifications a permis leur quantification relative au sein des noyaux d'un même embryon [1]. Il a ainsi été montré que pour une fraction des embryons au stade 4, le taux de méthylation n'est pas le même dans

chaque blastomère. Les contrastes les plus élevés étant obtenus pour la modification H3R26me, c'est en suivant celle-ci que les investigations se sont poursuivies. Torres-Padilla *et al.* ont démontré que ce sont les blastomères des embryons ME qui présentent les variations les plus importantes,

et que le niveau de méthylation détecté dans chaque noyau est étroitement corrélé à l'identité du blastomère considéré. Les blastomères e2 présentent ainsi un taux de méthylation qui peut être inférieur de moitié à celui du blastomère m présentant le taux le plus élevé dans le même embryon (Figure 1D). De façon intéressante, les embryons EM, dont la polarité ne peut être prédite, présentent dans les noyaux de leurs blastomères des niveaux de méthylation beaucoup plus proches les uns des autres. Au vu de ces résultats, un lien causal a été recherché entre l'activité de méthylation de l'histone H3 dans un blastomère et le devenir du blastomère en question.

Les arginines 2, 17 et 26 de l'histone H3 sont les cibles d'une même méthyl-transférase, appelée CARM1. Les auteurs ont montré que chez l'embryon, CARM1 est exprimée à partir d'un messager maternel, et qu'il y a une corrélation entre la répartition de la protéine et l'intensité du marquage H3R26me dans les noyaux d'un embryon de stade 4. Afin de tester son impact sur le destin et la potentialité des cellules, l'ARN de CARM1, ainsi que celui du traceur fluorescent DsRed, ont été co-injectés dans un blastomère unique au stade 2. L'analyse des embryons injectés au stade blastocyste a permis de montrer que la descendance des blastomères surexprimant CARM1 contribue de façon prédominante à la MCI (Figure 1E). L'utilisation d'une forme mutée de CARM1 a confirmé ce résultat en démontrant que c'est bien l'activité méthyl-transférase qui est requise. L'accroissement de l'activité CARM1 s'accompagne bien sûr d'une augmentation du marquage H3R26me, mais également d'une expression plus forte des facteurs Nanog et Sox2 qui sont étroitement associés au maintien et à la pluripotentia-

lité des cellules de la MCI. Cette étude est la première à établir ainsi un lien direct entre la présence d'une marque épigénétique et la détermination d'un destin cellulaire chez un embryon de mammifère. Elle ne permet pas d'expliquer ce qui se passe chez les embryons qui ne subissent pas une séquence de clivage ME, et dont la plupart se développeront pourtant normalement. Cependant, elle démontre une

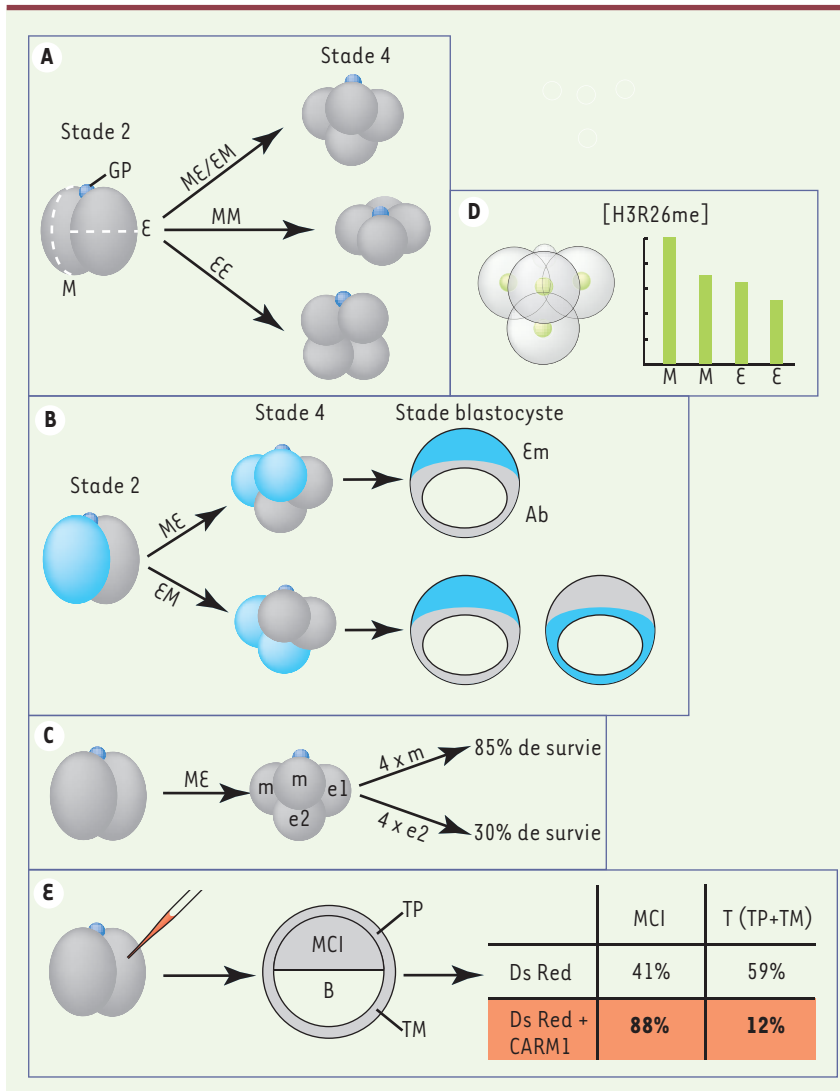


Figure 1. Modifications épigénétiques de la chromatine dans la régulation de la pluripotence des cellules de l'embryon de souris. **A.** L'origine des trois types de morphologie de l'embryon de souris au stade 4, de haut en bas, tétraédrique, en étoile, plane. M, clivage méridional ; E, clivage équatorial ; gp, deuxième globule polaire. **B.** Relation entre la séquence de clivage des embryons tétraédriques et la contribution des descendants des deux premiers blastomères aux régions embryonnaire (Em) et ab-embryonnaire (Ab) du blastocyste. **C.** Capacité des chimères d'agrégation des blastomères m ou e2 à se développer. **D.** Distribution et quantification relative de la marque H3R26me dans un embryon ME. **E.** L'injection de la méthyl-transférase CARM1 dans un blastomère au stade 2 a pour effet d'augmenter la contribution de ses descendants à la masse cellulaire interne au stade blastocyste. B : blastocèle ; MCI : masse cellulaire interne ; TP : trophoctoderme polaire ; TM : trophoctoderme mural.



fois de plus que se focaliser sur un cas particulier permet certaines avancées, et suggère une route possible pour de futures investigations. Rappelons qu'à ce jour près de soixante-dix marques épigénétiques sont connues, et en quête de fonctions. De plus, cette étude met en évidence des différences marquées entre les blastomères d'un embryon qui commence à peine à se développer. Nul doute que ces données contribueront au débat très animé que suscite la possibilité d'une régionalisation précoce de l'embryon de souris [4-7]. ♦

Epigenetic regulation of pluripotency in the early mouse embryo

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient V. Gurchenkov pour la réalisation de la Figure 1 de cet article.

RÉFÉRENCES

1. Torres-Padilla ME, Parfitt DE, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 2007 ; 445 : 214-8.
2. Piotrowska-Nitsche K, Perea-Gomez A, Haraguchi S, Zernicka-Goetz M. Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. *Development* 2005 ; 132 : 479-90.
3. Piotrowska-Nitsche K, Zernicka-Goetz M. Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mech Dev* 2005 ; 122 : 487-500.
4. Zernicka-Goetz M. The first cell-fate decisions in the mouse embryo : destiny is a matter of both chance and choice. *Curr Opin Genet Dev* 2006 ; 16 : 406-12.
5. Hiiragi T, Alarcon VB, Fujimori T, et al. Where do we stand now? Mouse early embryo patterning meeting in Freiburg, Germany (2005). *Int J Dev Biol* 2006 ; 50 : 581-7.
6. Louvet-Vallee S, Vinot S, Maro B. Mitotic spindles and cleavage planes are oriented randomly in the two-cell mouse embryo. *Curr Biol* 2005 ; 15 : 464-9.
7. Kurotaki Y, Hatta K, Nakao K, et al. Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. *Science* 2007 ; 316 : 719-23.

NOUVELLE

Les cellules souches hématopoïétiques Une double origine embryonnaire ?

Isabelle Godin, Ana Cumano



► L'origine des cellules souches hématopoïétiques (CSH) a longtemps été, et reste encore, sujette à controverse. Les CSH de la moelle osseuse adulte sont postulées dériver d'une réserve établie pendant le développement embryonnaire. Initialement, la production du contingent de CSH a été attribuée au sac vitellin (SV), parce que les premières cellules hématopoïétiques, principalement des érythrocytes, apparaissent dans cette annexe embryonnaire.

Cependant, les expériences de chimères entre des corps embryonnaires de caille et des SV de poulet, effectuées avant l'établissement de la circulation entre l'embryon et le SV, ont clairement démontré que les cellules hématopoïétiques du SV ne contribuaient pas à l'hématopoïèse adulte, qui est fondée par des CSH d'origine intra-embryonnaire. Plus tard, deux groupes ont montré que, chez la souris également, la génération des cellules hématopoïétiques s'opérait indépendamment dans deux sites (Figure 1).

La première a lieu dans le SV qui produit des cellules érythro-myéloïdes, la seconde prend place plus tard dans le compartiment intra-embryonnaire où la région appelée splanchnopleure para-aortique (P-Sp), puis aortogonades-mésonephros (AGM) produit des CSH multipotentes et capables de reconstituer à long terme le système hématopoïétique d'animaux irradiés. Ces observations, aujourd'hui confirmées par plusieurs laboratoires, ont été à la base du concept, généralement accepté, d'une origine des CSH dans le corps embryonnaire, précisément dans la P-Sp/AGM. La quantification des cellules multipotentes a montré qu'elles apparaissaient dans cette région à partir de 8,5 jours de gestation (jdg) et qu'elles atteignaient un nombre maximal de 100-150 par embryon, vers 10,5 jdg (35-37 somites), avant de diminuer rapidement en nombre, puis de disparaître vers 12 jdg (pour revue, voir [1]).

Ces expériences ont démontré que, chez la souris, le compartiment intra-

I. Godin : Inserm U790,
Institut Gustave Roussy-PR1,
39, rue Camille Desmoulins,
94805 Villejuif, France.
Université de Paris XI, Orsay, France.
A. Cumano : Unité de Développement
des Lymphocytes, Département
d'immunologie, Institut Pasteur,
25, rue du Docteur Roux,
75724 Paris Cedex 15, France et Inserm U668.
cumano@pasteur.fr

embryonnaire produisait des CSH. Cependant, la possibilité de la génération tardive d'une fraction de CSH au niveau du SV ne peut pas être évaluée après 8 jdg (4-5 somites) puisque, à partir de ce stade, la circulation des cellules sanguines dans le réseau vasculaire entraîne un mélange des cellules provenant du SV et de celles provenant du compartiment intra-embryonnaire. L'approche de ce problème en utilisant des souris *knock in* n'est pas possible puisque les facteurs exprimés et/ou impliqués dans la génération des précurseurs hématopoïétiques sont identiques dans les deux sites. Une contribution du SV à l'hématopoïèse adulte demande pourtant à être évaluée puisque des expériences de greffe chez l'embryon d'amphibiens [2] et de souris [3] ont montré une capacité des cellules du SV à engendrer des lymphocytes.

Contribution du sac vitellin à l'hématopoïèse adulte : les observations

Pour aborder cette question, le groupe de Nishikawa a construit une souris inducible pour l'expression de la recombinaison CRE sous le contrôle du promoteur de *Runx1* [4]. *Runx1* (AML1 ou *cbfa2*) est un facteur de transcription exprimé principalement dans le système hématopoïétique (Figure 2), d'abord au niveau du SV où il marque à la fois les cellules endothéliales et hématopoïétiques. Plus tard, il est exprimé dans le compartiment intra-embryonnaire, par les vaisseaux et dans les sites impliqués dans la génération des CSH, au niveau de la partie ventrale de l'aorte, mais aussi des artères ombilicale et omphalomé-sentérique (pour revue, voir [5]).

L'inactivation de ce gène, létale pour les homozygotes vers 12-13 jdg, entraîne une diminution de l'hématopoïèse du SV et l'absence de CSH [6-8]. Il est donc considéré comme strictement nécessaire à l'émergence de ces cellules.

Pour marquer exclusivement les cellules du SV et suivre leur évolution au cours du développement, les souris *Runx1^{CRE/+}* ont été croisées avec des souris transgéniques portant un gène rapporteur (LacZ ou eYFP) exprimé de façon ubiquitaire, mais sous le contrôle d'un stop transcriptionnel flanqué de sites lox-p. Ainsi, le traitement de la mère par le tamoxifène entraîne une activation temporaire de la recombinaison CRE dans les cellules qui expriment *Runx1*, induisant

la délétion dans ces cellules du stop transcriptionnel et l'expression de la β -galactosidase ou de la eYFP dans ces cellules et leur descendance.

La validité de l'approche repose entièrement sur la durée de l'induction par le tamoxifène, qui doit permettre le marquage des précurseurs du SV, tout en interdisant celui des précurseurs intra-embryonnaires. Ce point est crucial compte tenu du délai restreint entre les deux phases de génération (24 heures), mais aussi de la variabilité importante des stades de développement des embryons au sein d'une même portée (24 heures [9]) aux premiers stades étudiés (7-8 jdg). Pour évaluer ce point, les auteurs ont comparé l'expression de la β -galactosidase obtenue 4, 6 ou 12 heures après l'induction de la recombinaison CRE à celle présente dans des embryons *Runx^{LacZ/+}* [10]. L'efficacité de l'induction est clairement documentée et démontre qu'une induction complète est atteinte 12 heures après l'administration du tamoxifène. Nous ignorons cependant si sa durée d'action excède les douze heures et il paraît concevable qu'une activité résiduelle puisse persister au-delà. Ce point, pourtant essentiel, ne peut malheureusement pas être estimé puisque 12 heures après l'induction, les cellules issues du sac vitellin circulent dans le réseau vasculaire (extra- et intra-embryonnaire), ce qui rend impossible l'identification éventuelle de cellules intra-embryonnaires marquées. Si l'activité du tamoxifène est soutenue au-delà de 12 heures, l'induction vers 7,5 jdg marquera des cellules du SV, mais également une fraction de cellules qui exprimeront *Runx1* à des stades plus tardifs. Dans ces conditions, la stricte corrélation entre l'expression de la β -galactosidase à des stades tardifs et l'expression temporelle de *Runx1* reste spéculative.

Lorsque l'induction est effectuée entre 6,5 et 8 jdg, elle entraîne un

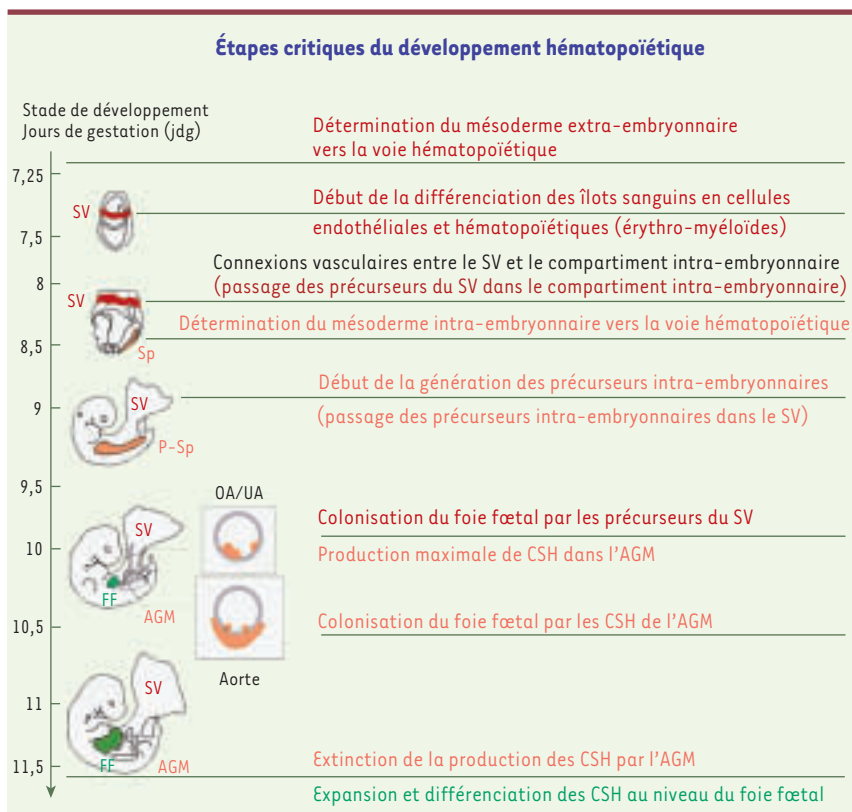


Figure 1. Les grandes étapes du développement hématopoïétique. Synthèse sur les phases initiales du développement hématopoïétique, qui se déroulent dans le compartiment extra-embryonnaire (en rouge) et intra-embryonnaire (en jaune). En encart figurent les sites impliqués dans la génération des CSH, c'est-à-dire l'aorte et sa partie ventrale de façon certaine, et peut-être aussi les artères omphalomé-sentérique (OA) et ombilicale (UA). AGM : aorte-gonades-mésonephros ; FF : foie fœtal ; P-Sp : splanchnopleure para-aortique ; Sp : splanchnopleure ; SV : sac vitellin

marquage β -galactosidase restreint aux vaisseaux et cellules hématopoïétiques du SV. Lorsque les embryons sont analysés plus tardivement après induction, des cellules β -galactosidase positives apparaissent dans les vaisseaux ombilicaux et dans l'aorte, puis quelques heures plus tard au niveau du foie. Lorsque le tamoxifène est administré après 8 jdg, l'activité β -galactosidase est détectée, entre autres, dans des cellules de la P-Sp/AGM, avec un marquage de l'ensemble de l'endothélium, mais aussi du mésenchyme situé au-dessous et autour de l'aorte.

L'expression de la β -galactosidase α , par la suite, été analysée dans le foie fœtal à des stades plus tardifs de la gestation et dans les CSH de la moelle osseuse d'individus adultes (Figure 2).

Analyse critique des données expérimentales

Lors d'une induction de la CRE à 7,5 jdg, aucun marquage β -galactosidase n'est observé dans la P-Sp/AGM 12 heures plus tard, alors que 5 % des précurseurs cKit⁺/CD34⁺ et 20 % des cellules érythro-myéloïdes du foie fœtal expriment la β -galactosidase à 12 jdg. Plus tard, environ 5 % des cellules du thymus sont également clairement marquées. Chez l'adulte, entre 1 et 10 % des CSH expriment la β -galactosidase, indiquant que, si l'action du tamoxifène n'excède pas les 12 heures qui suivent l'administration, un pourcentage restreint, mais significatif, des CSH adultes proviennent du sac vitellin. Ce résultat, extrêmement intéressant, peut avoir différentes interprétations. Celle défendue par les auteurs est qu'une fraction des CSH adultes sont

probablement originaires du sac vitellin. Cependant, une activité résiduelle du tamoxifène (au-delà de 12 heures) pourrait entraîner, plus tardivement, le marquage des premières CSH de la P-Sp/AGM, qui expriment Runx1, et qui seraient alors responsables des 1-10 % de CSH marquées dans la moelle osseuse adulte.

L'induction vers 9,5 jdg entraîne l'expression de β -galactosidase dans les CSH de la moelle osseuse adulte qui atteint les 100 %. Il est intéressant de souligner que cette induction produit un marquage important dans la P-Sp/AGM et quasi inexistant dans le SV. Ce résultat confirme que les CSH intra-embryonnaires constituent la source majeure des cellules souches médullaires adulte. Par ailleurs, le fait qu'une contribution de 100 % soit atteinte chez l'adulte indique

qu'il n'existe probablement pas de génération ultérieure de CSH, ni au cours de l'ontogenèse tardive, ni au cours de la vie adulte.

L'induction de la recombinaison CRE à 10,5 jdg conduit à une expression de LacZ dans 0-10 % des CSH de l'adulte, malgré l'expression de Runx1 par l'ensemble des CSH de l'AGM (Figure 2). Il est possible que les différents organes des embryons plus développés soient moins accessibles au tamoxifène et que les doses injectées soient donc insuffisantes pour provoquer l'induction. Il est aussi possible que Runx1 soit exprimé à des niveaux moins importants dans les CSH aux stades plus tardifs. L'induction de la recombinaison CRE, dont l'expression est contrôlée par le

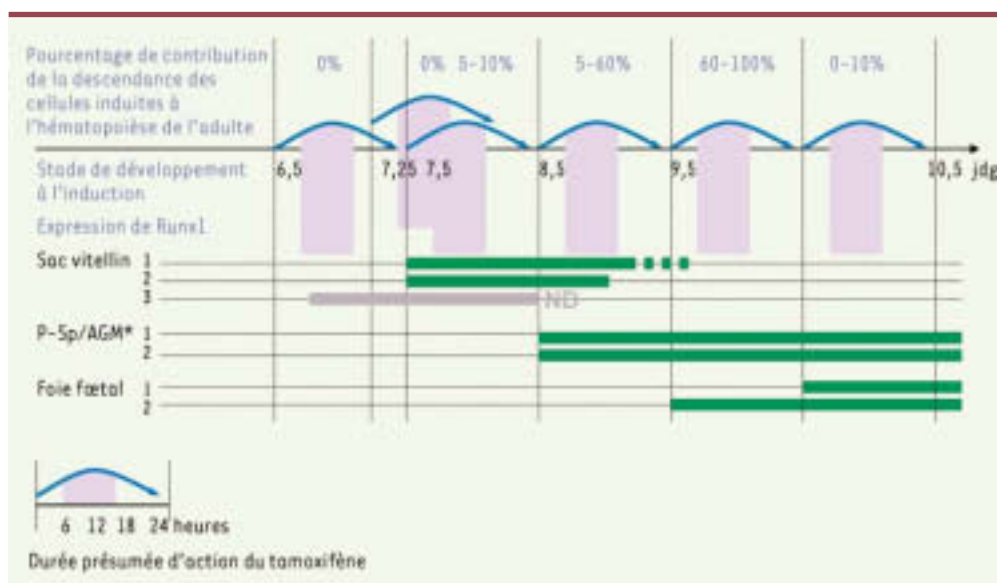


Figure 2. Contribution de la descendance des cellules marquées à l'hématopoïèse adulte. Panneau supérieur : pourcentage de contribution à l'hématopoïèse de l'adulte de la descendance des cellules marquées, en fonction du stade de gestation au moment du traitement par le tamoxifène (panneau médian), marqué par le début de la flèche bleue (qui indique la durée possible d'action du tamoxifène). Le panneau inférieur résume les données connues de l'expression de Runx1 au cours du développement hématopoïétique, déterminées par la détection, soit de l'activité β -galactosidase chez des embryons *Runx1^{LacZ/+}* (1 [13, 14] ; 2 [4]), soit des transcrits de Runx1 par hybridation *in situ* sur des embryons sauvages (3 [8]). *Alors que la localisation des précurseurs hématopoïétiques dans le site hématogène est connue après 10 jdg (dans l'AGM), nous n'avons pas d'information pour les stades antérieurs (dans la P-Sp). L'expression de Runx1 est donc montrée de façon globale, dans les régions montrées *in vivo* et *in vitro* comme contenant des CSH, et cela sans tenir compte du marquage des cellules circulantes provenant du SV.

promoteur de Runx1, serait alors moins efficace dans l'induction de la recombinaison des sites lox-p.

L'ensemble des expériences décrites dans cette publication a été réalisé sur des embryons hétérozygotes pour l'expression de Runx1, puisque l'insertion de la cassette MER-CRE-MER dans le locus Runx-1 entraîne l'inactivation de la séquence codante. Or, plusieurs groupes ont montré qu'une réduction de dosage de Runx1 entraînait des anomalies du développement hématopoïétique, avec une accélération de 12 à 24 heures de l'apparition des CFU-S dans le sac vitellin et des CSH dans la P-Sp/AGM [11, 12]. Cet effet renforce les interrogations déjà mentionnées sur la durée d'action du tamoxifène, puisque l'effet « accélérateur du développement hématopoïétique » résultant de l'haplo-insuffisance pourrait permettre le ciblage de précurseurs intra-embryonnaires lors d'inductions effectuées à 7,5 jdg. Il conviendrait donc de vérifier les résultats présentés dans cette publication en appliquant une stratégie similaire avec un gène qui n'affecte pas la cinétique d'apparition des précurseurs hématopoïétiques.

L'hypothèse, envisagée par les auteurs, selon laquelle les cellules responsables de la contribution adulte pourraient provenir du SV et domicilier au niveau de la P-Sp/AGM ne reçoit pas de démonstration effective, puisque les cellules de l'AGM ne sont pas identifiables clairement par marquage de l'activité

β -galactosidase lors d'une induction effectuée à 7,5 jdg (comparer le marquage de l'aorte « induite » de la figure 4C de [4], avec le marquage endogène de la figure 1 de [4]). Par ailleurs, il a été précédemment montré que le territoire présomptif de la P-Sp/AGM, explanté avant circulation et maintenu en culture organotypique, pouvait engendrer des CSH, démontrant l'origine indépendante des précurseurs des deux sites. En considérant qu'une migration interstitielle des cellules du SV ait pu « contaminer » le territoire présomptif de la P-Sp/AGM, avant circulation lors de ces expériences, l'induction de Runx1 effectuée à 7,25-7,5 jdg devrait alors entraîner le marquage des cellules de ce territoire, ce qui n'est pas observé (figure supplémentaire 5 de [4]).

L'avancée la plus marquante de cette publication reste la démonstration, jusqu'ici inexistante, que toutes les cellules hématopoïétiques de l'adulte dérivent d'une réserve établie pendant l'ontogenèse, qu'il ne se produit pas de nouvelle génération de CSH après le jour 11 de gestation, et que les premières cellules hématopoïétiques, engendrées dans le sac vitellin à 7,25 jdg ne contribuent pas à l'hématopoïèse adulte. ♦

Hematopoietic stem cells : where do they come from at last ?

RÉFÉRENCES

- Godin I, Cumano A. The hare and the tortoise : an embryonic haematopoietic race. *Nat Rev Immunol* 2002 ; 2 : 593-604.

- Bechtold TE, Smith PB, Turpen JB. Differential stem cell contributions to thymocyte succession during development of *Xenopus laevis*. *J Immunol* 1992 ; 148 : 2975-82.
- Weissman I, Papaioannou V, Gardner R. Fetal hematopoietic origins of the adult hemolymphoid system. In : Clarkson B, Mark P, Till J, eds. *Differentiation of normal and neoplastic cells*, vol. 5. New York : Cold Spring Harbour Laboratory, 1978 : 33-47.
- Samokhvalov IM, Samokhvalova NI, Nishikawa S. Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* 2007 ; 446 : 1056-61.
- Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* 2007 ; 25 : 745-85.
- Wang Q, Stacy T, Binder M, et al. Disruption of the *Cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 3444-9.
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, et al. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996 ; 84 : 321-30.
- Lacaud G, Gore L, Kennedy M, et al. Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro. *Blood* 2002 ; 100 : 458-66.
- Downs KM, Davies T. Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* 1993 ; 118 : 1255-66.
- Samokhvalov IM, Thomson AM, Lalancette C, et al. Multifunctional reversible knockout/reporter system enabling fully functional reconstitution of the AML1/Runx1 locus and rescue of hematopoiesis. *Genesis* 2006 ; 44 : 115-21.
- Cai Z, de Bruijn M, Ma X, et al. Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity* 2000 ; 13 : 423-31.
- Lacaud G, Kouskoff V, Trumble A, et al. Haploinsufficiency of Runx1 results in the acceleration of mesodermal development and hemangioblast specification upon *in vitro* differentiation of ES cells. *Blood* 2004 ; 103 : 886-9.
- North T, Gu TL, Stacy T, et al. *Cbfa2* is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development* 1999 ; 126 : 2563-75.
- North TE, de Bruijn MF, Stacy T, et al. Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity* 2002 ; 16 : 661-72.



Tarifs d'abonnement M/S - 2007

Abonnez-vous

à Médecine/Sciences

> Depuis 20 ans, grâce à m/s, vous vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement
page 678 dans ce numéro de m/s



Un héritage inégal à la base des fonctions effectrices ou mémoire des descendants des lymphocytes T

Nathalie Auphan-Anezin

Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML),
Aix-Marseille Université, Faculté des Sciences de Luminy,
Inserm U631, CNRS UMR6102, Campus de Luminy, Case 906,
13288 Marseille Cedex 09, France.
auphan@ciml.univ-mrs.fr



► L'interaction des lymphocytes T naïfs avec des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), communément les cellules dendritiques, dans les organes lymphoïdes secondaires, induit leur activation. La microscopie confocale a permis de mettre en évidence la ségrégation des molécules d'activation à l'interface entre le lymphocyte T et la CPA, une structure appelée « synapse immunologique » [1-3] (Figure 1).

Par ailleurs, depuis 2002, plusieurs groupes ont utilisé les techniques de microscopie multiphotonique afin de visualiser, à l'intérieur d'un ganglion lymphatique intact, les déplacements des lymphocytes T et leur interaction avec les CPA en l'absence ou en présence de l'antigène (Ag) [4]. Les premières heures (0-6h) qui suivent l'entrée des lymphocytes dans un ganglion lymphatique sont caractérisées par des interactions de courte durée avec les CPA, qui induisent l'expression de marqueurs d'activation. La seconde phase (6-32h) implique une interaction de longue durée (> 1h) avec une CPA présentant l'Ag et l'initiation de la sécrétion de cytokines, en l'absence de division cellulaire. Dans la troisième phase, les lymphocytes T se détachent des CPA, prolifèrent et retrouvent une grande mobilité (Figure 2).

L'activation des lymphocytes T induit un programme développemental incluant à la fois une phase d'expansion clonale et la différenciation des cellules T naïves en cellules T effectrices ou mémoires. La généalogie des cellules mémoires est, encore à ce jour, sujet de controverses et 3 modèles sont proposés [5] :

- le premier propose une différenciation divergente des cellules effectrices et mémoires, qui serait influencée par la durée de la stimulation antigénique initiale [6] et les cytokines environnantes, notamment de type inflammatoire ;
 - le second est une différenciation linéaire des cellules T d'abord en cellules effectrices, puis de façon ultime en cellules mémoires ;
 - le troisième est une variation du modèle précédent, qui intègre en plus une relation inversement corrélée entre la durée de la stimulation antigénique et la capacité des cellules T à se différencier en cellules mémoires.
- Jusqu'à présent, aucune étude n'avait fait le lien entre les événements précoces qui surviennent au niveau de la synapse

immunologique et les événements tardifs qui régissent, après la phase d'expansion clonale, la différenciation en cellules T effectrices ou mémoires. Cependant, l'observation que les lymphocytes T restent en contact pendant plusieurs heures avec la CPA suggérerait que cette interaction englobe la phase de mitose. Dans un numéro récent de *Science* [7], l'équipe de Steven Reiner propose que les cellules T effectrices et mémoires soient simultanément générées lors de la première mitose qui suit la reconnaissance de l'Ag selon un mécanisme de division asymétrique. Des lymphocytes T exprimant un TCR (T cell receptor) spécifique d'un Ag de *Listeria monocytogenes* ont été marqués avec un composant fluorescent et injectés à une souris infectée. Trente-deux heures

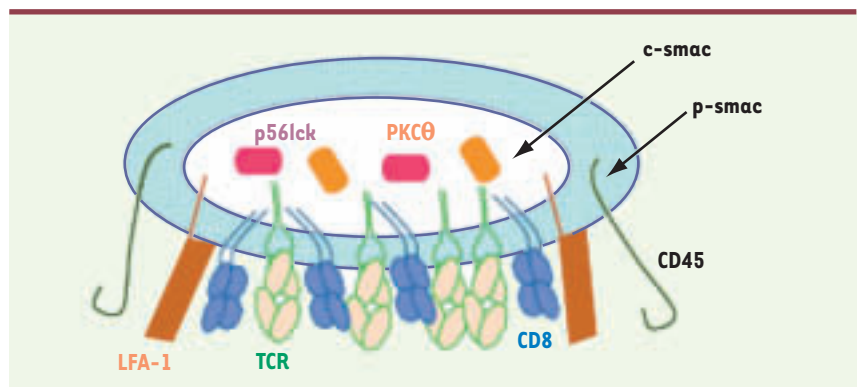


Figure 1. Synapse immunologique. La zone centrale de la synapse (c-smac) concentre notamment le récepteur à l'antigène (TCR) et les molécules CD3 associées, les co-récepteurs CD4 ou CD8, les protéines kinase PKCθ et p56lck ; à la périphérie de cette zone centrale, se trouvent les molécules d'adhérence LFA-1 et la taline ; enfin, une zone distale (p-smac) contient des molécules de grande taille telle la phosphatase CD45. Très tôt dans la formation de la synapse, il y a une polymérisation localisée du cytosquelette d'actine et le centre organisateur des microtubules (MTOC) se réoriente vers la synapse (non montré).

après leur transfert, les lymphocytes T qui, à ce stade, ne se sont pas encore divisés mais ont subi une augmentation de leur volume (phénotype de blastes) en réponse à leur activation, sont analysés en microscopie confocale. Dans la plupart de ces cellules T activées pré-mitotiques, le MTOC (*microtubule-organizing center*) co-localise avec les molécules LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen*), CD8 et CD3 agrégées à un pôle du lymphocyte T, qui constitue les vestiges de la synapse immunologique. Au pôle opposé, on observe une concentration de la protéine kinase C ζ (PKC ζ) – un composant impliqué dans la polarité cellulaire. Cette répartition moléculaire est maintenue dans les cellules T en cours de mitose. Ces résultats suggèrent que la signalisation émanant de la synapse immunologique induit une mitose asymétrique qui aboutit à une partition inégale des molécules dans les 2 cellules filles.

En suivant la prolifération de ces cellules T grâce au composé fluorescent qui se dilue à chaque division cellulaire, Chang *et al.* ont observé que les cellules T qui ont fait une seule division, 48h après leur transfert, peuvent être séparées en 2 sous-populations exprimant le co-récepteur CD8 à un fort (CD8^{hi}) ou un faible (CD8^{lo}) niveau [7]. Les auteurs suggèrent que ces 2 sous-populations proviennent des cellules filles générées respectivement au pôle proximal et au pôle distal de la synapse immunologique initiale. Après purification de ces 2 populations, les auteurs ont pu établir que la population CD8^{hi} exprime un phénotype caractéristique de cellule T effectrice, tandis que la population CD8^{lo} a plutôt un phénotype de cellule T mémoire. L'injection de l'une ou l'autre de ces populations cellulaires dans une souris hôte immédiatement infectée par *Listeria monocytogenes* permet de contrôler l'infection. En revanche, si l'infection de

l'hôte survient 30 jours après le transfert des lymphocytes T, la population CD8^{hi} est plus efficace que la population CD8^{lo} pour contrôler cette infection tardive. Les auteurs suggèrent que les descendants d'un lymphocyte activé T CD8 héritent d'un matériel moléculaire disparate : la cellule fille recueillant les molécules concentrées au pôle proximal de la synapse immunologique (TCR, CD8 et LFA-1) se différencie en cellule T effectrice, tandis que celle qui reçoit les molécules ségréguées au pôle distal (PKC ζ) devient plutôt une cellule T mémoire.

L'observation majeure rapportée par Chang *et al.* est donc la description de la division asymétrique des lymphocytes T. À ce stade, il n'y a pas encore de preuve directe que les 2 populations CD8^{hi} et CD8^{lo} caractérisées 48h après l'infection dérivent réellement de la même cellule T qui subissait une mitose asymétrique. En effet, à ce jour, les techniques disponibles ne permettent

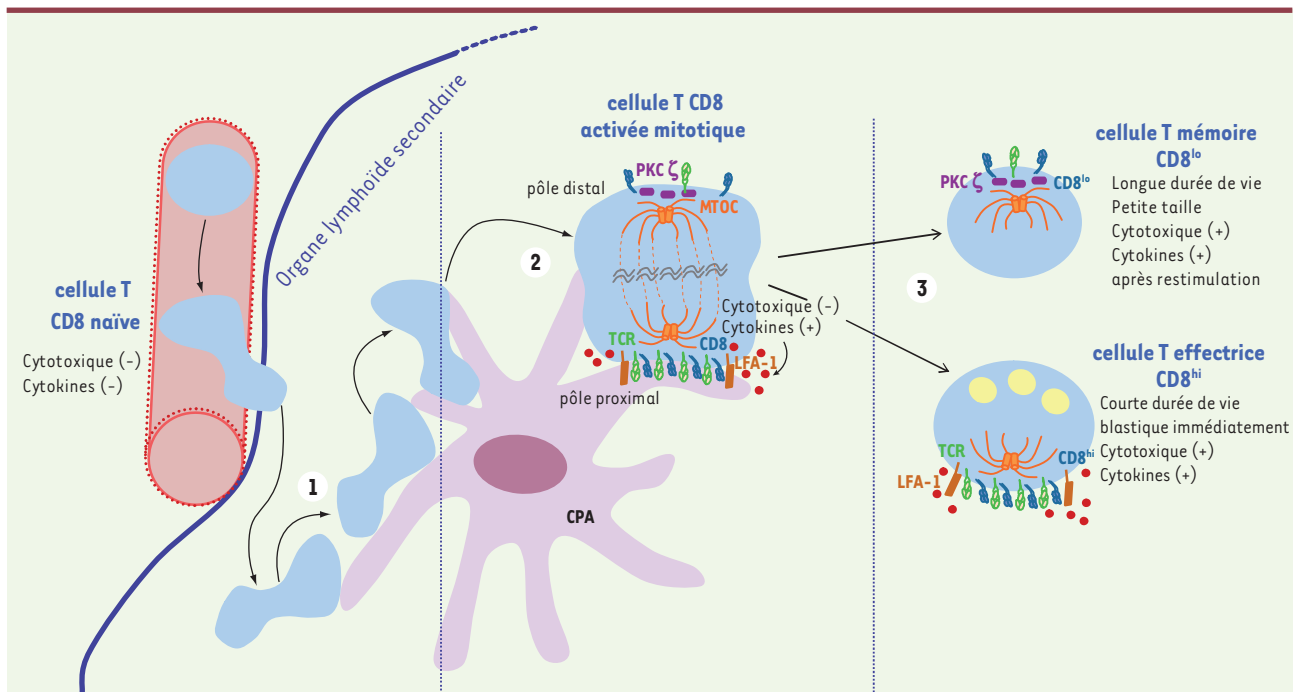


Figure 2. Cinétique d'activation et de différenciation des lymphocytes T CD8 mettant en jeu une division asymétrique. Les lymphocytes T migrent continuellement du sang vers les ganglions lymphatiques. **Phase 1** : 0-6 h – Grande mobilité des lymphocytes T ; interactions de courte durée avec la CPA. **Phase 2** : 6-32 h – Interaction stable (> 1 h) du lymphocyte T avec la CPA. La formation de la synapse immunologique induit l'activation de la cellule T (expression de marqueurs d'activation, sécrétion de cytokines) et son entrée en mitose : ségrégation asymétrique des molécules d'activation aux 2 pôles de la cellule. **Phase 3** : 32-72 h – Le lymphocyte T redevient mobile. La division cellulaire engendre 2 cellules filles différentes : une cellule CD8^{hi} exprimant un phénotype caractéristique de cellule T effectrice (contenant des granules cytotoxiques, représentés en jaune), et une cellule CD8^{lo} ayant plutôt un phénotype de cellule T mémoire.



pas d'isoler les cellules filles montrant à 32h une répartition inégale de PKC ζ et du TCR et de suivre le devenir de ces cellules individuelles dans le temps.

Les 2 populations de cellules T CD8^{hi} et CD8^{lo} diffèrent par leur taille et leur granulosité, des modifications morphologiques observées lors de la différenciation des cellules T naïves en cellules T activées blastiques et qui s'accompagnent de l'augmentation de certains récepteurs à la surface. Dans le modèle utilisé par les auteurs, on ne peut exclure une réponse non synchronisée des cellules T transférées : les cellules T ayant rencontré l'Ag précocement seraient alors activées et blastiques ; tandis que les cellules T ayant été stimulées à un temps plus tardif seraient en cours d'activation/différenciation et n'auraient pas encore subi le changement métabolique et morphologique conduisant à la blastogénèse.

Selon cette hypothèse, la différence d'expression du co-récepteur CD8 reflèterait plutôt 2 stades distincts du processus de différenciation des lymphocytes T. Malgré cette restriction, les données de Chang *et al.* montrent clairement que ces 2 populations CD8^{hi} et CD8^{lo} génèrent *in vivo* respectivement, des cellules T effectrices et mémoires.

La génération de divers types cellulaires via un processus de division asymétrique qui sépare inégalement les déterminants cellulaires est un mécanisme conservé dans l'évolution, depuis *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* [8, 9] jusqu'aux vertébrés. Elle pourrait, entre autres, être à l'origine de la grande plasticité des réponses des cellules du système immunitaire. ♦

Asymmetric heritage in the daughter cells determines effector or memory cell fate in T lymphocytes

RÉFÉRENCES

1. Bismuth G, Trautmann A. La synapse immunologique : des modèles aux réalités. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 721-6.
2. Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, *et al.* Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998 ; 395 : 82-6.
3. Saito T, Yokosuka T. Immunological synapse and microclusters : the site for recognition and activation of T cells. *Curr Opin Immunol* 2006 ; 18 : 305-13.
4. Henrickson SE, von Andrian UH. Single-cell dynamics of T-cell priming. *Curr Opin Immunol* 2007 ; 19 : 249-58.
5. Kalia V, Sarkar S, Gourley TS, *et al.* Differentiation of memory B and T cells. *Curr Opin Immunol* 2006 ; 18 : 255-64.
6. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets : function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004 ; 22 : 745-63.
7. Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, *et al.* Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 2007 ; 315 : 1687-91.
8. Betschinger J, Knoblich JA. Dare to be different : asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr Biol* 2004 ; 14 : R674-85.
9. Jagut M, Huyhn JR. Régulation des cellules souches de la lignée germinale : la niche s'agrandit chez la drosophile. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 611-8.

NOUVELLE

L'enzyme de la glycolyse GAPDH joue un double rôle dans la neurotransmission GABAergique et l'épilepsie humaine

Jacques Laschet, René Pumain

Laboratoire de Neurobiologie
et Pharmacologie Moléculaire, Inserm U573,
Centre Paul Broca,
2ter rue d'Alésia, F75014 Paris, France.
jacques.laschet@broca.inserm.fr

► De nombreux systèmes de neurotransmission sont modulés par des phosphorylations de récepteurs synaptiques dans le système nerveux central (SNC) des vertébrés. Il a été en particulier établi que les récepteurs ionotropes au glutamate et au GABA peuvent être phosphorylés sur les boucles intracellulaires de plusieurs des sous-unités qui les composent par des kinases comme la PKA, PKC, PKG, CAMKII, et PTK. Ces mécanismes de phosphorylations sont impliqués dans la stabilité des récepteurs à la membrane plasmique et peuvent jouer un rôle essentiel dans la désensibilisation, l'agrégation, l'internalisation, le recyclage ou la dégradation de ces entités protéiques (pour revue, voir [1]). En ce qui concerne le récepteur de type A au GABA (GABA_AR),

qui est composé de cinq sous-unités dont les plus fréquentes sont les α , β , et γ , ces kinases classiques phosphorylent essentiellement les sous-unités β ou γ du GABA_AR, mais pas les sous-unités α . Un mécanisme différent de phosphorylation a été décrit pour ce récepteur, mécanisme qualifié d'endogène car ne nécessitant l'addition ni de kinase ni d'activateurs de kinase [2, 3]. La kinase endogène doit donc être étroitement liée au récepteur au niveau de la membrane neuronale. Ce mécanisme de phosphorylation prévient le *rundown* ou « incapacitation »¹ de la réponse GABAergique

¹ Incapacitation (*rundown*), ce qui traduit une perte fonctionnelle au cours du temps indépendante de l'application de l'agoniste.

des neurones hippocampiques ou corticaux dissociés de façon aiguë [4]. Les caractéristiques de ce mécanisme vont être décrites, ainsi que son altération dans les structures nerveuses à l'origine des crises d'épilepsie.

Un nouveau mécanisme : la modulation glycolyse-dépendante de l'inhibition

Le premier point essentiel était d'identifier la kinase endogène du GABA_AR. À notre grande surprise, la protéine ciblée après purification du récepteur et essais de phosphorylation ne faisait pas partie des kinases connues, mais correspondait à une enzyme clé de la glycolyse, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) [5]. Un examen attentif de la

littérature a alors révélé que le rôle de kinase de la GAPDH, indépendamment de son rôle de déshydrogénase dans la glycolyse, avait été mis en évidence dans des muscles de lapin. Il avait été montré que la GAPDH utilise l'ATP glycolytique pour s'autophosphoryler et transférer ensuite le radical phosphate sur d'autres protéines du muscle, qui, à l'époque, n'avaient pas été identifiées [5]. Nous avons ensuite montré que la GAPDH est physiquement associée au récepteur et est partiellement co-localisée avec la sous-unité $\alpha 1$ à la membrane plasmique de neurones en culture. Nous avons également montré qu'une synthèse locale d'ATP se produisait dans des membranes lavées

de cortex cérébral en présence de glyceraldéhyde-3P, le substrat glycolytique spécifique de la GAPDH. Ce résultat indique que l'enzyme qui suit la GAPDH dans la chaîne des réactions glycolytiques, la phosphoglycérate kinase, est aussi présente à la membrane neuronale sans être associée directement au récepteur, et qu'elle utilise le produit de la réaction catalysée par la GAPDH pour produire les molécules d'ATP glycolytique, probablement sans diffusion dans le milieu cytosolique. L'ATP est ensuite rétrocédé à la GAPDH qui va s'autophosphoryler, toujours probablement sans diffusion. La phospho-GAPDH phosphoryle ensuite le GABA_AR auquel elle est liée sur la boucle

intracellulaire I2 de sa sous-unité $\alpha 1$. La phosphorylation endogène du GABA_AR est donc un mécanisme dépendant de la glycolyse (Figure 1A).

La phosphorylation endogène a-t-elle un rôle fonctionnel ? Nous avons montré, sur des neurones pyramidaux isolés du cortex de rat, que toute manipulation favorisant la phosphorylation endogène diminue l'incapacitation des courants GABA_A enregistrés en *patch-clamp*, et à l'inverse, que tout ce qui prévient la phosphorylation endogène du GABA_AR la renforce [6]. Ainsi l'ajout de glyceraldéhyde-3P au milieu intracellulaire maintient les réponses GABAergiques au cours du temps, mais un ajout ultérieur d'iodoacétamide, qui inactive la GAPDH, induit une incapacitation de ces réponses aussi importante qu'en l'absence de ce substrat. L'ATP endogène produit à la membrane par la glycolyse est très largement préféré à l'ATP exogène présent dans la solution de la pipette de *patch*. Par ailleurs, il existe une phosphatase membranaire atypique qui déphosphoryle la sous-unité $\alpha 1$ et contrecarre la phosphorylation endogène [7]. L'ajout de certains inhibiteurs de phosphatase au milieu intracellulaire prévient l'incapacitation des réponses GABAergiques en maintenant le récepteur dans son état phosphorylé. Nous proposons que la phosphorylation glycolyse-dépendante maintient les courants GABA_A par « capacitation » du récepteur, et que la phosphatase membranaire atypique, en contrecarrant la phosphorylation endogène, est à l'origine du *rundown* des courants GABAergiques par « incapacitation » du récepteur (Figure 1B).

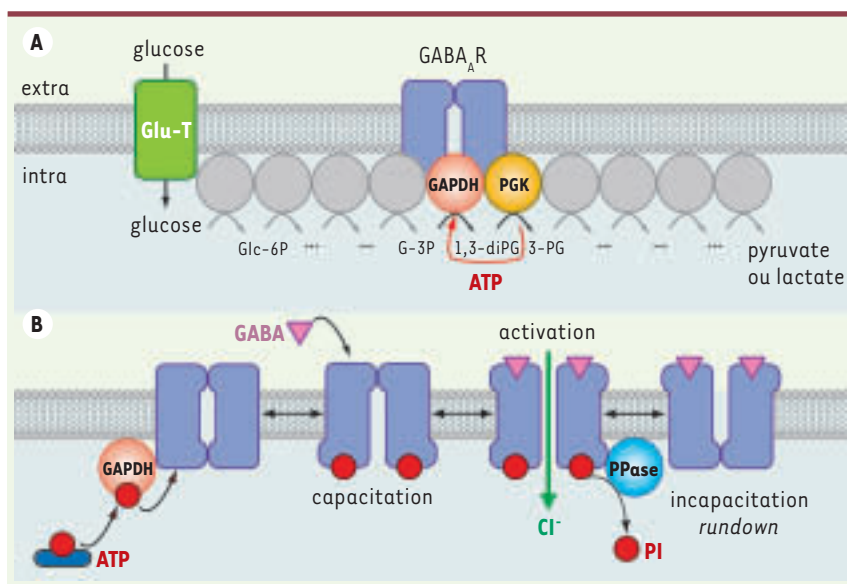


Figure 1. Modulation directe de l'inhibition GABAergique par la glycolyse. Le maintien de l'état fonctionnel du GABA_AR est assuré par une kinase associée au récepteur, que nous avons identifiée comme la glyceraldéhyde-3P déshydrogénase (GAPDH), une enzyme de la glycolyse. Elle y joue successivement deux rôles. **A. Rôle glycolytique de la GAPDH.** Dès que le glucose extracellulaire est transporté dans le neurone, ce glucide entre immédiatement dans la voie glycolytique dont les enzymes peuvent s'associer en chaîne pour plus d'efficacité. Une production d'ATP glycolytique s'effectue à la membrane à l'étape catalysée par la phosphoglycérate kinase (PGK). Cet ATP sera rétrocédé à la GAPDH qui va alors pouvoir jouer son rôle supplémentaire de kinase du GABA_AR. **B. Rôle de kinase endogène de la GAPDH.** La GAPDH utilise l'ATP glycolytique pour s'autophosphoryler. La phospho-enzyme transfère ensuite deux phosphates à la boucle intracytoplasmique de la sous-unité $\alpha 1$ du GABA_AR sur une thréonine et une sérine. Cela entraîne la capacitation du récepteur : le canal associé pourra alors – et alors seulement – s'ouvrir lors de la liaison du GABA sur son site extracellulaire. Enfin, une phosphatase membranaire atypique (PPase) contrecarre ce mécanisme en déphosphorylant le récepteur, ce qui conduit à une incapacitation et au *rundown* de la réponse GABAergique. Le maintien de l'inhibition rapide dépend donc étroitement de la consommation de glucose. Glu-T : transporteur du glucose ; Glc-6P : glucose-6P ; G-3P : glyceraldéhyde-3P, 1,3-diPG : 1,3-diphosphoglycérate ; 3-PG : 3-phosphoglycérate.

Déficiences de la phosphorylation endogène du GABA_A-R dans l'épilepsie humaine

De nombreux travaux ont fortement suggéré qu'un déficit de la neurotransmission inhibitrice GABAergique pouvait être à l'origine des crises chez des patients épileptiques. Cependant, nos propres travaux, et ceux de plusieurs autres équipes, avaient montré que l'inhibition GABAergique était fonctionnelle dans le tissu cor-



tical prélevé pour des raisons strictement thérapeutiques dans des zones à l'origine des crises chez ces patients. Existait-il donc un mécanisme pouvant diminuer de façon rapide et transitoire l'efficacité de la neurotransmission inhibitrice chez ces patients ? Un mécanisme impliquant des phosphorylations pouvait présenter ces caractéristiques.

Nous avons émis l'hypothèse d'une altération de la phosphorylation endogène du GABA_AR dans du tissu épiléptogène humain provenant de pièces de cortectomie de patients souffrant d'épilepsie partielle pharmacorésistante. En effet, pour certains de ces patients, l'exérèse chirurgicale de la zone corticale à l'origine des crises est la seule thérapeutique efficace. Dans quelques rares cas, nous avons pu obtenir du tissu cortical témoin provenant de l'exérèse de tumeurs intraparenchymateuses ou de méningiomes chez des patients ne présentant pas d'épilepsie.

Les résultats obtenus sont clairs et concordants [8]. Sur des préparations de membranes corticales lavées, la phosphorylation du GABA_AR par la GAPDH est significativement réduite dans le tissu épiléptogène par rapport au tissu contrôle. Cette altération ne résulte pas d'une diminution de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$, mais reflète un déficit intrinsèque de la phosphorylation endogène.

Les réponses GABAergiques présentaient un *rundown* significativement plus rapide et plus ample lorsque les enregistrements étaient réalisés sur des neurones corticaux isolés de tissu épiléptogène par rapport aux réponses de neurones isolés de tissu témoin. Par ailleurs, ce *rundown* observé dans le tissu épiléptogène pouvait être largement réduit, soit en ajoutant le substrat glycolytique de la GAPDH, soit en inhibant la phosphatase membranaire. Le déficit de la phosphorylation endogène du GABA_AR induit donc une labilité fonctionnelle des courants GABAergiques. Nous proposons que chez le patient épiléptique, toute augmentation fortuite de la demande métabolique puisse induire une diminution transitoire de l'efficacité de la neurotransmission inhibitrice du fait de la

moindre efficacité de la phosphorylation glycolyse-dépendante et faire « basculer » la zone corticale pathologique concernée dans un fonctionnement « épileptique ».

Ces résultats sont à rapprocher d'un fait constant observé chez les patients atteints d'épilepsie partielle. La mesure chez ces patients du métabolisme cérébral du glucose par imagerie de tomographie d'émission de positons (TEP), a montré que, dans les périodes intercritiques, le foyer épileptique et les zones corticales limitrophes étaient dans un état d'hypométabolisme, c'est-à-dire de moindre utilisation du glucose [9], de l'ordre de 10 % à 15 %. La relation entre cette altération métabolique et la pathologie épileptique n'avait jamais été établie de façon claire.

Nous proposons que la déficience de la modulation glycolyse-dépendante de l'inhibition GABAergique puisse au moins partiellement rendre compte de l'hypométabolisme intercritique du glucose. En effet, d'autres équipes ont montré que l'activation des synapses GABAergiques avait un coût énergétique non négligeable. La diminution de l'efficacité de la phosphorylation endogène des GABA_AR que nous avons mise en évidence dans le tissu épiléptogène devrait diminuer ce coût énergétique et donc la consommation de glucose. À l'appui de cette hypothèse, l'on peut citer le fait que l'administration d'un agoniste GABA_A augmente le métabolisme du glucose chez le volontaire sain et chez le patient épiléptique (en particulier au niveau des zones corticales à l'origine des crises) avec une amplitude du même ordre que celle de l'hypométabolisme [10, 11]. Cette idée va à l'encontre de l'opinion souvent avancée selon laquelle une augmentation de l'efficacité de l'inhibition GABAergique produit un hypométabolisme du glucose par simple diminution de l'activité électrique des neurones.

Conclusions et perspectives

La phosphorylation glycolyse-dépendante du récepteur principal de l'inhibition GABAergique que nous avons mise en évidence est déficiente dans le tissu nerveux de patients souffrant d'épilepsies

pharmacorésistantes. Cette observation permet d'établir un lien entre l'hypométabolisme intercritique observé chez ces patients et la pathologie épileptique. Cette observation ouvre également une perspective nouvelle et prometteuse pour le développement de molécules anti-épileptiques actives dans les épilepsies pharmacorésistantes, dont souffrent près de 25 % des patients épileptiques. ♦

Dual role for the glycolytic enzyme GAPDH in GABAergic neurotransmission and in human epilepsy

RÉFÉRENCES

- Smart, TG, Thomas P, Brandon NJ, Moss SJ. Heterologous regulation of GABA_A receptors: protein phosphorylation. In : *Pharmacology of GABA and glycine neurotransmission*. Berlin : Springer-Verlag, 2001 : 195-225.
- Sweetnam PM, Lloyd J, Gallombardo P, et al. Phosphorylation of the GABA_A/benzodiazepine receptor alpha subunit by a receptor-associated protein kinase. *J Neurochem* 1988 ; 51 : 1274-84.
- Bureau, MH, Laschet JJ. Endogenous phosphorylation of distinct gamma-aminobutyric acid type A receptor polypeptides by Ser/Thr and Tyr kinase activities associated with the purified receptor. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 26482-7.
- Stelzer A, Kay AR, Wong RKS. GABA_A-receptor function in hippocampal cells is maintained by phosphorylation factors. *Science* 1988 ; 241 : 339-41.
- Kawamoto RM, Caswell AH. Autophosphorylation of glyceraldehydephosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes. *Biochemistry* 1986 ; 25 : 657-61.
- Laschet JJ, Minier F, Kurciewicz I, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABA_A receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition. *J Neurosci* 2004 ; 24 : 7614-22.
- Minier F, Laschet JJ, Evrard B, Bureau MH. Endogenous phosphorylation of the GABA_A receptor protein is counteracted by a membrane-associated phosphatase. *Neurochem Int* 2000 ; 36 : 499-506.
- Laschet JJ, Kurciewicz I, Minier F, et al. Dysfunction of GABA_A receptor glycolysis-dependent modulation in human partial epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 3472-7.
- Ryvlin P, Bouvard S, Le Bars D, et al. Clinical utility of flumazenil-PET versus [18F]fluorodeoxyglucose-PET and MRI in refractory partial epilepsy. A prospective study in 100 patients. *Brain* 1998 ; 121 : 2067-81.
- Peyron R, Le Bars D, Cinotti L, et al. Effects of GABA_A receptors activation on brain glucose metabolism in normal subjects and temporal lobe epilepsy (TLE) patients. A positron emission tomography (PET) study. Part I: brain glucose metabolism is increased after GABA_A receptors activation. *Epilepsy Res* 1994 ; 19 : 45-54.
- Peyron R, Cinotti L, Le Bars D, et al. Effects of GABA_A receptors activation on brain glucose metabolism in normal subjects and temporal lobe epilepsy (TLE) patients. A positron emission tomography (PET) study. Part II: the focal hypometabolism is reactive to GABA_A agonist administration in TLE. *Epilepsy Res* 1994 ; 19 : 55-62.

Le cancer de la prostate conduit à la découverte d'un nouveau rétrovirus infectieux humain

Jean-Luc Darlix, Marc Sitbon

J.L. Darlix : Laboréto, Unité de virologie humaine, IFR128, École Normale Supérieure de Lyon et Inserm 46, allée d'Italie, 69364 Lyon, France.

Jean-Luc.Darlix@ens-lyon.fr

M. Sitbon : Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM), CNRS, IFR 122,

1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

sitbon@igmm.cnrs.fr

> Oncovirus et cancers

Depuis le milieu du XX^e siècle, de nombreuses études expérimentales sur des virus humains et animaux liés au cancer, alors appelés « oncovirus », ont ouvert la voie à des découvertes majeures dans le domaine des mécanismes moléculaires du vivant, avec en particulier la découverte des premiers gènes impliqués dans les processus d'oncogenèse. Il s'agit là des fameux proto-oncogènes et de leurs variants oncogènes qui faisaient une entrée très remarquée dans le champ fondamental, pour devenir ensuite des marqueurs diagnostiques, et des cibles thérapeutiques [1, 2].

À l'heure actuelle, un faisceau d'arguments indique qu'environ 25 % des cancers ont une origine virale [3], avec comme cause directe des composants de certaines souches de papillomavirus humains comme les HPV 16 et 18 [4]. Quand elle est indirecte, la cancérogenèse viro-induite implique des modifications du fonctionnement de protéines clefs de la prolifération et de la survie cellulaires, voire des altérations chromosomiques des cellules infectées. Ainsi, la modification des voies de mort cellulaire par apoptose semble jouer un rôle majeur dans le développement de carcinomes hépatocellulaires dus au virus de l'hépatite C (VHC), en particulier par la protéine virale Core [5]. Par ailleurs, de nombreux réarrangements chromosomiques ont été décrits dans les leucémies induites par le rétrovirus leucémogène humain HTLV-1 (le premier rétrovirus humain découvert), et un rôle direct de la protéine virale

Tax dans ces altérations est suspecté [6]. Des modifications génétiques liées à l'insertion de tout ou partie d'un génome rétroviral (mutagenèse insertionnelle) ont été décrites dans de nombreux modèles animaux comme étant responsables de processus cancéreux, alors que chez l'homme, de telles insertions n'ont pas été retrouvées dans des infections naturelles, mais lors d'essais thérapeutiques impliquant un vecteur rétroviral dérivé d'un rétrovirus MLV (*murine leukemia virus*) [7].

Rétrovirus et cancers

Les Rétrovirus forment une large classe de virus enveloppés à ARN qui ont été, depuis le début du XX^e siècle, reconnus comme pouvant être la cause de cancers et de déficits immunitaires. Initialement découverts chez les oiseaux et les rongeurs, des rétrovirus infectieux ont été retrouvés chez un grand nombre de vertébrés. Les récentes découvertes des HTLV puis des VIH, notamment celle du VIH-1, l'agent causal du Sida chez l'homme, ont donné la mesure du caractère ubiquitaire de ces infections virales. Parmi les rétrovirus de mammifères, des oncorétrovirus de la famille des MLV, regroupés sous le terme de gammarétrovirus (γ -rétrovirus), ont été isolés chez des souris, chats, singes, porcs, koalas, etc. De très nombreuses études expérimentales sur les MLV ont permis de découvrir les enzymes clés de la réplication et de la dissémination rétrovirales que sont la protéase (PR), la *reverse transcriptase* (RT) et l'intégrase (IN), ainsi que la première protéine virale

chaperon d'ARN - la NC - (pour revues, voir [8, 9]). Ces études ont aussi montré que les MLV peuvent modifier l'expression des proto-oncogènes, directement au moyen d'un rapt - connu sous le terme de « transduction génétique » -, et de les transformer en oncogènes vectorisés par un MLV recombinant appelé DLV (*defective leukemia virus*). De très nombreux oncogènes ont ainsi été identifiés et clonés à partir des DLV qui les portent. L'oncogenèse causée par un MLV peut être aussi indirecte en intervenant par mutagenèse insertionnelle comme indiqué ci-dessus, et causant la *trans*-activation d'un proto-oncogène cellulaire après intégration de l'ADN proviral, issu de la transcription inverse du génome par la RT [10].

Cancer de la prostate et γ -rétrovirus

Avec environ 40 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année en France, le cancer de la prostate constitue le cancer ayant la plus haute incidence chez l'homme de plus de 50 ans. Jusqu'à une date très récente, on pensait que les γ -rétrovirus de type MLV n'infectaient pas naturellement l'homme. Or, deux articles récents par Urisman *et al.* [11], et Dong *et al.* [12], montrent de façon remarquable qu'un virus apparenté aux MLV, appelé XMRV (*Xenotropic murine leukemia related virus*), est retrouvé dans les cellules stromales associées aux cellules tumorales de patients atteints d'un cancer de la prostate [11-13]. Les auteurs établissent un lien entre ce XMRV et une prédisposition familiale pour ce type de cancer, connue sous le nom de locus



HPC1, affectant le gène codant la RNaseL. Tout porte à croire qu'il s'agit, dans le cas de cette pathologie, d'une mutation unique, la R462Q, fréquente dans la population humaine, avec des valeurs d'environ 13 % à l'état homozygote, et de 35-60 % à l'état hétérozygote [14]. La mutation R462Q semble diminuer d'un facteur environ 3 l'activité RNaseL [14], qui est un effecteur majeur de la réponse interféron, elle-même clef de voûte des réponses innées anti-virales [15]. Les auteurs rapportent que la plus faible activité de la RNaseL mutée est nécessaire pour que l'infection par le XMRV devienne chronique dans des cellules humaines *ex vivo* [12]. Pour autant, les relations causales entre la présence de XMRV et ce type de cancer ne sont pas établies pour l'instant.

Néanmoins, XMRV, ce nouveau rétrovirus humain, possède toutes les caractéristiques des MLV, un génome unique avec les gènes codant Gag (protéines de structure du virion), Pol (les enzymes PR, RT et IN) et Env (les protéines d'enveloppe de surface et transmembranaires). Aux extrémités de l'ARN génomique, on retrouve les séquences non-codantes 5' et 3' UTR (*untranslated region*) contenant tous les signaux nécessaires à la réplication et à l'expression transcriptionnelle et traductionnelle du génome dans les cellules. Toutefois l'enveloppe est de type xénotrope et reconnaît un récepteur présent à la surface des cellules humaines, XPR1, dont la forme allélique chez les rongeurs ne permet pas leur infection [16]. Le récepteur XPR1 a de nombreux domaines transmembranaires, comme nombre de

récepteurs de rétrovirus, et serait couplé à la transduction du signal *via* les protéines G, et donc à l'activation du métabolisme cellulaire au début de l'infection.

Les premières études moléculaires concernant les sites d'intégration chromosomique du XMRV ont été menées à bien dans deux cas de cancer de la prostate homozygotes pour R462Q. Les données confirment que le XMRV s'est bien répliqué dans le tissu épithélial en plus des cellules stromales, et que l'ADN viral s'est intégré au voisinage de gènes codant d'importants facteurs de transcription, à l'image de ce qui a déjà été largement décrit avec les MLV [12].

Ces observations remarquables mettent en exergue une fois de plus que les rétrovirus circulent au sein de - et entre - populations, d'autant plus qu'ils peuvent se répliquer à un haut niveau comme le VIH-1. La présence du XMRV soulève de nombreuses interrogations, à commencer par son origine, sa variabilité, son mode de transmission, son incidence dans la population générale, mais aussi les déterminants moléculaires du virus [17] et de l'hôte responsables de pathologies comme le cancer de la prostate.


Ces questions primordiales auront certainement l'heur d'occuper virologues, généticiens, cancérologues, cliniciens, thérapeutes, et épidémiologistes et, sans doute, environnementalistes et diététiciens. ♦

Prostate cancer leads to the discovery of a new human infectious retrovirus

RÉFÉRENCES

1. Huebner RJ, Todaro GJ. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969 ; 64 : 1087-94.

2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 ; 100 : 57-70.
3. Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, et al. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol* 2004 ; 14 : 453-71.
4. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002 ; 89 : 213-28.
5. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007 ; 5 : 453-63.
6. Marriott SJ, Semmes OJ. Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene* 2005 ; 24 : 5986-95.
7. Thrasher AJ, Haccin-Bey-Abina S, Gaspar HB, et al. Failure of SCID-X1 gene therapy in older patients. *Blood* 2005 ; 105 : 4255-7.
8. Darlix JL, Cristofari G, Rau M, et al. Nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus as a model protein with chaperoning functions and as a target for antiviral drugs. *Adv Pharmacol* 2000 ; 48 : 345-72.
9. Sitbon M, Denesvre C, Dardalhon V, et al. Les rétrovirus leucémogènes murins : pathogènes, gènes et outils génétiques. *Virologie* 2001 ; 5 : 265-93.
10. Rosenberg N, Jolicoeur P. *Retroviruses*. In : Coffin J, Hughes SH, Varmus HE, eds. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997 : 475-585.
11. Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, et al. Identification of a novel gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog* 2006 ; 2 : e25.
12. Dong B, Kim S, Hong S, et al. An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 1655-60.
13. Fan H. A new human retrovirus associated with prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 1449-50.
14. Casey G, Neville PJ, Plummer SJ, et al. RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13 % of prostate cancer cases. *Nat Genet* 2002 ; 32 : 581-3.
15. Thakur CS, Jha BK, Dong B, et al. Small-molecule activators of RNase L with broad-spectrum antiviral activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 9585-90.
16. Battini JL, Rasko JE, Miller AD. A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: possible role in G protein-coupled signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 1385-90.
17. Corbin A, Prats AC, Darlix JL, Sitbon M. A nonstructural gag-encoded glycoprotein precursor is necessary for efficient spreading and pathogenesis of murine leukemia viruses. *J Virol* 1994 ; 68 : 3857-67.



Tarifs d'abonnement M/S - 2007

Abonnez-vous

à Médecine/Sciences

> Depuis 20 ans, grâce à m/s, vous vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement page 678 dans ce numéro de m/s

