



**HAL**  
open science

## Quand trop de myélinisation détruit la myéline

Sylvain Bartolami, Nicolas Tricaud

► **To cite this version:**

Sylvain Bartolami, Nicolas Tricaud. Quand trop de myélinisation détruit la myéline. Médecine/Sciences, 2012, 28 (4), pp.341-343. 10.1051/medsci/2012284002 . hal-02156368

**HAL Id: hal-02156368**

**<https://hal.science/hal-02156368>**

Submitted on 14 Jun 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## Quand trop de myélinisation détruit la myéline

Sylvain Bartolami<sup>1,2</sup>, Nicolas Tricaud<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Équipe Avenir « myélines » Inserm U1051, institut des neurosciences de Montpellier, hôpital Saint-Éloi, 80, rue Augustin Fliche, 34091 Montpellier cedex 5, France.

<sup>2</sup> Université Montpellier 2, place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France.  
sylvain.bartolami@univ-montp2.fr



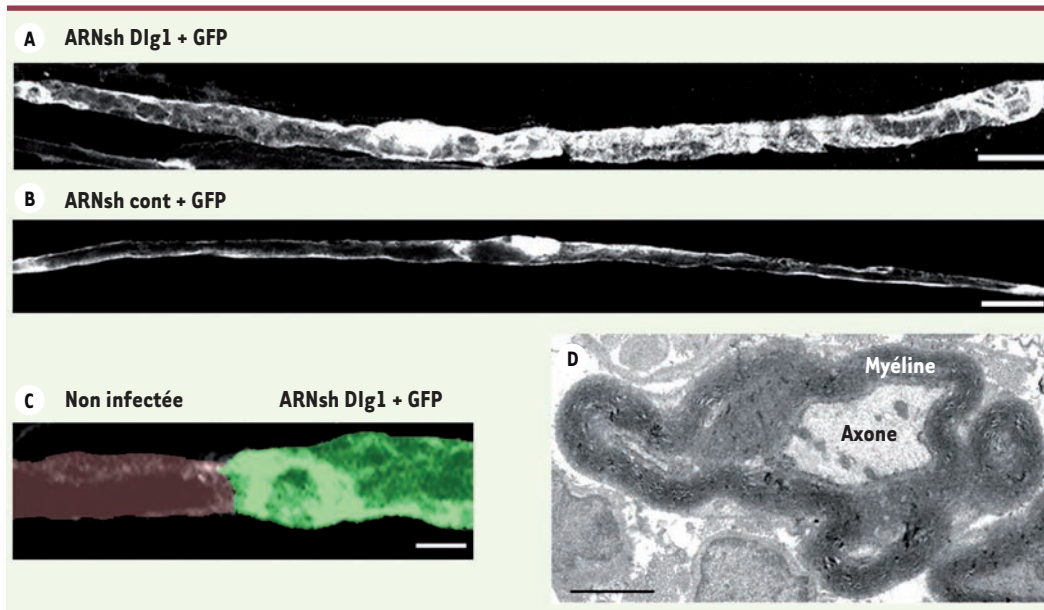
> L'augmentation de la vitesse de conduction nerveuse, grâce au processus de myélinisation, est un élément essentiel de l'émergence des vertébrés. Dans le système nerveux périphérique, les cellules de Schwann s'enroulent en plusieurs tours de spires membranaires compactes autour de l'axone qui constituent des manchons électriquement isolants - les gaines de myéline - séparés par les nœuds de Ranvier. La succession de ces gaines augmente la vitesse de conduction nerveuse car les potentiels d'action doivent sauter d'un nœud de Ranvier à un autre, ce qui accélère leur vitesse de propagation. L'épaisseur et la longueur de la gaine de myéline sont donc des paramètres essentiels de la conduction de l'influx nerveux. L'importance fonctionnelle de la myéline est particulièrement mise en exergue lorsque survient une réduction

de la conduction nerveuse comme dans les pathologies démyélinisantes très handicapantes, par exemple les maladies de Charcot-Marie-Tooth (CMT) [1].

### Régulation de la myélinisation

La myélinisation est propre aux axones de gros calibre (supérieur à 1 µm). L'étape de myélinisation est induite *via* la synthèse de facteurs trophiques dont le plus connu est la neuréguline 1 (NRG1) de type III [2]. Cette protéine transmembranaire est présentée par l'axone et interagit avec les récepteurs *erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2/3* (erbB2/3) des cellules de Schwann [3, 4]. L'activation de ces récepteurs provoque la différenciation des cellules de Schwann immatures en cellules de Schwann myélinisantes, puis stimule la production de myéline par ces

cellules [2] *via* la voie de signalisation de la phosphoinositide-3 kinase (PI3K) et de la protéine kinase B (AKT) [5]. Certaines maladies de Charcot Marie Tooth se traduisent par un dépôt anormal de myéline sous forme d'accumulations focales qui suggèrent un excès de myélinisation. C'est notamment le cas lors de certaines mutations du gène codant pour la *myotubularin-related protein 2* (MTMR2) dans la CMT de type 4B. Dans les nerfs de souris, MTMR2 interagit avec la protéine de polarité cellulaire *Disks large homolog 1* (Dlg1), suggérant l'intervention d'un processus de polarisation de la cellule de Schwann lors de la myélinisation. Après avoir étudié la polarisation cellulaire des cellules de Schwann myélinisantes [6], nous avons montré que Dlg1 et MTMR2 participaient à un mécanisme prévenant un excès de



**Figure 1. L'absence de Dlg1 in vivo provoque un excès de myélinisation.** L'inhibition de l'expression de Dlg1 dans une cellule de Schwann infectée par des vecteurs exprimant un ARNsh dirigé contre Dlg1 (A. ARNsh Dlg1 + GFP) entraîne un épaississement de la myéline par rapport à une cellule de Schwann infectée par des virus contrôles (B. ARNsh cont + GFP). C. Cet épaississement

est particulièrement évident au niveau d'un nœud de Ranvier. D. Dans certaines fibres, l'inhibition de l'expression de Dlg1 conduit à une myélinisation excessive aberrante (barres d'échelle en A et B : 20 µm ; en C : 5 µm ; en D : 2 µm) (d'après [7]).

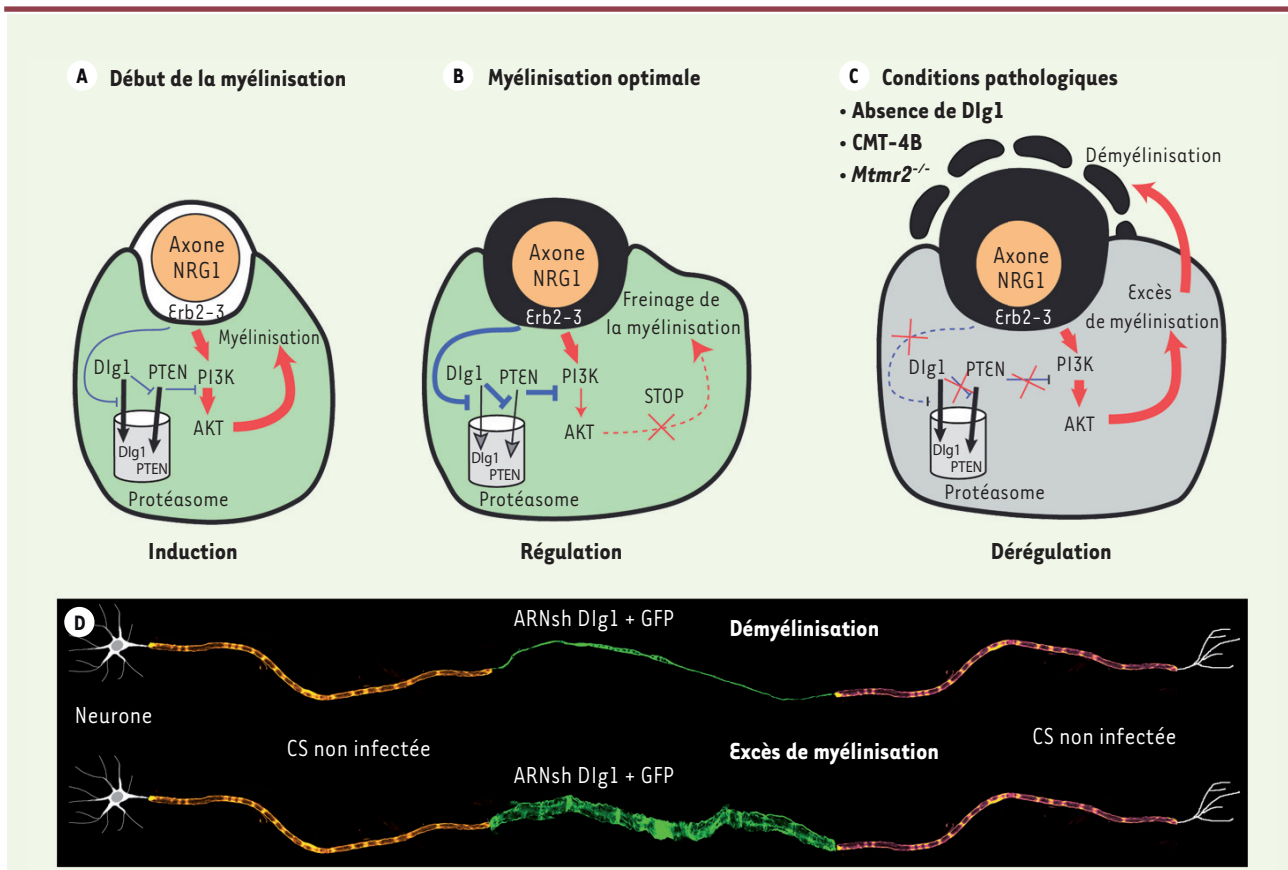
myélinisation dans ces cellules. Ces résultats ont été obtenus *via* une approche d'ARN interférence qui permet d'inhiber la synthèse d'une protéine cible à l'aide de *short hairpin RNA* (ARNsh) ciblant l'ARNm sur le *RNA-induced silencing complex* (RISC) [7]. Cette inhibition de l'expression d'une protéine est possible *in vivo* en utilisant des vecteurs viraux exprimant les ARNsh spécifiquement dans les cellules de Schwann [6]. De tels virus, injectés dans le nerf sciatique de souris nouveau-nés, ont été utilisés pour éteindre l'expression de Dlg1 pendant la myélinisation. Privées de Dlg1, les cellules de Schwann produisent des gaines de myéline significativement plus épaisses que celles que produisent des cellules de Schwann infectées avec un virus contrôle (Figure 1A-C). À l'inverse, lorsque Dlg1 est surexprimée dans les cel-

lules de Schwann *via* un vecteur viral, celles-ci sont incapables de synthétiser la gaine de myéline. Ces résultats montrent que Dlg1 participe à un mécanisme d'inhibition de la myélinisation. Cependant, quel est son mode d'action ?

### Le couple Dlg1/PTEN : un frein à la myélinisation au cours du développement et chez l'adulte

Nous nous sommes basés sur le fait que Dlg1 peut interagir avec la *phosphatase with sequence homology to tensin* (PTEN) qui inhibe l'activation d'AKT [8, 9]. Des expériences de co-immunoprécipitation ont confirmé que Dlg1 et PTEN interagissaient bien dans les cellules de Schwann [7]. De plus, la quantité de PTEN présente dans ces cellules était directement liée au niveau d'expression de Dlg1.

Ce résultat suggérait que Dlg1 pouvait contrôler la quantité de PTEN disponible, et donc l'activation d'AKT et la régulation de la myélinisation. En effet, l'inhibition *in vivo* de l'expression de PTEN induit un excès de myélinisation comparable à celui qui est observé lorsque Dlg1 est éteint, suggérant que ces deux facteurs coopèrent pour inhiber la myélinisation. L'utilité d'un tel mécanisme de régulation est manifeste lors du développement du nerf sciatique de la souris. En effet, douze jours après la naissance, l'épaisseur de la myéline commence à tendre vers l'optimal, et la quantité de Dlg1 et de PTEN atteint un pic qui s'accompagne ensuite d'un fléchissement du degré de myélinisation. Ce mécanisme de limitation de la myélinisation semble persister chez l'adulte car l'inhibition de l'expression de Dlg1 chez des souris plus



**Figure 2. Contrôle différentiel de la myélinisation par la NRG1.** **A.** Au début de la myélinisation, l'effet de la NRG1 s'exprime essentiellement par l'activation de la voie promyélinisante PI3K/AKT. **B.** Lorsque le diamètre de la fibre atteint son optimum, l'effet inhibiteur de NRG1 sur la dégradation de Dlg1 et PTEN permet l'accumulation de Dlg1 et PTEN. PTEN inhibe alors fortement l'activation d'AKT et freine la myélinisation. **C-D.** La perturbation de ce frein chez la souris (absence de Dlg1 et mutant *Mtmr2*<sup>-/-</sup>) et chez les patients atteints de la maladie de CMT de type 4B (CMT-4B) entraîne un excès de myélinisation suivie d'une démyélinisation.



âgées induit également la production de manchons de myéline hypertrophiés (Figure 1D) qui finissent par dégénérer [7]. Le freinage exercé par Dlg1 sur la myélinisation est donc nécessaire pour éviter un excès de myélinisation puis une démyélinisation. Mais qui enclenche ce frein ?

### Défaut du frein de la myélinisation exercé par Dlg1 dans les CMT 4B

Compte tenu de son rôle clé dans la myélinisation, l'influence de NRG1 sur le duo Dlg1/PTEN a été étudiée. De fait, les quantités de Dlg1 et de PTEN s'accroissent lorsque les cellules de Schwann sont stimulées par la NRG1. En effet, cette dernière inhibe l'ubiquitinylation de Dlg1 et de PTEN, bloquant leur dégradation par le protéasome. En conséquence, les deux protéines ainsi protégées s'accumulent et exercent une inhibition croissante sur la voie PI3K/AKT. Lorsque Dlg1 devient prédominant - ce qui arrive vers la fin de la 3<sup>e</sup> semaine de vie chez la souris -, la myélinisation est contrainte de s'arrêter. Ainsi la NRG1 active deux voies antagonistes : l'une, via PI3K/AKT, stimule la myélinisation ; l'autre, via Dlg1 et PTEN, la stoppe (Figure 2A-B).

Mais notre résultat le plus marquant [7] est d'avoir établi un lien entre cette

régulation de la myélinisation et certaines CMT. En effet nous avons effacé Dlg1 dans le nerf sciatique de souris dont le gène *Mtmr2* a été invalidé et qui représentent donc un modèle de la CMT de type 4B [10]. La suppression de Dlg1 n'induit pas d'excès de myélinisation indiquant que, chez ces mutants CMT-4B, Dlg1 n'exerce pas son rôle de frein de la myélinisation. Ces résultats suggèrent que la défaillance du mécanisme inhibant la myélinisation est à l'origine de l'excès de myélinisation qui s'accompagne d'une démyélinisation caractéristique la CMT de type 4B (Figure 2C-D).

En résumé, au cours du développement, une myélinisation optimale des axones nécessite un processus de freinage, reposant sur Dlg1 et PTEN, couplé, via NRG1, au processus de stimulation axonale. Dans les nerfs matures, la perte de fonction de Dlg1 provoque un excès de myélinisation suivi d'une démyélinisation. La perturbation de ce mécanisme de freinage pourrait donc jouer un rôle majeur dans la physiopathologie des neuropathies démyélinisantes caractérisées par une myélinisation excessive focale comme on l'observe dans la maladie de CMT de type 4B. ♦

**More myelin is not necessarily good**

## NOUVELLE

### L'allophagie, ou comment l'embryon élimine les mitochondries et autres organites paternels

Sara Al Rawi<sup>1,2</sup>, Vincent Galy<sup>1,2</sup>

► La reproduction sexuée conduit au brassage de l'information génétique en combinant, dans l'œuf, les génomes nucléaires des gamètes des deux organismes parents. Lors de la fécondation, le spermatozoïde entre entièrement dans l'ovocyte et apporte avec lui l'ADN, les centrioles ainsi que du cytoplasme et des organites. Parmi ces organites, les mitochondries,

qui jouent un rôle important dans la production d'énergie, possèdent leur propre génome : l'ADN mitochondrial (ADNmt). Il est établi depuis longtemps que, chez la plupart des animaux étudiés, la transmission de l'ADNmt est strictement maternelle, car l'ADNmt apporté par le spermatozoïde ne perdure pas dans l'embryon [1]. Plusieurs questions

## REMERCIEMENTS

Nous remercions J.L. Pasquier pour son aide à la réalisation des figures.

## CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

- Vallat JM, Funalot B. La maladie de Charcot-Marie-Tooth. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 842-7.
- Nave KA, Salzer JL. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 2006 ; 16 : 492-500.
- Lee KF, Simon H, Chen H, et al. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 1995 ; 378 : 394-8.
- Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, et al. Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 1997 ; 389 : 725-30.
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, et al. Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 2005 ; 47 : 681-94.
- Ozçelik M, Coter L, Jacob C, et al. Pals1 is a major regulator of the epithelial-like polarization and the extension of the myelin sheath in peripheral nerves. *J Neurosci* 2010 ; 30 : 4120-31.
- Cotter L, Ozçelik M, Jacob C, et al. Dlg1-PTEN interaction regulates myelin thickness to prevent damaging peripheral nerve overmyelination. *Science* 2010 ; 328 : 1415-8.
- Salemena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 2008 ; 133 : 403-14.
- Contreras-Paredes A, De la Cruz-Hernández E, Martínez-Ramírez I, et al. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology* 2009 ; 383 : 78-85.
- Suter U, Scherer SS. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci* 2003 ; 4 : 714-26.

<sup>1</sup> UPMC Université Paris 06, UMR 7622, Laboratoire de biologie du développement, 9, quai Saint-Bernard, F-75005 Paris, France.  
<sup>2</sup> CNRS, UMR 7622 Laboratoire de biologie du développement, 9, quai Saint-Bernard, F-75005 Paris, France.  
[vincent.galy@snv.jussieu.fr](mailto:vincent.galy@snv.jussieu.fr)

Deux études, dont la nôtre, menées en parallèle en France et au Japon et publiées dans la revue *Science* [2, 3] ont révélé le rôle de l'autophagie dans la dégradation des mitochondries paternelles dans le système biologique modèle du nématode *C. elegans*.

### Les enjeux et les mécanismes de la dégradation des mitochondries paternelles

La transmission exclusivement maternelle de l'ADNmt est établie chez la plupart des animaux et chez beaucoup de plantes. En effet, l'ADNmt du spermatozoïde entre dans l'ovocyte lors de la fécondation, et sa dégradation rapide y est alors observée. Dans plusieurs pathologies humaines, l'intégrité du génome mitochondrial est compromise : ainsi, des mutations affectant toutes les molécules d'ADN mitochondriales d'un organisme (état homoplasmique) ou une fraction d'entre elles (état hétéroplasmique) ont été associées à ces pathologies qui sont transmises par la mère [4, 11]. Une défaillance de l'élimination des molécules apportées par le spermatozoïde pourrait créer une hétéroplasmie mitochondriale. Un des enjeux de cette dégradation serait lié à la probabilité importante pour l'ADN mitochondrial du spermatozoïde d'être porteur de mutations délétères ; il est donc nécessaire d'éviter qu'il soit transmis à la descendance. En effet, l'ADN mitochondrial, contrairement à l'ADN nucléaire, n'est pas protégé par son association avec des histones. De plus, le spermatozoïde est dépourvu d'un système de réparation efficace, alors qu'il évolue dans un environnement agressif riche en leucocytes à réaction peroxydative positive lors de sa maturation dans l'épididyme. La vulnérabilité de l'ADNmt face à ce stress oxydatif augmenterait fortement son taux de mutations et de délétions avant la fécondation. La nécessité d'une dégradation rapide des mitochondries paternelles pourrait aussi s'expliquer par le risque d'un apport de protéines mitochondriales aux effets antiprolifératifs, qui serait donc inapproprié à la succession des divisions cellulaires qui suit la fécondation.

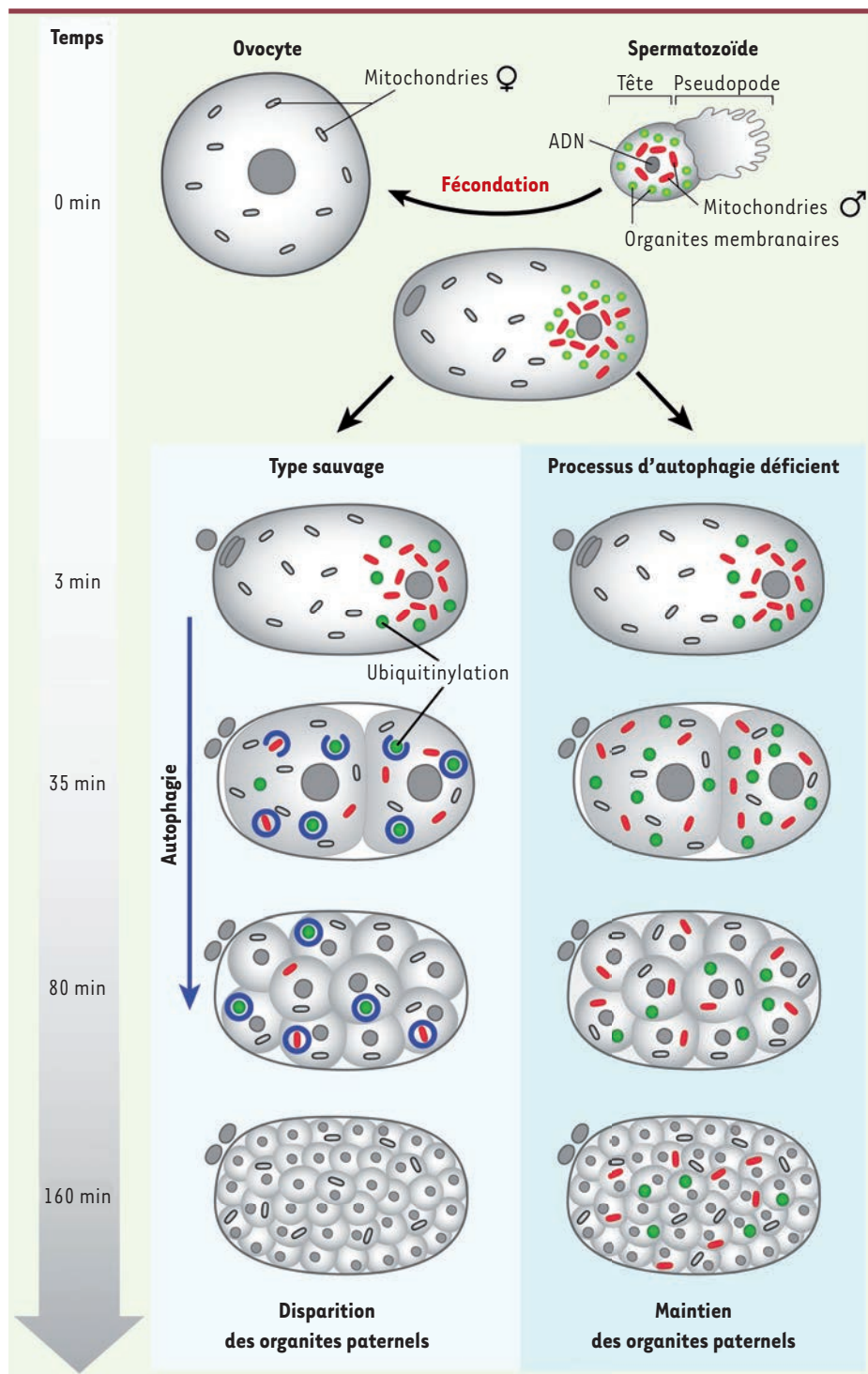
L'analyse d'animaux issus de croisements effectués entre animaux de différentes espèces montre que, dans certains cas, l'ADNmt du spermatozoïde n'est pas dégradé, suggérant que le mécanisme de reconnaissance et de dégradation puisse être spécifique à l'espèce [5]. L'analyse d'embryons résultant de la fusion d'un ovocyte avec une cellule somatique (transfert nucléaire) montre une origine mixte des mitochondries [6]. En revanche, aucune transmission anormale d'ADN mitochondrial du spermatozoïde n'a été identifiée lors de l'analyse d'échantillons de tissus de sujets conçus par procréation médicalement assistée et injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) [7].

La voie lysosomale ou la voie du protéasome sont deux voies de dégradation pouvant intervenir dans ce processus ; elles sont déclenchées par une réaction d'ubiquitylation - une modification post-traductionnelle. Le choix de l'une ou l'autre de ces voies dépendrait du nombre de molécules dans la chaîne d'ubiquitine et de l'acide aminé sur lequel se fait le branchement. Dans tous les cas, il a été suggéré que l'ubiquitylation est essentielle à la dégradation des mitochondries paternelles [1]. Par ailleurs, la morphologie des structures membranaires observées lors de la dégradation des organites du spermatozoïde après la fécondation évoque les structures autophagiques observées lors de la dégradation des mitochondries au cours de la différenciation des érythroblastes [1]. Ainsi, bien qu'aucune donnée expérimentale n'ait précédemment impliqué l'autophagie dans la dégradation des organites hérités du spermatozoïde, de nombreuses observations suggéreraient sa possible contribution à l'élimination des mitochondries paternelles dans l'embryon.

### L'autophagie participe à la dégradation des mitochondries et à l'élimination de l'ADNmt paternel

Les deux études que nous décrivons ont utilisé le vers *C. elegans*, un nématode de 1 mm de long, transparent, mâle ou

hermaphrodite, et au cycle de reproduction très rapide [2, 3]. Nous avons examiné, comme l'équipe japonaise, la destinée des organites transmis par le spermatozoïde lors de la fécondation et le rôle de l'autophagie dans leur dégradation et dans l'élimination de leur ADN. Une analyse complémentaire dans l'embryon de souris suggère que le mécanisme mis en évidence pourrait être conservé chez les mammifères [3]. Ces études [2, 3] démontrent que chez *C. elegans* comme chez d'autres espèces, lors de la fécondation, la membrane plasmique du spermatozoïde fusionne avec celle de l'ovocyte et son contenu se déverse dans le cytoplasme de l'ovocyte en apportant, en plus de son ADN nucléaire, des organites tels que les mitochondries et les organites membranaires. Ces derniers sont des compartiments membranaires spécifiques du spermatozoïde de nématode et nécessaires à la motilité de celui-ci, mais dont le rôle n'est pas clairement établi. L'utilisation d'anticorps spécifiques des organites membranaires et de nématodes mâles dont les mitochondries sont marquées a permis de suivre la destinée de ces composants après la fécondation. Dans les minutes qui suivent la fécondation, ces organites restent groupés autour de l'ADN du spermatozoïde et sont rapidement associés à des structures reconnues par des anticorps spécifiques de LGG-1 et LGG-2, des protéines connues des compartiments de la voie autophagique. Les mitochondries du spermatozoïde et les organites membranaires ont disparu lorsque l'embryon atteint le stade de 26 cellules, soit environ deux heures après la fécondation [2, 3]. L'observation en microscopie électronique d'embryons précoces a permis de visualiser des autophagosomes contenant des mitochondries [3]. La persistance des mitochondries et organites membranaires dans des embryons mutés [2, 3] ou traités par ARN interférence [3], de façon à éteindre l'expression des protéines de l'autophagie, démontrent l'implication de ce processus dans la dégradation de ces structures [2, 3].



**Figure 1. Participation de l'autophagie à la dégradation des organites du spermatozoïde dans l'ovocyte fécondé.**

Représentation schématique de la fécondation et de la dégradation par autophagie des organites apportés par le spermatozoïde lors de la fécondation. Au temps 0 min, l'ovocyte et le spermatozoïde du nématode *C. elegans* fusionnent. Les mitochondries (rouges) et les organites membranaires (verts) du spermatozoïde sont déversés dans le cytoplasme de l'ovocyte et restent proches de l'ADN nucléaire du spermatozoïdes pendant quelques minutes après la fécondation. Lors de la fécondation d'ovocytes contrôlés (type sauvage), les organites membranaires sont rapidement ubiquitinés (3 min après la fécondation) dans l'embryon puis ces organites, comme les mitochondries paternelles, sont séquestrés et dégradés dans des autophagosomes (bleus) pour disparaître complètement lorsque l'embryon a atteint le stade d'environ 26 cellules (80 min après la fécondation). Lorsque le spermatozoïde féconde un ovocyte déficient pour l'autophagie (droite), les organites membranaires sont ubiquitinés normalement (3 min après la fécondation) mais ni ces organites, ni les mitochondries du spermatozoïde ne sont dégradés. Le maintien de ces organites paternels dans les embryons déficient pour le processus d'autophagie démontre que, normalement, l'autophagie participe activement à leur dégradation (illustration : S. Gournet, CNRS).

minutes après la fécondation, suggérant que cela puisse être le signal de leur reconnaissance

et de leur dégradation par autophagie. La formation des structures autophagiques se produit lorsque l'embryon commence la deuxième division méiotique, soit environ 30 min après la fécondation [2, 3]. L'utilisation d'un anticorps anti-ubiquitine montre que les organites membranaires sont marqués avant leur entrée dans l'embryon [3] et que leur ubiquitinylation

augmente une fois dans l'ovocyte [3]. Cette ubiquitinylation post-fécondation a été confirmée par l'apparition de structures marquées avec l'ubiquitine couplée à la GFP et colocalisant avec les organites membranaires [3]. Cette modification apparaît dès le début de la première division méiotique, soit seulement quelques

Plusieurs types d'ubiquitinylation ont été décrits selon que les chaînes d'ubiquitines sont liées par la lysine 48 (K48) ou la lysine 63 (K63). L'ubiquitinylation de type K48 est plutôt associée aux voies de dégradation par le protéasome, tandis que celle de type K63 est plutôt associée à la voie

autophagique. L'utilisation d'anticorps discriminant ces deux formes indique que les organites membranaires, mais pas les mitochondries, subissent une ubiquitinylation de type K63 et K48. L'ubiquitinylation de type K63 précède le recrutement de LGG-1 et LGG-2 et donc la formation des autophagosomes, suggérant qu'elle pourrait représenter le signal déclenchant la dégradation autophagique de ces organites [3]. De plus, la marque de type K48 suggère qu'une dégradation *via* le protéasome puisse aussi être impliquée [2, 3]. L'inactivation de l'autophagie, par ARN interférence ou chez des mutants, stabilise les organites membranaires et les mitochondries paternelles jusqu'à des stades embryonnaires tardifs, alors que dans les embryons sauvages, ils disparaissent durant les premières divisions cellulaires. La persistance des mitochondries permet d'envisager que l'ADN mitochondrial paternel puisse aussi persister dans les embryons produits. L'ADNmt du spermatozoïde a donc été suivi par PCR en utilisant une souche hétéroplasmique (dont une fraction des molécules d'ADNmt sont porteuses d'une délétion et coexistent avec les formes de type sauvage). Des mâles hétéroplasmiques ont été croisés avec des hermaphrodites défectifs ou non pour l'autophagie [2, 3]. La forme délétée de l'ADNmt paternel est identifiée uniquement dans les embryons issus du croisement des mâles hétéroplasmiques avec la souche déficiente pour l'autophagie [2, 3]. Ceci démontre que l'élimination de l'ADNmt paternel est dépendante de l'autophagie.

### Rôle de l'autophagie dans la dégradation des mitochondries paternelles chez les mammifères

Chez les mammifères, les mitochondries du spermatozoïde, localisées dans la pièce intermédiaire à la base du flagelle, sont ubiquitinylées et dégradées après la fécondation [8]. Afin de déterminer le rôle de l'autophagie dans l'élimination des mitochondries d'origine paternelle, la localisation de marqueurs des compartiments autophagiques a été analysée dans les spermatozoïdes de souris avant et après la fécondation [3]. Différents marqueurs ont été testés : LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), GABARAP (*γ-aminobutyric-acid-type-A-receptor-associated protein*) - les homologues des protéines LGG-1 et LGG-2 -, la molécule adaptatrice p62 ainsi que l'ubiquitinylation de type K63. Tous ces marqueurs ont été localisés dans la pièce intermédiaire des spermatozoïdes après leur entrée dans l'ovocyte, suggérant que les mitochondries du spermatozoïde sont ciblées par la machinerie d'autophagie également dans l'embryon de souris. Ces résultats indiquent que le rôle de l'autophagie dans l'élimination des mitochondries paternelles est un mécanisme conservé au cours de l'évolution. Cette autophagie participant à la dégradation des organites paternels après la fécondation a été nommée « allophagie ». Il reste maintenant à élucider les mécanismes de la cascade autophagique qui permettent une dégradation ciblée des organites paternels ainsi qu'à mesurer les conséquences potentielles du main-

tien du génome mitochondrial paternel dans l'organisme. ♦

### Allophagy, or how the embryo eliminates mitochondria and other paternal organelles

#### CONFLITS D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Sutovsky P, Van Leyen K, McCauley T, et al. Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reprod Biomed Online* 2004 ; 8 : 24-33.
2. Sato M, Sato K. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* 2011 ; 334 : 1141-4.
3. Al Rawi S, Louvet-Vallée S, Djeddi A, et al. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* 2011 ; 334 : 1144-7.
4. Zeviani M, Carelli V. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 2007 ; 20 : 564-71.
5. Shitara H, Hayashi JI, Takahama S, et al. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics* 1998 ; 148 : 851-7.
6. Takeda K, Kaneyama K, Tsai M, et al. Characterization of a donor mitochondrial DNA transmission bottleneck in nuclear transfer derived cow lineages. *Mol Reprod Dev* 2008 ; 75 : 759-65.
7. Danan C, Sternberg D, Van Steirteghem A, et al. Evaluation of parental mitochondrial inheritance in neonates born after intracytoplasmic sperm injection. *Am J Hum Genet* 1999 ; 65 : 463-73.
8. Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, et al. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 1999 ; 402 : 371-2.
9. Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, et al. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 2003 ; 301 : 1387-91.
10. Alberti A, Michelet X, Djeddi A, Legouis R. The autophagosomal protein LGG-2 acts synergistically with LGG-1 in dauer formation and longevity in *C. elegans*. *Autophagy* 2010 ; 6 : 5.
11. Sarzi E, Rötig A. Instabilité du génome mitochondrial et pathologies associées. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 171-6.

#### NOTE AJOUTÉE AUX ÉPREUVES

Une étude récente publiée dans *Developmental Cell* [12] montre que, chez la drosophile, la stratégie garantissant la transmission maternelle de l'ADN mitochondrial repose sur une réduction massive de la quantité d'ADN mitochondrial des spermatozoïdes avant la fécondation. Celle-ci résulte de l'action d'une endonucléase lors de la spermatogénèse combinée à l'exclusion physique de l'ADN mitochondrial. Paradoxalement, une étude antérieure indiquait que l'ADN mitochondrial paternel peut être transmis par le père dans certains croisements interspèces et qu'il serait donc capable d'entrer dans l'ovocyte à la fécondation [13]. Les mécanismes mis en lumière dans cette nouvelle étude ressemblent à ceux qui ont été décrits chez le poisson médaka et une ascidie impliquant respectivement la dégradation enzymatique de l'ADN mitochondrial (avant et juste après la fécondation) et l'exclusion des mitochondries lors de la fécondation comme mécanismes faisant barrière à la transmission de l'ADN mitochondrial paternel. Il semblerait donc que les mécanismes assurant l'uniparentalité de l'ADN mitochondrial soient variés et parfois combinés selon que l'ADN paternel ait ou non pénétré dans l'ovocyte lors de la fécondation.

#### RÉFÉRENCES

12. Deluca SZ, O'Farrell PH. Barriers to male transmission of mitochondrial DNA in sperm development. *Dev Cell* 2012 ; 22 : 660-8.
13. Sherengul W, Kondo R, Matsuura ET. Analysis of paternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genes Genet Syst* 2006 ; 81 : 399-404.

## Des veinules post-capillaires très spécialisées recrutent les lymphocytes dans les ganglions

Christine Mousson<sup>1,2</sup>, Jean-Philippe Girard<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CNRS, institut de pharmacologie et de biologie structurale (IPBS), 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France ;

<sup>2</sup> Université Paul Sabatier de Toulouse, IPBS, 31077 Toulouse, France.

jean-philippe.girard@ipbs.fr



En condition physiologique, les cellules sanguines empruntent la boucle circulatoire sans entrer en contact avec les tissus environnants, car l'endothélium constitue une barrière infranchissable entre ces deux territoires. La seule exception, qui sous-tend l'ensemble de la surveillance immunitaire chez les mammifères, est le passage massif de lymphocytes du sang vers les organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes, cellules effectrices de la réponse immunitaire adaptative, patrouillent au sein de l'organisme à la recherche d'antigènes étrangers contre lesquels ils sont dirigés. Ils circulent continuellement du sang vers les organes lymphoïdes secondaires - dont les ganglions lymphatiques -, puis transitent dans le système lymphatique et regagnent la circulation sanguine via le canal thoracique. Les ganglions lymphatiques collectent l'ensemble des antigènes issus des tissus périphériques et constituent le site d'activation des lymphocytes en cas d'infection [1]. Le transit des lymphocytes naïfs du sang vers le tissu lymphoïde ganglionnaire nécessite une étape de migration transendothéliale, qui prend place spécifiquement au sein des veinules postcapillaires appelées HEV (*high endothelial venule*). Ces vaisseaux sanguins HEV constituent des sites d'entrée très efficaces puisque l'on estime que dans l'organisme, à chaque seconde, plus de cinq millions de lymphocytes accèdent aux ganglions par cette voie [2].

### Organisation et rôle des vaisseaux HEV

Les cellules endothéliales extrêmement différenciées qui tapissent ces vaisseaux HEV sont caractérisées par une forme

rebondie - dite cuboïdale - ainsi que par une forte expression d'enzymes (telles que la fucosyltransférase-VII [FucTVII], la *L-selectin ligand sulfotransferase* [LSST]) dédiées à la synthèse de molécules indispensables à la traversée vasculaire des lymphocytes (telles que les sialomucines membranaires hypersulfatées décorées par l'antigène reconnu par l'anticorps spécifique MECA-79) [2]. Des interactions moléculaires transitoires et successives entre ces sialomucines « MECA-79 positives » et la sélectine-L (ou CD62L) des lymphocytes circulants vont permettre aux lymphocytes de s'extraire du flux sanguin et de rouler à la surface de l'endothélium [1]. Ils termineront alors leur cheminement dans le ganglion lymphatique en adhérant fermement à la paroi vasculaire, puis en la traversant [2].

Ces dernières années, de nombreuses études ont montré que les vaisseaux HEV sont étroitement contrôlés par le microenvironnement tissulaire [3-5]. En effet, à la naissance, ces vaisseaux présentent un phénotype immature (expression de la *mucosal addressin cell adhesion molecule 1* [MAdCAM-1] au lieu de MECA-79) et n'acquièrent le phénotype HEV mature que durant le premier mois de vie postnatale [3]. Par la suite, chez l'adulte, les vaisseaux HEV restent extrêmement plastiques. Le clampage des vaisseaux lymphatiques afférents [4] d'un ganglion lymphatique provoque dans les cellules endothéliales la perte du phénotype HEV et leur transformation en cellules endothéliales classiques, tout comme le fait la culture de ces cellules isolées de leur

tissu d'origine [5]. Enfin, ce phénotype HEV qui, en conditions physiologiques, est restreint exclusivement aux ganglions lymphatiques, peut aussi être induit au sein de tissus non lymphoïdes au cours de maladies inflammatoires chroniques (maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde, thyroïdites) [2] et de cancer (sein, mélanome) [6]. La présence de vaisseaux HEV dans un tissu est toujours associée à un infiltrat massif de lymphocytes, néfaste dans le cas des maladies inflammatoires chroniques (entretient la boucle inflammatoire), mais de très bon pronostic dans le cas des tumeurs solides (favorise la réponse immunitaire antitumorale). Il paraît donc essentiel de comprendre les mécanismes qui régissent l'induction et le maintien des vaisseaux HEV afin d'envisager de nouvelles pistes de traitements pour ces pathologies.

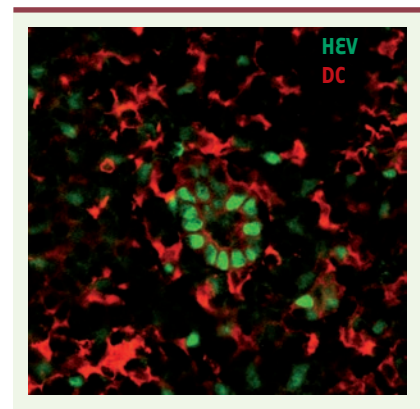


Figure 1. Interactions entre les cellules dendritiques (DC, en rouge) et les cellules endothéliales d'un vaisseau HEV (en vert) au sein d'un organe lymphoïde secondaire.

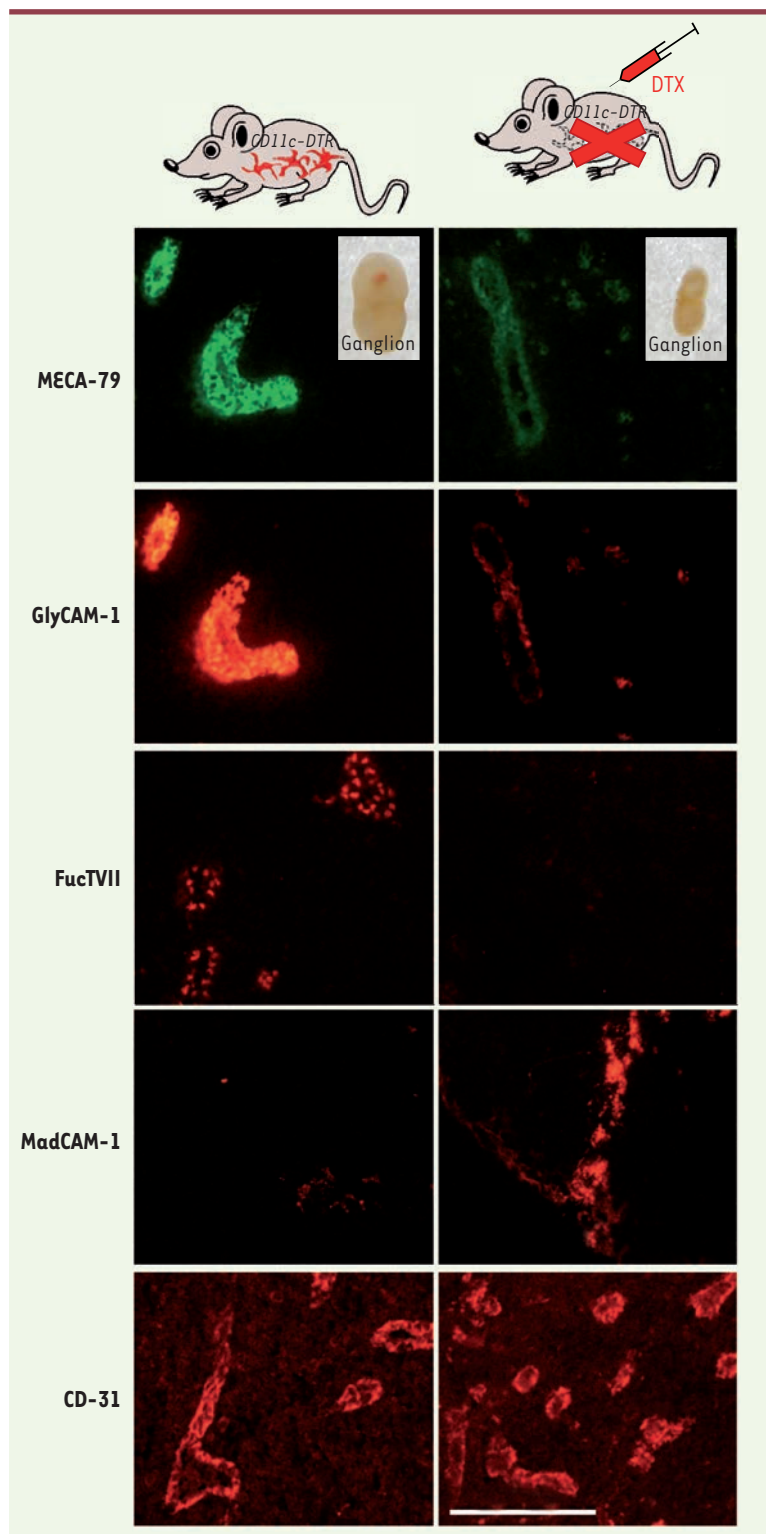


## Rôle des cellules dendritiques (DC) dans le maintien des vaisseaux HEV

Bien qu'il soit admis que le phénotype HEV est sous le contrôle du microenvironnement tissulaire, rien n'est connu

de la nature des cellules impliquées. Du fait de la proximité étroite des DC et des vaisseaux HEV dans les ganglions lymphatiques (*Figure 1*), nous avons fait l'hypothèse que les DC pourraient être

impliquées dans le contrôle du phénotype HEV [7]. Les DC sont les cellules présentatrices d'antigènes « professionnelles » de l'organisme découvertes en 1973 par Ralph Steinman (lauréat du Prix Nobel de médecine 2011) [8, 11]. Leur forme est étoilée avec de longs prolongements cellulaires leur permettant de capter les éléments de leur environnement dans les tissus périphériques, mais aussi de migrer vers les ganglions lymphatiques afin d'apprêter et de présenter les antigènes protéiques aux lymphocytes T naïfs. En fonction de la situation, elles peuvent induire une tolérance vis-à-vis des antigènes du soi ou, inversement, une immunité adaptative protectrice contre des agents infectieux en délivrant des signaux d'activation aux lymphocytes T. Afin de tester l'hypothèse d'un rôle des DC dans le maintien du phénotype HEV chez l'adulte sain, nous avons utilisé les souris transgéniques CD11c-DTR créées par S. Jung en 2002 [9]. Ce modèle murin exprime le récepteur simien de la toxine diphtérique (DTX) sous le contrôle du promoteur CD11c classiquement décrit comme spécifique des DC chez la souris. La DTX est une puissante toxine bactérienne pour la cellule dès lors qu'elle se lie à son récepteur membranaire. L'injection systémique de DTX à ces animaux permet la déplétion spécifique des DC exprimant fortement CD11c des ganglions lymphatiques. Nous avons alors étudié le devenir des vaisseaux HEV une fois les DC ganglionnaires éliminées par la DTX (*Figure 2*). L'analyse immunohistochimique des ganglions lymphatiques



**Figure 2. Les DC maintiennent le phénotype mature et fonctionnel des cellules endothéliales HEV.** La déplétion des DC par injection de DTX aux souris transgéniques CD11c-DTR induit une dédifférenciation des cellules endothéliales qui conservent le marqueur vasculaire CD31 mais perdent les marqueurs HEV (MECA-79, GlyCAM-1 et FucTVII) pour adopter un phénotype immature « MADCAM-1 positif » semblable à celui des cellules de la période postnatale. Les vaisseaux ne sont plus capables de recruter les lymphocytes circulant dans le sang, et les ganglions se vident de leur contenu cellulaire (encarts des photographies MECA-79).



a révélé une perte des marqueurs HEV (MECA-79, GlyCAM-1, FucTVII) malgré une conservation des marqueurs endothéliaux classiques (CD31 ou *platelet endothelial cell adhesion molecule* [PECAM-1]). Il existe une véritable dédifférenciation des vaisseaux HEV qui adoptent un phénotype immature similaire à celui qui est observé à la naissance et deviennent alors incapables de recruter les lymphocytes circulant dans le sang [7]. Les ganglions se vident presque entièrement de leur contenu cellulaire. L'analyse du recrutement par microscopie intravitale révèle un roulement trop rapide des lymphocytes sur l'endothélium qui ne peuvent plus s'arrêter et effectuer la diapédèse. L'ensemble des effets observés est réversible à l'arrêt des injections de DTX, mais aussi en réponse à l'injection sous-cutanée de grandes quantités de DC cultivées *in vitro* à partir de précurseurs de moelle osseuse.

Des expériences de cocultures entre des DC et des cellules endothéliales HEV purifiées révèlent une interaction directe entre les deux partenaires par l'intermédiaire de la lymphotoxine (LT)  $\alpha 1\beta 2$  (ligand membranaire exprimé par les DC) et de son récepteur  $LT\beta R$  (exprimé par l'endothélium) [10]. Cela a été démontré par l'utilisation du récepteur soluble  $LT\beta R$ -Ig bloquant cette signalisation lors des expériences de cocultures [7]. L'implication de la LT exprimée par les DC dans le contrôle du phénotype HEV a été confirmée *in vivo* grâce à des expériences de greffes

hématopoïétiques utilisant la moelle osseuse de souris déficientes pour la  $LT\alpha$  (ou *tumor necrosis factor*  $\beta$  [TNF $\beta$ ]).

### Interaction DC/HEV, une cible potentielle dans l'inflammation et le cancer ?

Les DC régulent l'accès des lymphocytes naïfs aux ganglions lymphatiques en contrôlant le phénotype des cellules endothéliales HEV. Les DC sont donc les véritables chefs d'orchestre de la surveillance immunitaire, non seulement parce qu'elles présentent les antigènes tissulaires aux lymphocytes T, mais aussi parce qu'elles en contrôlent l'étape préalable, l'accès des lymphocytes naïfs aux territoires lymphoïdes. Le couple DC/HEV décrit dans notre étude constituerait ainsi une véritable unité fonctionnelle régulant l'accès d'un territoire à des cellules immunitaires. Le principal enjeu est maintenant de savoir si les DC sont aussi impliquées dans l'induction ectopique de vaisseaux HEV en conditions pathologiques et, si tel est le cas, quels en sont les mécanismes. On pourrait imaginer alors détourner à des fins thérapeutiques les mécanismes de contrôle pour freiner l'apparition de ces vaisseaux lors de pathologies inflammatoires chroniques (pour ralentir l'inflammation) ou, à l'inverse, favoriser leur développement lors des cancers (pour stimuler la réponse immunitaire antitumorale). ♦

### High endothelial venules (HEVs) and dendritic cells: a key functional unit for lymphocyte migration

### CONFLITS D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

### RÉFÉRENCES

1. Von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2003 ; 3 : 867-78.
2. Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 1995 ; 16 : 449-57.
3. Mebius RE, Streeter PR, Michie S, et al. A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits  $CD4^+ CD3^-$  cells to colonize lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 11019-24.
4. Mebius RE, Streeter PR, Breve J, et al. The influence of afferent lymphatic vessel interruption on vascular addressin expression. *J Cell Biol* 1991 ; 115 : 85-95.
5. Lacorre DA, Baekkevold ES, Garrido I, et al. Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. *Blood* 2004 ; 103 : 4164-72.
6. Martinet L, Garrido I, Filleron T, et al. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 2011 ; 71 : 5678-87.
7. Moussion C, Girard JP. Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature* 2011 ; 479 : 542-6.
8. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973 ; 137 : 1142-62.
9. Jung S, Unutmaz D, Wong P, et al. *In vivo* depletion of  $CD11c^+$  dendritic cells abrogates priming of  $CD8^+$  T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 2002 ; 17 : 211-20.
10. Browning JL, Allaire N, Ngam-Ek A, et al. Lymphotoxin-beta receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function. *Immunity* 2005 ; 23 : 539-50.
11. Zitvogel L, Amigorena S, Teillaud JL. Le printemps de l'immunité couronné à Stockholm. Prix Nobel de médecine 2011, Ralph M. Steinman. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 1028-34.

## Organisation des gènes *Hox*

### L'étude de vertébrés non-modèles mène à un nouveau paradigme

Silvan Oulion<sup>1</sup>, Patrick Laurenti<sup>2</sup>, Didier Casane<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CNRS, UMR7232, université Pierre et Marie Curie Paris 6, observatoire océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France ;

<sup>2</sup> Laboratoire évolution, génome et spéciation, CNRS, Gif-sur-Yvette, et université Paris-Diderot, UFR des sciences du vivant, Paris, France.  
[oulion@obs-banyuls.fr](mailto:oulion@obs-banyuls.fr)

► Les gènes *Hox* codent pour des facteurs de transcription à homéodomaine impliqués dans la régionalisation des embryons d'animaux à symétrie bilatérale. Chez les vertébrés, ces gènes interviennent plus particulièrement dans la différenciation de structures répétées telles que les rhombomères, les arcs branchiaux et les somites. Les premières études moléculaires menées chez des tétrapodes, comme la souris, le xénope (animaux modèles pour l'étude de la biologie des vertébrés) et l'homme, conclurent que les gènes *Hox* étaient organisés de façon très contrainte en quatre complexes. Il fut alors tacitement admis que cette organisation était ancestrale et donc commune à l'ensemble des vertébrés. Cette généralisation s'ancre d'autant plus qu'il devint rapidement clair que ces complexes étaient issus de deux duplications successives d'un complexe ancestral unique composé d'au moins 14 gènes *Hox*, qui se sont produites avant la diversification des vertébrés [1].

#### Les nouvelles données génomiques

Des études récentes de génomique sur des organismes non-modèles (encore peu ou pas étudiés par les biologistes) ont montré que l'organisation des gènes *Hox* en quatre complexes est généralisable à l'ensemble des sarcoptérygiens, mais en aucun cas à tous les vertébrés. L'ensemble des vertébrés à mâchoires (les gnathostomes) possèdent plusieurs complexes *Hox*, alors qu'un seul est présent chez l'amphioxus (un céphalo-chordé) (Figure 1). Cette augmentation du nombre de complexes *Hox* chez les

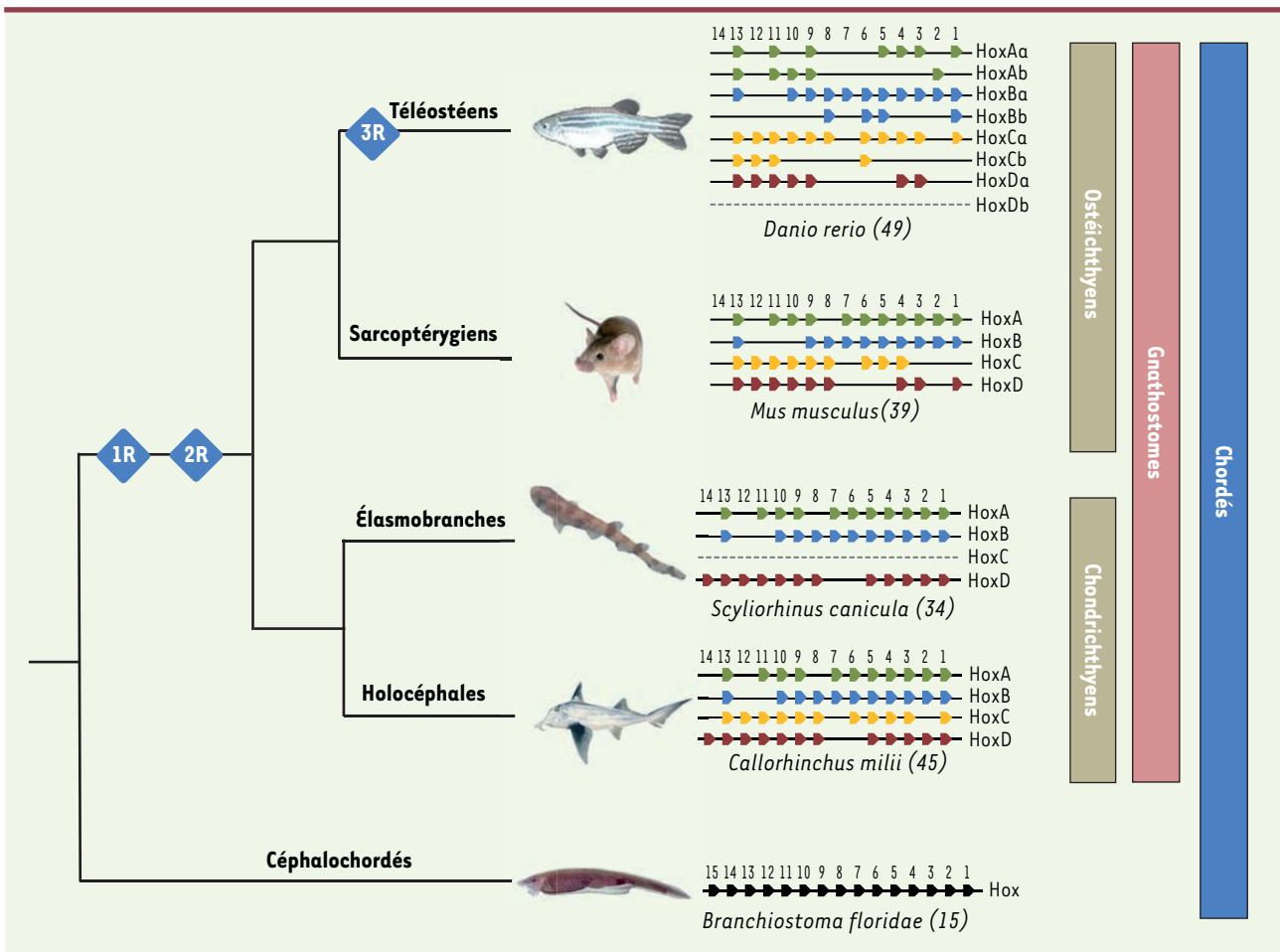
gnathostomes est la conséquence des deux duplications du génome (1R et 2R) qui ont eu lieu avant la diversification des gnathostomes actuels [2]. Chez les sarcoptérygiens, les gènes *Hox* semblent toujours être organisés en quatre complexes (A, B, C et D) (Figure 1), le nombre total de gènes variant peu entre les différentes espèces. Contrairement aux sarcoptérygiens, les actinoptérygiens (poissons à nageoires rayonnées) ont un nombre de complexes *Hox* très variable selon les espèces. Chez certains actinoptérygiens, ce nombre a même nettement augmenté. En effet, avant la radiation des téléostéens, qui représentent la quasi-totalité des actinoptérygiens, une duplication génomique supplémentaire (3R) a permis l'augmentation de quatre à huit complexes *Hox*. Pour la plupart de ces espèces, on ne compte actuellement que sept complexes (comme chez le poisson zèbre avec la perte du complexe *HoxDb*) (Figure 1). Cependant, d'autres, comme le saumon, possèdent jusqu'à treize complexes *Hox*, conséquence d'un nouvel événement de tétraploïdisation (4R) [3, 4]. Enfin, dans le groupe des chondrichthyens, des études très récentes ont permis de caractériser l'organisation de ces gènes chez trois espèces : une chimère *Callorhincus milii*, un requin *Scyliorhinus canicula* et une raie *Leucoraja erinacea*. Chez ces espèces, la composition en gènes *Hox* des complexes A, B et D est identique. La seule différence concerne le complexe *HoxC* qui est entièrement perdu chez les élasmobranchés (requins et raies), mais est maintenu chez la chimère (Figure 1) [5-7]. Ces observations montrent, s'il

en était encore besoin, que les requins ne présentent pas systématiquement des caractères ancestraux. Dans le cas présent, ce sont les sarcoptérygiens et les holocéphales qui ont conservé, indépendamment, la structure ancestrale des quatre complexes *Hox*.

La diversité dans l'organisation des gènes *Hox* est principalement liée aux événements de duplications génomiques qui se sont produits au cours de l'évolution des vertébrés et qui ont eu comme conséquence la création d'une importante redondance génique. Celle-ci est sans doute à l'origine du relâchement des contraintes sur le maintien des gènes et a permis la perte de gènes, voire de complexes entiers. Le cas des élasmobranchés est unique car ce sont les seuls gnathostomes à posséder moins de quatre complexes *Hox*. Une hypothèse raisonnable est de penser que la perte du complexe *HoxC* chez ces organismes pourrait être compensée au niveau transcriptionnel par l'expression ectopique de gènes *Hox* d'autres complexes.

#### Les données d'expression chez un requin

La caractérisation de l'ensemble des patrons d'expression (Figure 2) des gènes *Hox* chez la roussette (*Scyliorhinus canicula*) montre que, malgré l'absence du complexe *HoxC* chez cette espèce, les profils d'expression des autres complexes sont très semblables, voire identiques à ceux décrits chez les autres gnathostomes. La redondance des différents complexes suffirait donc à compenser la perte du

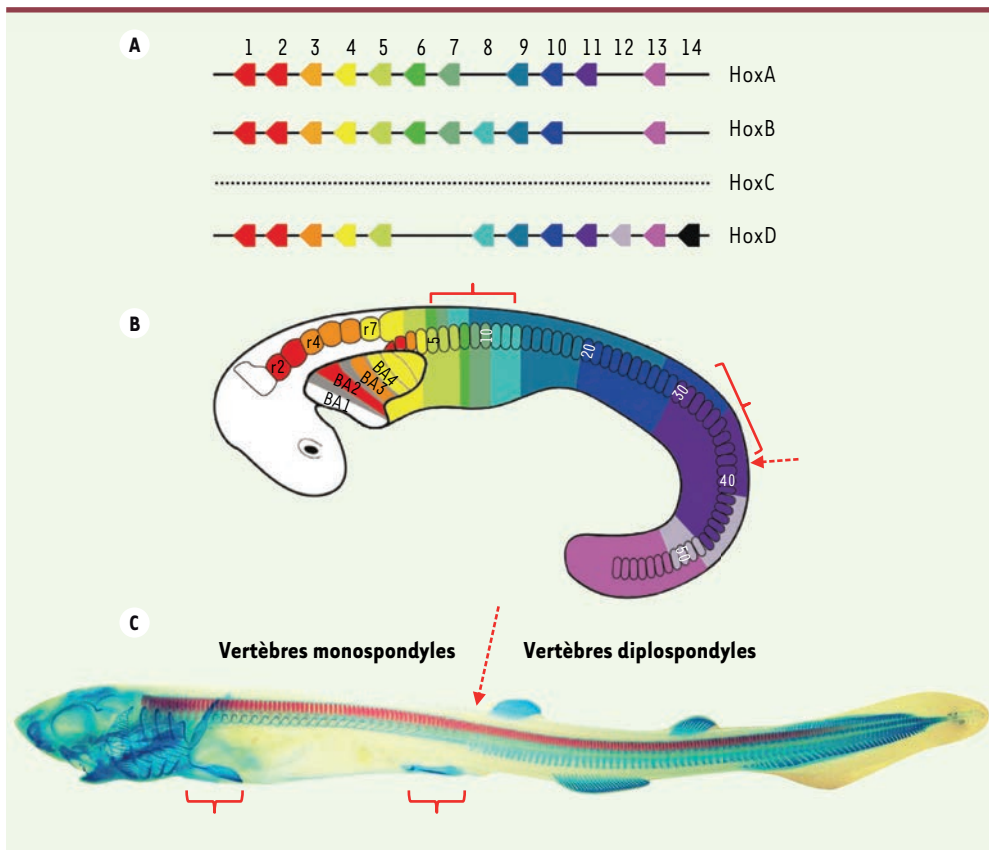


**Figure 1. Organisation génomique des complexes Hox chez les chordés.** L'organisation des complexes Hox (HoxA en vert, HoxB en bleu, HoxC en jaune et HoxD en rouge) est représentée chez un poisson téléostéen (le poisson zèbre), un sarcoptérygien (la souris), deux chondrichthyens (la roussette et la chimère) et un céphalochordé (l'amphioxus). Les complexes Hox perdus chez une espèce sont indiqués en pointillé gris. Le nombre total de gènes Hox identifiés dans chaque espèce est indiqué entre parenthèses. Les gènes sont représentés par des têtes de flèches indiquant leur sens de transcription. Les losanges bleus représentent les duplications génomiques (1R et 2R pour la double duplication du génome à la base des gnathostomes et 3R pour la troisième duplication génomique propre aux téléostéens).

complexe *HoxC* [8], mais il est alors difficile de comprendre pourquoi il est maintenu chez d'autres espèces. Ce complexe fut perdu chez l'ancêtre des élastombranches avant la séparation des raies et des requins. On peut faire l'hypothèse que cette perte était alors possible, car les duplications des complexes étaient encore relativement récentes et les complexes fonctionnellement redondants. Au cours du temps, des fonctions supplémentaires impliquant une complexification de la transcription du complexe *HoxC* (nouveaux domaines d'expression, transcrits alternatifs, ARN non codants, etc.)

auraient été acquises indépendamment dans le groupe des ostéichthyens et celui des holocéphales, et auraient ainsi empêché son élimination. La grande conservation de l'expression des gènes Hox chez les différents gnathostomes est étonnante au vu des différences morphologiques identifiables chez ces espèces au niveau du crâne, des dérivés branchiaux ou du squelette axial. Par exemple, la régionalisation du deuxième arc branchial par les gènes *Hox1* et *Hox2* est identique chez tous les gnathostomes. Pourtant, les dérivés de cet arc forment des structures aussi différentes que la suspension hyostylique

reliant la mâchoire au crâne chez les chondrichthyens et les actinoptérygiens, ou une partie de l'oreille moyenne (l'étrier ou stapes) chez les tétrapodes [9]. L'expression régionalisée des gènes Hox des groupes 1 et 2 dans le deuxième arc branchial était donc établie chez l'ancêtre des gnathostomes, préalablement à la diversification de cette structure dans les différents groupes actuels de vertébrés à mâchoire. De la même manière, la conservation de la régionalisation du cerveau postérieur par les gènes Hox chez les gnathostomes montre que l'expression emboîtée des gènes Hox était établie avant la différenciation



**Figure 2. Gènes *Hox* chez la roussette *Scyliorhinus canicula*.** **A.** Organisation génomique des gènes *Hox* chez la roussette. **B.** Représentation schématique synthétisant les patrons d'expression de tous les gènes *Hox* le long de l'axe antéro-postérieur chez un embryon de roussette. Chaque couleur correspond au patron d'expression d'un groupe de paralogie. La position des rhombomères (r) 2, 4 et 7 et des somites (s) 5, 10, 20, 30, 40 et 50 est indiquée. **C.** Coloration au bleu alcian et au rouge alizarine montrant que le squelette cartilagineux d'un embryon de roussette ne possède que deux types de vertèbres (monospondyles et diplospondyles). Les flèches rouges en B et C indiquent la limite entre ces deux types de vertèbres. Les positions

des nageoires pectorales et pelviennes sont indiquées par des accolades rouges. Malgré la présence d'un code *Hox* avec des domaines d'expression emboîtés (B), toutes les vertèbres antérieures sont de type monospondyle et ne sont pas différenciées morphologiquement contrairement à celles des tétrapodes.

morphologique de cette structure dont les aspects sont très variables d'une espèce à l'autre [8, 9]. D'autre part, la superposition des données d'expression aux données morphologiques révèle une étonnante conservation des domaines d'expression de certains gènes *Hox* liés à des transitions entre deux types de vertèbres chez les tétrapodes mais qui ne sont pas liés à des changements morphologiques chez la roussette et les téléostéens. Par exemple, chez les tétrapodes, les gènes *Hox 3-5* sont impliqués dans la différenciation de l'atlas, de l'axis et des vertèbres cervicales et postérieures, et les gènes *Hox 9-10* dans la différenciation des vertèbres thoraciques et lombaires [10, 11]. Chez la roussette, les domaines d'expression emboîtés de ces gènes sont conservés sans que leurs limites ne correspondent à des transitions morphologiques entre

vertèbres (Figure 2) [8]. Ces données indiquent donc que les domaines d'expression emboîtés des gènes *Hox* dans la colonne vertébrale furent établis avant la diversification des gnathostomes actuels, et qu'ils ne furent impliqués que plus tard au cours de l'évolution dans la diversification morphologique des vertèbres des tétrapodes.

L'expression emboîtée des gènes *Hox* dans les rhombomères, les arcs branchiaux et les somites était donc établie bien avant la différenciation morphologique de ces structures. Il faut donc se garder de généraliser à tous les vertébrés le code *Hox* fonctionnel identifié chez les tétrapodes, car il doit s'agir d'un cas d'« exaptation » : le recrutement d'une fonction préexistante dans un nouveau processus. Les résultats acquis chez des organismes non-modèles nous amènent donc à repenser

le code *Hox* des tétrapodes comme le résultat de deux composantes : une composante ancestrale qui est l'expression régionalisée emboîtée des gènes *Hox* et une composante dérivée qui lie cette information de position à des processus morphologiques particuliers. ♦

### **Hox genes organization: studying non-model vertebrates leads to a paradigm shift**

#### **CONFLITS D'INTÉRÊTS**

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

#### **RÉFÉRENCES**

1. Carroll SB, Grenier JK, Weatherbee SD. *From DNA to diversity: molecular genetics and the evolution of animal design*. Oxford : Blackwell Publishing, 2005 : 258 p.
2. Kuraku S, Meyer A. The evolution and maintenance of Hox gene clusters in vertebrates and the teleost-specific genome duplication. *Int J Dev Biol* 2009 ; 53 : 765-73.



3. Mungpakdee S, Seo HC, Angotzi AR, et al. Differential evolution of the 13 Atlantic salmon Hox clusters. *Mol Biol Evol* 2008 ; 25 : 1333-43.
4. Amores A, Force A, Yan YL, et al. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 1998 ; 282 : 1711-4.
5. Oulion S, Debais-Thibaud M, d'Aubenton-Carafa Y, et al. Evolution of Hox gene clusters in Gnathostomes: insights from a survey of a shark (*Scyliorhinus canicula*) transcriptome. *Mol Biol Evol* 2010 ; 27 : 2829-38.
6. Ravi V, Lam K, Tay BH, et al. Elephant shark (*Callorhynchus milii*) provides insights into the evolution of Hox gene clusters in gnathostomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 16327-32.
7. King BL, Gillis JA, Carlisle HR, Dahn RD. A natural deletion of the HoxC cluster in elasmobranch fishes. *Science* 2011 ; 334 : 1517.
8. Oulion S, Borday-Birraux V, Debais-Thibaud M, et al. Evolution of repeated structures along the body axis of jawed vertebrates, insights from the *Scyliorhinus canicula* Hox code. *Evol Dev* 2011 ; 13 : 247-59.
9. Kardong KV. *Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution*. Boston : McGraw-Hill Higher Education, 2006 : 782 p.
10. McIntyre DC, Rakshit S, Yallowitz AR, et al. Hox patterning of the vertebrate rib cage. *Development* 2007 ; 134 : 2981-9.
11. Wellik DM. Hox genes and vertebrate axial pattern. *Curr Top Dev Biol* 2009 ; 88 : 257-78.

## NOUVELLE

### Approche optogénétique de suppression de la plasticité synaptique induite par la cocaïne

#### Normalisation de la sensibilisation locomotrice

Christian Lüscher<sup>1,2</sup>, Vincent Pascoli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of basic neurosciences, medical faculty, university of Geneva, 1211 Geneva, Suisse ;

<sup>2</sup> Clinic of neurology, department of clinical neurosciences, Geneva university hospital, 1211 Geneva, Suisse.  
[vincent.pascoli@unige.ch](mailto:vincent.pascoli@unige.ch)

#### La plasticité synaptique, support de l'addiction

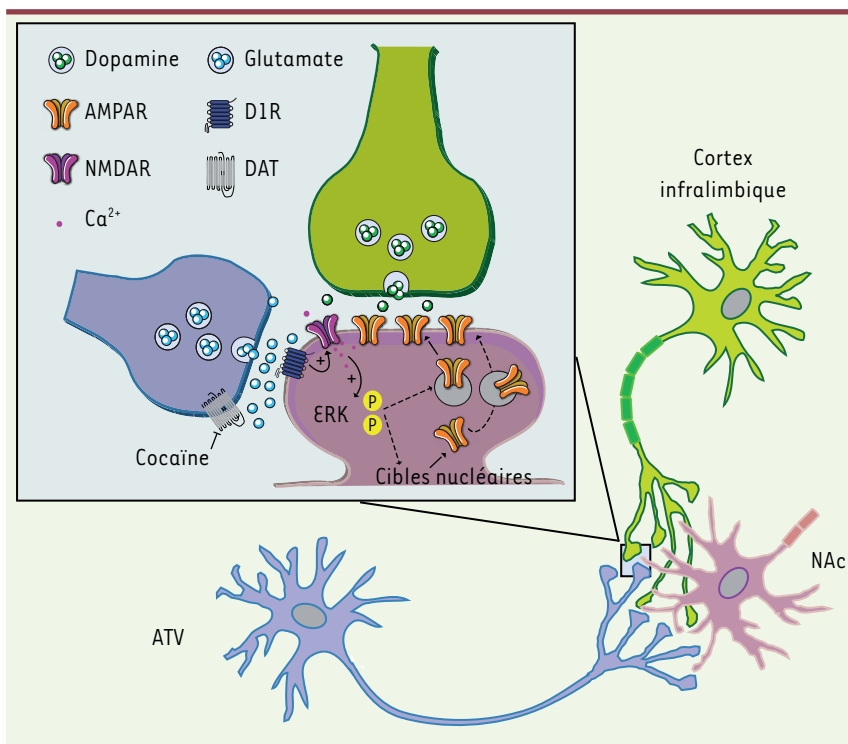
La consommation de cocaïne provoque des altérations comportementales pouvant conduire à l'addiction. L'addiction est caractérisée par une perte de la liberté individuelle se manifestant par un affaiblissement du contrôle de la consommation en dépit des conséquences néfastes ressenties, et par un fort risque de rechute après une période de sevrage. Une meilleure connaissance des circuits neuronaux impliqués et la modélisation animale des différentes facettes de l'addiction ont permis d'accroître notre compréhension des mécanismes de l'addiction aux drogues. Il est notamment établi que les drogues d'abus modifient l'efficacité des connexions entre les neurones dans les circuits cérébraux de la récompense [1] et que cela contribue aux altérations comportementales caractéristiques de l'addiction [2]. La découverte que ces changements (plasticité synaptique) sont réversibles chez la souris établit la preuve de concept que ce type de stratégie pourrait être élaboré pour traiter l'addiction aux

drogues [3]. La plasticité synaptique, le processus par lequel les connexions (synapses) entre les cellules nerveuses sont renforcées ou réduites selon leur niveau d'activité, est naturellement essentielle pour le développement et l'apprentissage. Cependant, la plasticité synaptique est également impliquée dans certaines pathologies neurologiques (ou psychiatriques), notamment celles qui résultent de la consommation abusive de drogues, celle-ci représentant alors une forme d'apprentissage pathologique.

#### Plasticité synaptique induite par la cocaïne : une caractéristique des neurones MSN exprimant D1R

Nous avons restreint notre étude à une partie du système de récompense, le striatum ventral (ou noyau accumbens [NAc]) et au principal type cellulaire qui le constitue, les neurones épineux de taille moyenne (*medium-sized spiny neurons* [MSN]). Ces neurones intègrent les signaux provenant des aires limbiques et corticales contrôlant les comportements motivés *via* le neurotransmetteur glutamate et les signaux transmis par la

dopamine et provenant de l'aire tegmentale ventrale (ATV) (*Figure 1*). Puis, ces neurones MSN communiquent avec les circuits moteurs qui engagent la réponse comportementale. La cocaïne, comme les autres drogues addictives, provoque une forte élévation de la concentration en dopamine dans les structures cérébrales recevant les terminaisons des neurones dopaminergiques de l'ATV, notamment le NAc. Cette élévation de dopamine est à l'origine des effets renforçants [4] et d'adaptations neuronales précoces [5]. Les neurones MSN peuvent être divisés en deux populations de même taille selon le sous-type de récepteur de la dopamine qu'ils expriment, D1R ou D2R [6]. L'utilisation de souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) spécifiquement dans les MSN de type D1R ou D2R permet l'identification de ces neurones lors des enregistrements électrophysiologiques. Ces deux populations projettent vers différentes structures et ont différentes fonctions, même si ces distinctions sont moins claires pour le NAc que pour le



**Figure 1. Implication de ERK dans la potentialisation des synapses glutamatergiques induite par la cocaïne.** Les neurones (MSN) du noyau accumbens (NAc) reçoivent les terminaisons dopaminergiques provenant de l'aire tegmentale ventrale (ATV) et glutamatergiques du cortex préfrontal (entre autres), pour former des synapses tripartites. La cocaïne provoque une forte augmentation de dopamine (DA) extracellulaire, due à l'inhibition du transporteur de la dopamine (DAT) situé sur les terminaisons des neurones de l'ATV. La stimulation des récepteurs de la dopamine de type D1 (D1R) favorise l'entrée de calcium dans les MSN du NAc via la potentialisation des récepteurs au glutamate de type NMDAR. Cela conduit à l'activation par phosphorylation de la voie ERK qui est impliquée dans la potentialisation synaptique, soit par promotion de l'insertion de récepteurs AMPAR à partir d'un pool intracellulaire, soit en favorisant leur synthèse par une action au niveau transcriptionnel.

striatum dorsal. Nous avons montré que la cocaïne provoquait un renforcement (potentialisation) des synapses glutamatergiques spécifiquement sur les D1R-MSN [3].

### Voie de signalisation ERK et plasticité synaptique

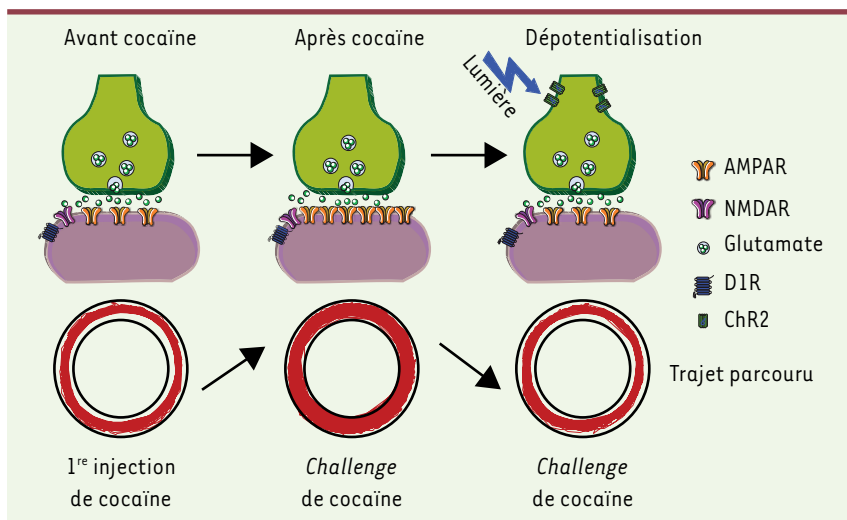
Parmi les voies de signalisation engagées par l'excès de dopamine, la phosphorylation de ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) dans le NAc est particulièrement intéressante parce qu'elle est impliquée dans les adaptations comportementales induites par la cocaïne [7] et parce qu'elle est dépendante de la stimulation coordonnée des

D1R et des récepteurs au glutamate NMDA [8, 9]. *In vitro*, la potentialisation à long terme (LTP) des synapses glutamatergiques des MSN dépend de la stimulation de ces mêmes récepteurs [10]. La LTP est une forme de plasticité synaptique dans laquelle l'activité renforce les synapses glutamatergiques, généralement via l'insertion dans la membrane plasmique du neurone postsynaptique d'un plus grand nombre de récepteurs au glutamate (de type  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid receptor [AMPA]). Dans un travail récent nous avons montré que la plasticité synaptique induite par la cocaïne

nécessite l'activation de ERK (Figure 1) [3]. La voie ERK pourrait intervenir dans l'adressage rapide des AMPAR à la membrane [11] et dans le maintien de cette plasticité via les régulations épigénétiques induites par les drogues [12, 13].

### La suppression de la plasticité synaptique induite par la cocaïne efface la sensibilisation locomotrice

Nous avons étudié la plasticité synaptique induite par la cocaïne associée à la sensibilisation locomotrice : on désigne ainsi l'augmentation de la réponse locomotrice qui est observée lors d'administrations répétées de la drogue, et qui persiste longtemps après son arrêt. La potentialisation de ces synapses par la cocaïne suit le même déroulement que la sensibilisation locomotrice : les deux phénomènes sont observés une semaine après l'instauration du traitement à la cocaïne, mais ne le sont plus un mois après. Une théorie influente dans le domaine de l'addiction propose que les propriétés « motivationnelles » de la cocaïne (qui poussent les consommateurs à rechercher la drogue) seraient responsables de la sensibilisation locomotrice, nous avons testé si en l'absence de potentialisation la sensibilisation persistait ou était supprimée. Pour cela nous avons utilisé l'optogénétique qui permet de contrôler par des flashes de lumière (470 nm) l'activité des neurones. En pratique, la protéine sensible à la lumière (*channel rhodopsin* [ChR2]) est introduite via un vecteur viral dans le cortex infralimbique, et des canules dans lesquelles passent les fibres optiques sont implantées dans le NAc, ce qui permet de stimuler sélectivement par la lumière les terminaisons glutamatergiques. La stimulation de ces neurones à une basse fréquence (1 Hz, protocole de *long term depression*



**Figure 2. Plasticité synaptique et sensibilisation locomotrice induites par la cocaïne.** Les synapses entre les projections du cortex infralimbique et les D1R-MSN du NAc possèdent un pool défini de récepteurs AMPA qui détermine l'efficacité basale de la transmission glutamatergique. L'injection de cocaïne provoque une hyperactivité locomotrice. Après exposition à la cocaïne (une semaine après une injection, ou 10 jours après plusieurs injections), la transmission glutamatergique est renforcée : les synapses sont potentialisées par un mécanisme postsynaptique (insertion de AMPAR). Si on administre à nouveau de la cocaïne à ce stade, (*challenge*) une réponse locomotrice est déclenchée, environ deux fois plus importante que celle qui est observée lors de la première exposition. La réponse est dite sensibilisée. L'application d'un traitement optogénétique (stimulation des afférences glutamatergiques exprimant le *channel rhodopsine*, à 1 Hz pendant 10 min, flèche bleue) permet le rétablissement d'une transmission basale par dépotentialisation (réduction des AMPAR membranaires). L'administration de cocaïne (*challenge*) n'entraîne alors pas de réponse locomotrice sensibilisée. L'activité locomotrice est mesurée dans un couloir circulaire et quantifiée automatiquement par un logiciel dédié. Elle est proportionnelle à l'épaisseur du tracé (ici dans les cercles marrons) (adapté de [16]).

[LTD]) permet la « dépotentialisation » de la transmission glutamatergique sur les MSN par un mécanisme postsynaptique (réduction du nombre de AMPAR à la membrane des MSN). L'application de ce traitement abolit complètement la sensibilisation locomotrice, ne laissant apparaître qu'une réponse non sensibilisée lors d'une réexposition à la cocaïne (Figure 2). Ainsi, en effaçant la plasticité synaptique induite par la cocaïne chez des souris, nous avons rétabli la réponse comportementale initiale [3].

### Implications et perspectives

Cette étude prouve que des neuroadaptations précoces induites par quelques injections de cocaïne sont réversibles. Ceci est surprenant sachant que les individus ayant une addiction ont des

changements très persistants de leur cerveau et une vulnérabilité à la rechute tout au long de leur vie. Notre approche est innovante parce qu'elle diffère significativement des approches pharmacologiques précédemment testées. Ce traitement par la lumière, en agissant directement sur l'activité synaptique, aboutit à une réelle normalisation relayée par les mêmes mécanismes physiologiques que ceux qu'utilise le cerveau pour réguler l'efficacité de ses synapses. Chez l'homme, cela pourrait être effectué par stimulation cérébrale profonde (*deep brain stimulation* [DBS]) ou par stimulation magnétique transcrânienne plutôt que par une approche optogénétique [15], mais à ce jour nous n'avons pas de preuve que cette approche soit efficace chez des

toxicomanes. Préalablement aux études cliniques chez l'homme, il faudrait évaluer cette stratégie dans des modèles plus sophistiqués d'addiction chez l'animal, impliquant notamment une prise volontaire de cocaïne par l'animal. ♦

### Optogenetic reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation normalizes behavioural sensitization

#### CONFLITS D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

- Lüscher C, Malenka RC. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 2011 ; 69 : 650-63.
- Wolf ME, Ferrario CR. AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine. *Neurosci Biobehav Rev* 2010 ; 35 : 185-211.
- Pascoli V, Turiault M, Lüscher C. Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 2011 ; 481 : 71-5.
- Witten IB, Steinberg EE, Lee SY, et al. Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron* 2011 ; 72 : 721-33.
- Brown MTC, Bellone C, Mameli M, et al. Drug-driven AMPA receptor redistribution mimicked by selective dopamine neuron stimulation. *PLoS One* 2010 ; 5 : e15870.
- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Hervé D, et al. Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci* 2009 ; 32 : 538-47.
- Girault JA, Valjent E, Caboche J, Hervé D. ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* 2007 ; 7 : 77-85.
- Pascoli V, Besnard A, Hervé D, et al. Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol Psychiatry* 2011 ; 69 : 218-27.
- Valjent E, Hervé D, Girault JA. Drogues addictives, protéine phosphatases et voie ERK. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 453-4.
- Shen W, Flajolet M, Greengard P, Surmeier DJ. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* 2008 ; 321 : 848-51.
- Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, et al. Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 2002 ; 110 : 443-55.
- Hervé D. La drogue : une histoire d'histone ? *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 568-71.
- Hervé D, Matamalas M, Stipanovich A, et al. Un nouveau mécanisme par lequel la récompense et les drogues modifient la chromatine dans les neurones. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 1027-9.
- Robinson TE, Berridge KC. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008 ; 363 : 3137-46.
- Feil J, Zangen A. Brain stimulation in the study and treatment of addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 2010 ; 34 : 559-74.
- Wolf ME. Neuroscience: behavioural effects of cocaine reversed. *Nature* 2012 ; 481 : 36-7.



## Un facteur de transcription se fait complice du VIH-1 pour détruire les défenses cellulaires

Roland Marquet, Santiago Guerrero, Serena Bernacchi, Sophie Pernot, Julien Batisse, Jean-Christophe Paillart

Architecture et réactivité de l'ARN,  
Université de Strasbourg, CNRS,  
Institut de biologie moléculaire et cellulaire,  
15, rue René Descartes,  
67084 Strasbourg cedex, France.  
[r.marquet@ibmc-cnrs.unistra.fr](mailto:r.marquet@ibmc-cnrs.unistra.fr)

► Les éléments génétiques mobiles représentent une fraction considérable de notre génome et les mammifères ont développé plusieurs facteurs cellulaires restreignant l'expansion des transposons, rétrotransposons et rétrovirus. Plusieurs facteurs de restriction inhibant la réplication des rétrovirus, dont les virus de l'immunodéficience humaine de types 1 et 2 (VIH-1, VIH-2), ont ainsi été identifiés : TRIM5 $\alpha$  (*tri-partite motif-containing protein 5 $\alpha$* ), la téthérine, SAMHD1 (*SAM domain and HD domain 1*), et plusieurs membres de la famille des cytidines désaminases APOBEC-3 (*apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3*) [1-3]. Parmi ces derniers, A-3G et A-3F, qui sont exprimés dans les cellules cibles naturelles des VIH-1 et VIH-2, sont les plus importants [1, 3]. Les rétrovirus ont cependant acquis la capacité de contourner ces facteurs de restriction. Certains ont développé des protéines dites accessoires dans ce seul but : c'est le cas du facteur d'infectiosité viral (Vif) et de la protéine virale U (Vpu) des VIH-1 et VIH-2, ainsi que de la protéine virale X (Vpx) du VIH-2, qui contrecarrent respectivement A-3C/3DE/3F/3G/3H [1, 3], la téthérine [1] et SAMHD1 [2]. La neutralisation des facteurs de restriction par les rétrovirus implique très souvent le détournement de la voie de dégradation des protéines cellulaires par le protéasome en réponse à leur polyubiquitination.

### Ubiquitylation des facteurs

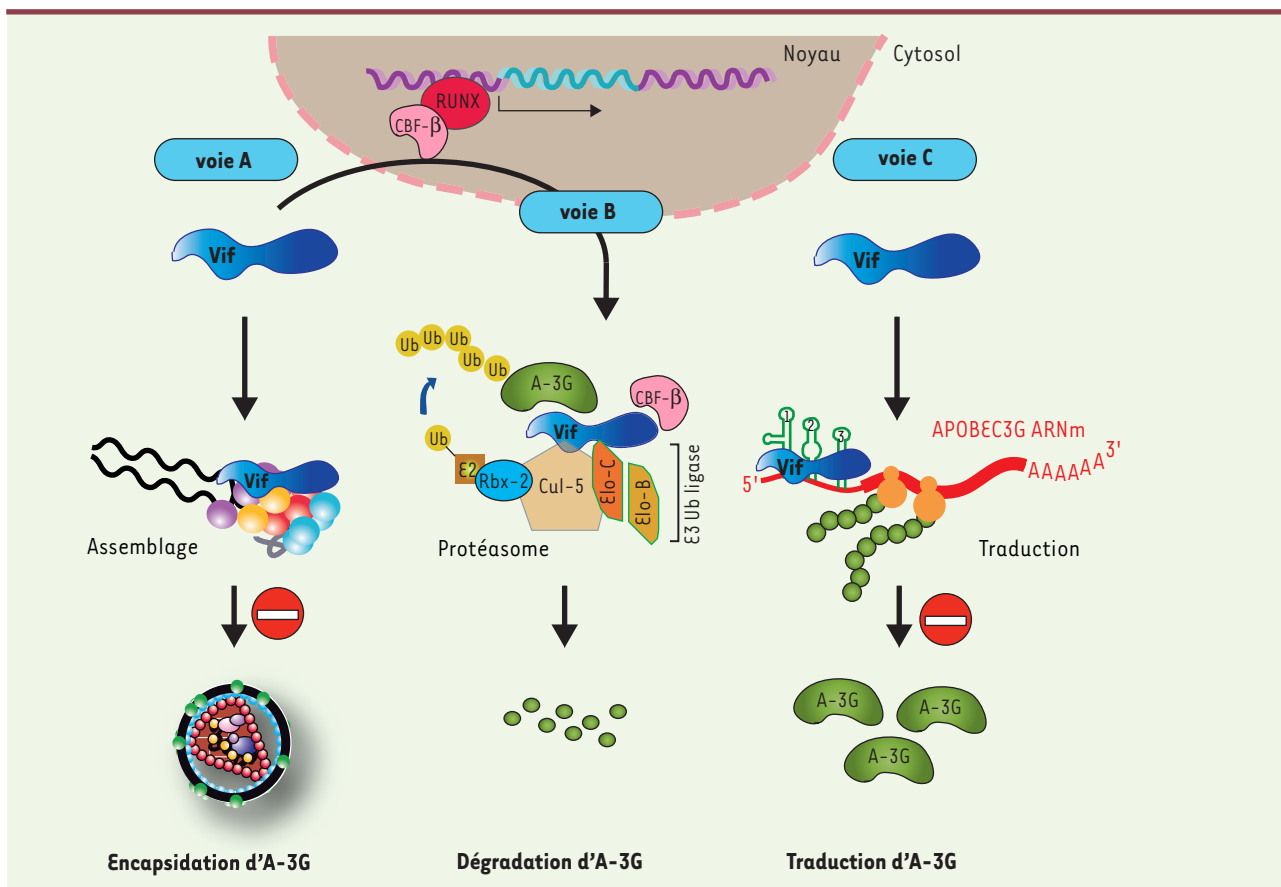
#### de restriction par la protéine virale Vif

L'ubiquitylation des protéines eucaryotes fait tout d'abord intervenir une des deux enzymes activatrices, E1, qui transfère l'ubiquitine à l'une des enzymes de conjugaison, E2 ; enfin, une ubiquitine ligase (E3, il en existe plusieurs centaines), transfère l'ubiquitine aux substrats spécifiques. Trois protéines accessoires du VIH-1, Vif, Vpu et Vpr sont connues pour détourner trois ubiquitine ligases E3 différentes appartenant à la famille des cullin-RING E3 ligases. La protéine Vif du VIH-1 possède en son centre un motif HCCH liant le zinc et une boîte culline qui permettent le recrutement de la culline 5 (Cul-5), Cul-5 étant capable de lier Rbx-2, une protéine possédant un domaine RING. Vif possède en outre dans sa région carboxy-terminale un motif appelé SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) box qui recrute l'élongine C (Elo-C) qui forme un hétérodimère avec l'élongine B (Elo-B) (*Figure 1, voie B*). Le complexe Cul-5/Rbx2/Elo-B/Elo-C ainsi recruté par la protéine Vif permet l'ubiquitylation d'A-3G/A-3F, orientant ainsi ces protéines vers la dégradation par le protéasome (*Figure 1, voie B*).

#### CBF- $\beta$ : un nouveau ligand de Vif impliqué dans l'infectiosité des VIH/VIS chez les primates

Deux articles publiés récemment dans la revue *Nature* [4, 5] ont identifié un nouveau ligand de Vif impliqué dans la

dégradation d'A-3G, qui fait également l'objet d'une publication récente dans *Journal of Virology* [6]. En effet, Krogan *et al.* [7] ont entrepris l'identification systématique des ligands des protéines du VIH-1, dont Vif, en combinant purification d'affinité et spectrométrie de masse. Chacune des protéines du VIH-1 a été exprimée avec deux étiquettes différentes (*Strep* ou *Flag*) soit par transfection transitoire de cellules humaines d'épithélium rénal embryonnaire (HEK-293), soit par expression stable et inductible à partir de cellules lymphoïdes Jurkat. Les auteurs se sont focalisés sur les protéines identifiées indépendamment du type cellulaire et de l'étiquette utilisée pour la purification [5, 7]. Par cette approche, sept protéines humaines ont été identifiées comme des ligands directs ou indirects de Vif dans les deux types cellulaires : l'une intervient dans l'autophagie (MARA1), cinq sont les constituants de l'ubiquitine ligase E3 (Elo-B, Elo-C, Cul-5, Rbx-2, et Cul-2 qui interagit avec Cul-5) et la dernière est CBF- $\beta$  (*core binding factor- $\beta$* ). Zhang *et al.* [4] ont, quant à eux, employé Vif munie d'une étiquette HA (hémagglutinine) pour immunoprécipiter ses partenaires dans les cellules H9, une lignée cellulaire T. Ils ont ensuite identifié par spectrométrie de masse Cul-5, Elo-B, Elo-C et CBF- $\beta$ . L'interaction entre Vif et CBF- $\beta$  a été validée par des études de colocalisation et de transfert d'énergie de fluorescence (FRET) dans des cellules HEK 293T transfectées [4].



**Figure 1. Mécanismes d'action de Vif.** Vif contrecarre le facteur de restriction A3-G par au moins trois mécanismes distincts : (1) compétition avec A-3G lors de l'assemblage viral (voie A), (2) induction de sa dégradation par le protéasome (voie B), et (3) inhibition de sa traduction (voie C).

CBF- $\beta$  est un cofacteur de transcription impliqué dans le développement et la différenciation de plusieurs types cellulaires, dont les lymphocytes T. Il ne lie pas l'ADN mais interagit avec les protéines de la famille RUNX (*Runt-related transcription factor 1*), dont il module le repliement et les propriétés de fixation à l'ADN (Figure 1). Zhang *et al.* ont déterminé que la région amino-terminale de Vif est cruciale pour sa liaison à CBF- $\beta$  et que cette liaison n'entre pas en compétition avec le recrutement des protéines RUNX dont Vif n'affecte pas l'activité transcriptionnelle [4]. Les deux publications parues dans *Nature* [4, 5] démontrent que CBF- $\beta$  fait partie du complexe E3 ubiquitine ligase comprenant la Cul-5, Rbx2, Elo-C et Elo-B. Cependant, la fixation de CBF- $\beta$  à ce complexe requiert Vif, ce qui indique que CBF- $\beta$  n'est pas un constituant

général des Cul-5 E3 ubiquitine ligases [4, 5]. Vif forme un complexe soluble et monodisperse avec CBF- $\beta$ , Elo-B et Elo-C qui lie A-3G et s'associe à Cul-5/Rbx-2 [5], CBF- $\beta$  facilitant le recrutement de Cul-5 [4]. La réciproque n'est cependant pas vraie : Cul-5 n'influence pas la fixation de CBF- $\beta$  à Vif [4]. En outre, Jäger *et al.* ont démontré que le complexe Cul-5/Rbx-2/Elo-B/Elo-C/Vif/CBF- $\beta$  reconstitué *in vitro* à partir de protéines recombinantes est capable de polyubiquitiner A-3G [5].

Les deux études [4, 5] ont démontré également que lorsque l'expression de CBF- $\beta$  est diminuée par l'utilisation de siARN ou de shARN, la concentration intracellulaire d'A-3G et son incorporation dans les particules virales - nécessaires à son activité de restriction - augmentent, tandis que l'infectiosité du VIH-1 diminue. Comme attendu,

CBF- $\beta$  n'affecte pas l'infectiosité virale en l'absence d'A-3G. L'étude de Hulquist *et al.* étend la portée de ces résultats, puisqu'elle les généralise aux deux isoformes de CBF- $\beta$ , à un grand nombre d'isolats du VIH-1 de sous-types différents et à l'ensemble des cytidines désaminases de la famille APOBEC-3 sensibles à la dégradation induite par Vif (A-3C/3DE/3F/3G/3H) [6]. De façon similaire, CBF- $\beta$  lie la protéine Vif du virus d'immunodéficience des macaques rhésus (VISM<sub>mac</sub>), favorisant la dégradation des APOBEC-3 sensibles à Vif chez cet animal et leur exclusion des particules virales dont elle augmente l'infectiosité [4-6]. Cependant, la dégradation de l'unique protéine APOBEC-3 bovine induite par Vif du virus de l'immunodéficience bovine (VIB) n'est pas affectée par CBF- $\beta$  [4], suggérant que

l'implication de cette protéine dans la dégradation des protéines de la famille APOBEC-3 se limite aux primates.

### Perspectives thérapeutiques antivirales

L'identification d'un facteur humain intervenant spécifiquement dans la dégradation des protéines de la famille APOBEC-3 ouvre la voie à de nouvelles stratégies antivirales dirigées contre les VIH-1 et 2. En effet, des molécules perturbant l'interaction entre Vif et CBF- $\beta$  devraient inhiber la dégradation de ces facteurs de résistance sans perturber la fonction des autres ubiquitine ligases. La mise en évidence du complexe stable et soluble CBF- $\beta$ /Vif/Elo-C/Elo-B et la reconstitution *in vitro* d'un complexe E3 ubiquitine ligase actif [5] permettent d'envisager

le criblage à haut flux d'inhibiteurs ou leur conception rationnelle lorsque la structure cristallographique de ces complexes aura été obtenue. La dégradation d'A-3G par la voie du protéasome n'est pas le seul mécanisme par lequel Vif contrecarre ce facteur de restriction : Vif réduit également l'expression d'A-3G en inhibant sa traduction [8] (Figure 1, voie C) et agit de façon directe pour inhiber son incorporation dans les particules virales, sans doute par compétition [3] (Figure 1, voie A). Ces deux derniers mécanismes restent encore mal connus et pourraient, eux-aussi, déboucher sur de nouvelles stratégies d'inhibition du VIH-1. ♦

**A transcription factor acts as a HIV-1 accomplice to destroy the cellular defences**

### RÉFÉRENCES

1. Strebel K, Luban J, Jeang KT. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med* 2009 ; 7 : 48.
2. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 2011 ; 474 : 654-7.
3. Henriot S, Mercenne G, Bernacchi S, et al. Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009 ; 73 : 211-32.
4. Zhang W, Du J, Evans SL, et al. T-cell differentiation factor CBF-beta regulates HIV-1 Vif-mediated evasion of host restriction. *Nature* 2012 ; 481 : 376-9.
5. Jager S, Kim DY, Hultquist JF, et al. Vif hijacks CBF-beta to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* 2012 ; 481 : 371-5.
6. Hultquist JF, Binka M, LaRue RS, et al. Vif proteins of human and simian immunodeficiency viruses require cellular CBF-beta to degrade APOBEC3 restriction factors. *J Virol* 2012 ; 86 : 2874-7.
7. Jager S, Cimermancic P, Gulbahce N, et al. Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature* 2012 ; 481 : 365-70.
8. Mercenne G, Bernacchi S, Richer D, et al. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res* 2010 ; 38 : 633-46.

### NOUVELLE

## Rôle des fibrilles amyloïdes dans la transmission du VIH

Nadia R. Roan, Marielle Cavrois, Warner C. Greene

Gladstone Institute of Virology and Immunology,  
University of California at San Francisco, San Francisco,  
CA 94158, États-Unis.  
[nroan@gladstone.ucsf.edu](mailto:nroan@gladstone.ucsf.edu)

> Comme en témoignent les 34 millions de personnes infectées en 2010, le VIH/Sida demeure un problème de santé publique majeur [1]. Une grande partie des infections mondiales se concentrent en Afrique sub-saharienne où la transmission lors de rapports hétérosexuels est le mode de propagation le plus courant. Comme cette transmission se produit quasiment toujours en présence de sperme, il est essentiel d'élucider l'effet du sperme sur la transmission du virus.

### Le sperme, un facteur facilitateur de l'infection VIH

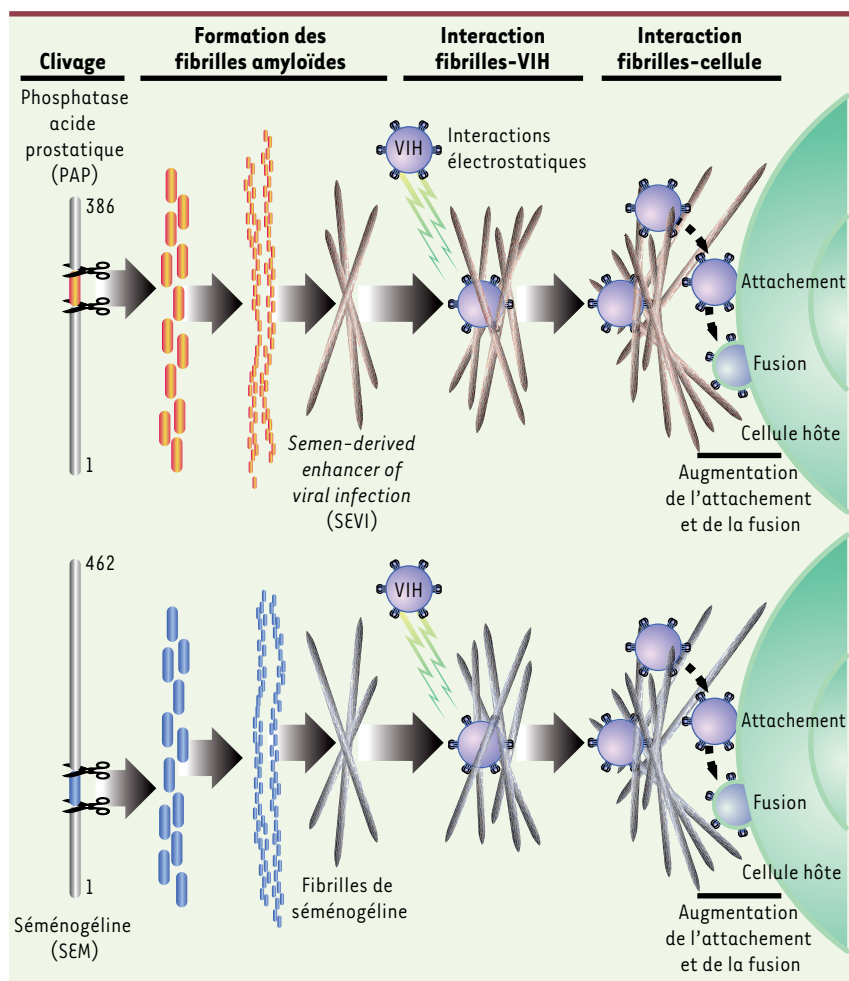
Loin d'être un véhicule passif pour le VIH, le sperme peut grandement augmenter l'infection par le VIH *in vitro*. Plusieurs groupes ont publié que la présence de sperme augmente dramatiquement

l'infection de lignées cellulaires et de cellules primaires par le VIH [2-6]. Quels sont les facteurs présents dans le sperme responsables de cet effet ? Un certain nombre de composants du liquide séminal, dont la fonction physiologique est de protéger les spermatozoïdes lors de leur voyage vers l'ovule, peuvent protéger également les virions. C'est le cas des amines basiques comme la spermine, la spermidine, putrescine, cadavérine, etc., qui évitent la dénaturation des spermatozoïdes dans l'environnement acide de l'appareil vaginal et qui, malheureusement, empêchent aussi l'inactivation du virus [7-9]. D'autres composants du sperme, plus récemment identifiés par Munch et al. forment des fibrilles amyloïdes capables d'augmenter l'infektivité du VIH [2]. Ces fibrilles ont été nommées

SEVI pour *semen-derived enhancer of viral infection*. L'augmentation du pouvoir infectieux du VIH conférée par SEVI est plus marquée lorsque l'inoculum viral est limité, une situation qui semble survenir lors de la transmission du VIH. Des expériences de dilution limite du virus ont montré que les fibrilles de SEVI peuvent augmenter l'infection par un facteur de 100 000 [2]. Une dose de VIH qui serait donc insuffisante pour être infectieuse pourrait devenir, dans ce contexte, hautement infectieuse.

### Les fibrilles amyloïdes du sperme

Les fibrilles amyloïdes sont des polymères de feuillet  $\beta$  et ont été déjà associées à des maladies neurologiques, maladies d'Alzheimer et de Huntington par exemple. SEVI est constitué de



**Figure 1. Facilitation de l'infection VIH par les fibrilles du sperme.** Modèle par lequel des fragments de PAP (en haut) et SEM (en bas) peuvent former des fibrilles amyloïdes qui favorisent l'attachement du VIH aux cellules cibles.

fragments de la phosphatase acide prostatique (PAP), une protéine produite par la prostate et sécrétée dans le sperme. Lors d'études visant à caractériser davantage le SEVI endogène présent dans le sperme, nous avons identifié une seconde substance amyloïde formant des fibrilles qui, elle aussi, améliore considérablement l'infection par le VIH [5]. Ces fibrilles sont dérivées de fragments de la séménogéline (SEM) [10], un des constituants majeurs du coagulum de sperme. Cette observation, publiée l'année dernière dans *Cell Host and Microbe*, suggère que de multiples protéines du sperme humain peuvent former des fibres amyloïdes favorisant l'infection par VIH [5].

SEVI et les fibrilles amyloïdes de SEM partagent de multiples propriétés. Toutes deux sont formées de fragments de protéines abondantes dans le sperme humain. SEVI dérive de la PAP. Les fibrilles SEM dérivent de la SEM qui est produite par les vésicules séminales et sécrétée dans le sperme (Figure 1). PAP et SEM sont présentes dans le sperme à des concentrations de l'ordre de plusieurs milligrammes [11, 12]. SEVI et les fibrilles amyloïdes de SEM partagent également des propriétés biophysiques. En solution aqueuse, le monomère de SEVI et les peptides de SEM s'assemblent spontanément en fibrilles amyloïdes, qui peuvent être révélées par un marquage à la Thioflavine T ou au rouge-Congo,

ou par microscopie électronique [2, 5]. En raison de l'abondance de multiples résidus basiques, SEVI et les fibrilles de SEM sont chargés très positivement. Lorsque leurs charges sont neutralisées par des polymères anioniques, SEVI et les fibrilles SEM perdent leur capacité à augmenter l'infection au VIH des cellules cibles [3, 5]. De plus, le sperme traité avec ces polymères anioniques ou duquel on a éliminé les facteurs chargés positivement, perd lui aussi son activité facilitatrice de l'infection [3, 5]. Ces fibrilles semblent donc favoriser l'infection en diminuant la répulsion électrostatique entre les membranes chargées négativement du virus et de la cellule cible (Figure 1).

### Rôle des fibrilles amyloïdes du sperme dans le pouvoir infectieux du VIH

SEVI et les fibrilles SEM endogènes sont-elles responsables de la capacité du sperme à augmenter l'infection par le VIH ? Deux arguments expérimentaux suggèrent de façon indirecte qu'elles sont responsables au moins en partie de cette activité. D'une part, l'abondance de SEVI et SEM dans le sperme de différents donneurs corrèle avec la capacité relative de ces échantillons de sperme à augmenter l'infection par le VIH [5, 13]. D'autre part, les échantillons de sperme provenant de patients présentant une obstruction du canal éjaculateur sont à la fois moins riches en SEVI et en fibrilles SEM, et sont complètement dépourvus de la capacité à augmenter l'infection par le VIH *in vitro* [5].

Plusieurs questions émergent de l'identification de ces fibrilles amyloïdes favorisant l'infection *in vitro* de cellules par le VIH. À quel moment se forment-elles *in vivo* ? Leur concentration est-elle contrôlée ? Quelle est leur fonction physiologique ? Des fragments de SEM étant détectés dans les vésicules séminales [14], il est possible que les fibrilles de SEM commencent à se former avant l'émission du sperme. Bien que les fibrilles de SEVI et SEM soient dérivées de protéines complètement

différentes, elles possèdent les mêmes propriétés biophysiques. Ceci suggère qu'elles pourraient avoir un rôle naturel commun, par exemple comme aide au processus de reproduction. En effet, la fusion des spermatozoïdes avec les ovocytes ressemble à celle du VIH avec sa cellule cible [15]. Ces fibrilles pourraient donc jouer un rôle fondamental dans la fertilisation de l'ovocyte.

Il reste essentiel d'évaluer *in vivo* dans quelle mesure le sperme et ces fibrilles amyloïdes favorisent la transmission du VIH. Une étude basée sur des modèles de macaques rhésus et de souris humanisées est en cours. Si leur rôle est confirmé dans ces modèles *in vivo*, il deviendrait essentiel que la prochaine génération de microbicides cible non seulement le VIH mais aussi les facteurs du sperme favorisant sa transmission. Des agents de désagrégation des fibrilles [6, 16] ou empêchant leur interaction avec les virus [4] pourraient être utilisés en combinaison avec des inhibiteurs viraux pour former un

microbicide plus efficace pour prévenir la transmission sexuelle du VIH. ♦

### Role of semen-derived amyloid fibrils as facilitators of HIV infection

#### RÉFÉRENCES

- UNAIDS 2011, World AIDS Day Report. [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2011/JC2216\\_WorldAIDS-day\\_report\\_2011\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2011/JC2216_WorldAIDS-day_report_2011_en.pdf)
- Munch J, Rucker E, Standker L, et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 2007 ; 131 : 1059-71.
- Roan NR, Munch J, Arhel N, et al. The cationic properties of SEVI underlie its ability to enhance human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2009 ; 83 : 73-80.
- Roan NR, Sowinski S, Munch J, et al. Aminoquinoline surfen inhibits the action of SEVI (semen-derived enhancer of viral infection). *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 1861-9.
- Roan NR, Muller JA, Liu H, et al. Peptides released by physiological cleavage of semen coagulum proteins form amyloids that enhance HIV infection. *Cell Host & Microbe* 2011 ; 10 : 541-50.
- Olsen JS, Brown C, Capule CC, et al. Amyloid-binding small molecules efficiently block SEVI (semen-derived enhancer of virus infection)- and semen-mediated enhancement of HIV-1 infection. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 35488-96.
- Bouvet JP, Gresenguet G, Belec L. Vaginal pH neutralization by semen as a cofactor of HIV transmission. *Clin Microbiol Infect* 1997 ; 3 : 19-23.
- Tevi-Benissan C, Belec L, Levy M, et al. *In vivo* semen-associated pH neutralization of cervicovaginal secretions. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997 ; 4 : 367-74.
- Gupta K, Klasse PJ. How do viral and host factors modulate the sexual transmission of HIV? Can transmission be blocked? *PLoS Med* 2006 ; 3 : e79.
- McCormack S, Ramjee G, Kamali A, et al. PRO2000 vaginal gel for prevention of HIV-1 infection (microbicides development programme 301): a phase 3, randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet* 2010 ; 376 : 1329-37.
- Yoshida K, Yamasaki T, Yoshiike M, et al. Quantification of seminal plasma motility inhibitor/semenogelin in human seminal plasma. *J Androl* 2003 ; 24 : 878-84.
- Ronnberg L, Vihko P, Sajanti E, Vihko R. Clomiphene citrate administration to normogonadotropic subfertile men: blood hormone changes and activation of acid phosphatase in seminal fluid. *Int J Androl* 1981 ; 4 : 372-8.
- Kim KA, Yolamanova M, Zirafi O, et al. Semen-mediated enhancement of HIV infection is donor-dependent and correlates with the levels of SEVI. *Retrovirology* 2010 ; 7 : 55.
- Linke RP, Joswig R, Murphy CL, et al. Senile seminal vesicle amyloid is derived from semenogelin I. *J Lab Clin Med* 2005 ; 145 : 187-93.
- Doncel GF. Exploiting common targets in human fertilization and HIV infection: development of novel contraceptive microbicides. *Hum Reprod Update* 2006 ; 12 : 103-17.
- Sievers SA, Karanickolas J, Chang HW, et al. Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation. *Nature* 2011 ; 475 : 96-100.

## NOUVELLE

### Migrations collectives de cellules mésenchymateuses Un facteur du complément à la rescousse

Eric Theveneau

University College London, Cell and Developmental Biology Department, London, Royaume-Uni.  
[e.theveneau@free.fr](mailto:e.theveneau@free.fr)

> Les migrations cellulaires sont essentielles au développement embryonnaire, à l'immunité et à la cicatrisation [1], et elles sont au cœur de la dissémination des cellules cancéreuses [2]. Les cellules peuvent s'engager dans des migrations solitaires ou collectives. Ces dernières impliquent une certaine coordination et une coopération des cellules [3, 4]. Jusqu'à présent, les migrations collectives étaient, pensait-on, restreintes aux cellules de type épithélial [4]. Des études récentes, portant sur les cellules de la crête neurale (CCN), remettent en cause

ce modèle. En effet, ces études montrent que des cellules mésenchymateuses, qui n'établissent pas de contacts intercellulaires stables, peuvent aussi s'engager dans des migrations collectives [5-7].

#### Migration collective des cellules de la crête neurale : l'inhibition de contact induit une polarisation utile au guidage

Les CCN sont induites dans la partie dorsale de l'épithélium neural présomptif, à l'interface avec le futur épiderme [8]. Les CCN se séparent du neuroépithélium lors d'une étape de délamination

qui implique une transition épithélium-mésenchyme (TEM), et elles entreprennent ensuite une vaste migration colonisant presque tous les tissus de l'embryon [8]. Une fois leur migration terminée, les CCN se différencient en de multiples dérivés : cellules pigmentaires, cellules gliales et neurones du système nerveux périphérique, cellules osseuses et du cartilage de la face, et cellules endocrines [9]. Lorsque ces cellules passent par une étape de TEM, elles perdent les jonctions intercellulaires qui les lient à leurs voisins. Il semblait donc



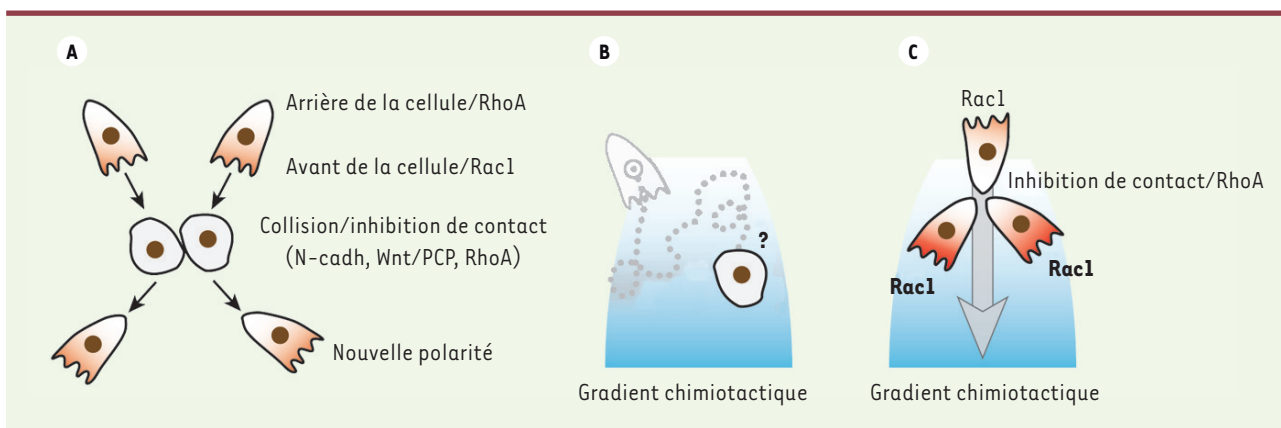
évident que les CCN migraient de façon solitaire, chaque cellule se guidant grâce aux signaux présents le long des voies de migration. Cependant, lorsque deux CCN entrent en contact, elles se polarisent *via* un processus connu sous le nom d'inhibition de contact de locomotion [10]. Brièvement, lorsque les cellules entrent en collision, l'inhibition de contact entraîne la rétraction des structures motrices de la cellule (filopodes, lamellipodes) et un arrêt de migration suivi d'une repolarisation dans la direction opposée au contact (Figure 1A). Ceci favorise la migration des CCN vers des régions où leur densité est moindre. C'est donc une des forces intrinsèques de la migration des CCN. Plus intéressant encore, l'inhibition de contact et les molécules de guidage n'agissent pas en parallèle. Elles s'intègrent toutes deux dans un même processus de guidage collectif. En présence d'un gradient de chimioattractant, par exemple de *Stromal cell-derived factor 1* (SDF1), les CCN isolées peinent à trouver leur chemin alors que les CCN en groupe s'orientent avec succès [5]. Dans ce système, SDF1 est par lui-même incapable de polariser les cellules et n'offre qu'une piètre information de guidage (Figure 1B). Lorsque les CCN sont

présentes en forte densité, elles sont polarisées *via* l'inhibition de contact et les protrusions sont tournées vers l'extérieur (Figure 1C). SDF1 stabilise alors la polarité des cellules en augmentant l'activité de Rac1 (*ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) [5], une petite GTPase nécessaire à la formation et à la stabilité des lamellipodes [1]. La polarité des cellules proches de la source de l'attractant en est renforcée, ce qui favorise la migration du groupe vers cette source (Figure 1C).

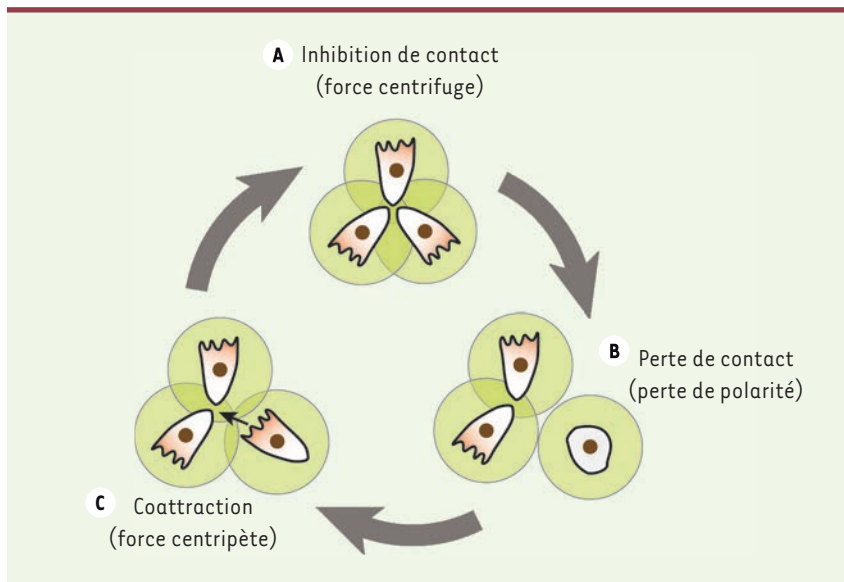
### Le facteur du complément C3a intervient dans le comportement grégaire des CCN

Un tel système ne fonctionne que si les cellules restent à proximité les unes des autres. Or, après avoir effectué leur TEM, les CCN n'ont plus de jonctions cellulaires stables. De plus, l'inhibition de contact favorise leur dispersion, réduisant ainsi progressivement la probabilité d'interactions transitoires entre CCN. Comment peuvent-elles dans ces conditions maintenir une densité cellulaire élevée au cours du temps ? Deux observations suggèrent que les CCN ont tendance à rester en groupe et donc, potentiellement, à détecter la présence d'autres CCN : chez l'embryon

de poulet, on a observé que les cellules CCN qui quittent les flux de migration y reviennent systématiquement [11]. D'autre part, les CCN à l'arrière de la population migratoire continuent de migrer avec le reste du groupe et ce malgré la présence d'un territoire permissif dans la direction opposée. Nous avons analysé récemment les mécanismes potentiels de ce comportement grégaire [6]. Nos travaux montrent que les CCN s'attirent mutuellement et que cet effet est dû au facteur du complément C3a et à son récepteur C3aR, tous deux coexprimés par les CCN. C3a est un élément de la cascade du complément, un acteur clé de la réponse immunitaire et son rôle de chimioattractant dans ce système est bien connu [12]. L'activation de C3a/C3aR dans les CCN favorise la formation de protrusions *via* l'activation de Rac1 [6]. La concentration locale de C3a est plus importante dans les zones où la densité de CCN est forte que dans les zones pauvres en CCN. Par conséquent, les CCN qui s'éloignent du groupe perdent progressivement la polarité que leur confèrent les interactions cellulaires, et sont repolarisées *via* l'action de C3a (Figure 2). Ce système de chimiotactisme paracrine, ou coattraction, permet aux CCN de concilier TEM



**Figure 1. La polarité induite par l'inhibition de contact favorise la dispersion et le guidage des cellules de la crête neurale.** A. Les collisions entre CCN induisent l'inhibition de contact de locomotion dont l'activité dépend de la N-cadhérine (N-cadh) et de la voie Wnt non canonique PCP (*planar cell polarity*). Cette cascade active la petite GTPase RhoA (*Ras homolog gene family member A*) ce qui provoque une rétraction des protrusions et une repolarisation dans la direction opposée. B. Les cellules isolées peinent à s'orienter dans un gradient. C. À forte densité, les CCN présentent une polarité claire avec les protrusions à l'opposé des contacts. L'exposition à un gradient chimiotactique stabilise les protrusions faisant face aux fortes concentrations d'attractant, ce qui induit un mouvement directionnel (flèche).



**Figure 2. Le facteur du complément C3a favorise l'attraction mutuelle des cellules de la crête neurale.** **A.** Groupes de CCN polarisées en fonction de leurs contacts intercellulaires qui favorisent une dispersion. Chaque cellule sécrète C3a (vert). **B.** Les cellules qui se détachent perdent leur polarité. **C.** Les cellules situées à distance se repolarisent vers les fortes concentrations de C3a ce qui provoque un regroupement des cellules.

et densité cellulaire élevée. Ceci a un effet double : s'opposer à la dispersion induite par l'inhibition de contact et promouvoir les collisions entre cellules. En effet, les cellules qui s'éloignent du groupe y sont rapatriées *via* la coattraction. Lorsqu'elles rejoignent le groupe, de nouveaux contacts repolarisent les cellules et le cycle dispersion-regroupement se répète (Figure 2). Ceci explique comment des cellules mésenchymateuses peuvent s'engager dans des migrations collectives à long terme.

### Conclusion

Les migrations collectives sont connues dans les cancers épithéliaux mais pourraient donc aussi se produire dans des tumeurs où un processus de TEM est fréquent. Par ailleurs, certaines tumeurs, telles que les gliomes, expriment des facteurs de croissance et leurs récepteurs

associés [13]. Certaines de ces molécules ayant des effets chimioattractants (PDGF [*platelet derived growth factor*], VEGF [*vascular endothelial growth factor*], FGF [*fibroblast growth factor*]), il est possible que ces tumeurs puissent utiliser ces signaux comme attractants locaux. Ceci favoriserait le maintien d'une densité cellulaire critique qui augmenterait les chances de survie de la tumeur, mais permettrait aussi l'émergence d'un comportement collectif. Enfin, un tel rôle pour un facteur de la cascade du complément à des stades si précoces du développement embryonnaire, avant l'apparition du sang et du système immunitaire, est surprenant. Au-delà de son aspect anecdotique, ce résultat pourrait avoir une conséquence médicale : certains traitements médicaux dont les effets immunosuppresseurs font intervenir la cascade du complément seraient décon-

seillés chez les femmes enceintes et ce dès les premiers stades de la grossesse, donc bien avant l'apparition du système immunitaire. ♦

### Collective migration of mesenchymal cells: a complement factor to the rescue

### REMERCIEMENTS

Je remercie Laure Coulombel pour son invitation à rédiger cette Nouvelle.

### RÉFÉRENCES

- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003 ; 302 : 1704-9.
- Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 2009 ; 9 : 274-84.
- Rorth P. Collective cell migration. *Annu Rev Cell Biol* 2009 ; 25 : 407-29.
- Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009 ; 10 : 445-57.
- Theveneau E, Marchant L, Kuriyama S, et al. Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Dev Cell* 2010 ; 19 : 39-53.
- Carmona-Fontaine C, Theveneau E, Tzekou A, et al. Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration. *Dev Cell* 2011 ; 21 : 1026-37.
- Theveneau E, Mayor R. Can mesenchymal cells undergo collective cell migration? The case of the neural crest. *Cell Adh Migr* 2011 ; 5 : 490-8.
- Theveneau E, Mayor R. Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev Biol* 2012 (sous presse).
- Le Douarin N, Kalcheim C. *The neural crest*. New York : Cambridge University Press, 1999 : 446 p.
- Carmona-Fontaine C, Matthews HK, Kuriyama S, et al. Contact inhibition of locomotion *in vivo* controls neural crest directional migration. *Nature* 2008 ; 456 : 957-61.
- Teddy JM, Kulesa PM. *In vivo* evidence for short- and long-range cell communication in cranial neural crest cells. *Development* 2004 ; 131 : 6141-51.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010 ; 11 : 785-97.
- Hoelzinger DB, Demuth T, Berens ME. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 2007 ; 99 : 1583-93.

## Nectine-4, une protéine clé pour la transmission du virus de la rougeole

Mathieu Mateo<sup>1</sup>, Marc Lopez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of molecular medicine, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota 55902, États-Unis ;

<sup>2</sup> Inserm U1068, centre de recherche en cancérologie de Marseille (CRCM), Institut Paoli-Calmettes, 13009 et université d'Aix-Marseille, 13284 Marseille, France. [marc.lopez@inserm.fr](mailto:marc.lopez@inserm.fr)  
[mateo.mathieu@mayo.edu](mailto:mateo.mathieu@mayo.edu)



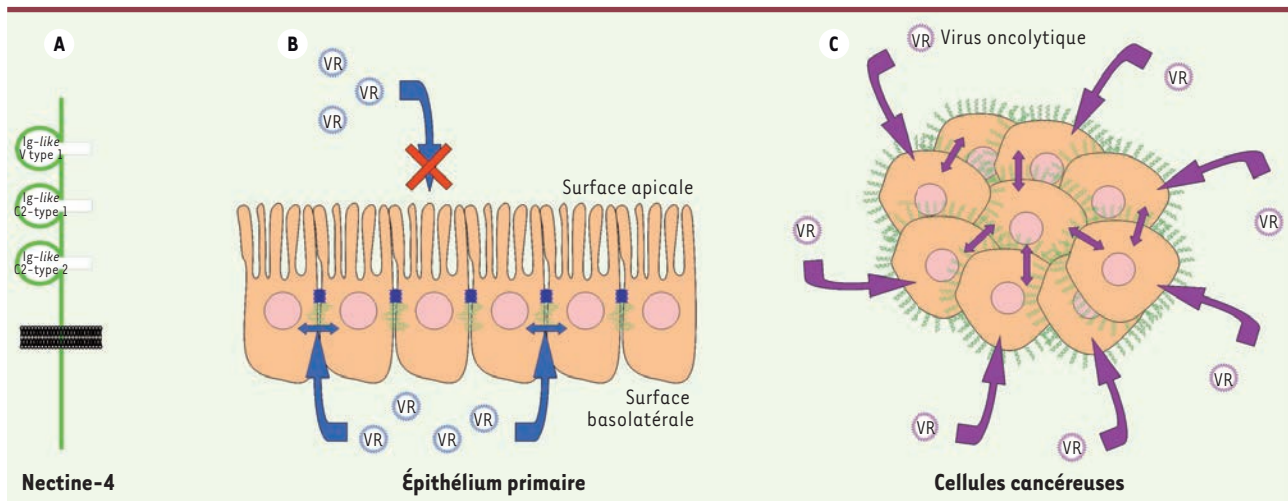
Le virus de la rougeole est un virus hautement contagieux transmis par aérosol. Le récepteur qui permet l'entrée et la propagation du virus dans l'organisme est connu : il s'agit de SLAM (pour *signaling lymphocyte-activation molecule*), une molécule exclusivement exprimée par les cellules du système immunitaire, expliquant le tropisme du virus de la rougeole. Cependant, aux étapes tardives de l'infection, le virus doit se répliquer dans les cellules épithéliales afin de sortir de l'organisme et d'assurer sa transmission. La nature du récepteur épithélial du virus de la rougeole, longtemps restée inconnue, vient d'être élucidée. Il s'agit de la nectine-4, une protéine qui, physiologiquement, est préférentiellement

exprimée au niveau de l'appareil respiratoire, mais l'est aussi à des niveaux élevés dans certains cancers [15]. Cette avancée permet de mieux comprendre la biologie du virus de la rougeole et ouvre aussi de nouvelles perspectives dans le cadre des virothérapies oncolytiques comme deux autres (→ Voir l'éditorial de G. Lemay, page XXX et la synthèse de Y. Touchefeu et al., page XXX de ce numéro [16, 17].

### Les récepteurs du virus de la rougeole

Le premier récepteur du virus de la rougeole identifié a été la protéine CD46/MCP (*membrane cofactor protein*) [1, 2]. CD46 est exprimé de façon ubiquitaire sur toutes les cellules humaines (mais pas

murines) et constitue un récepteur spécifique des souches vaccinales (→) [17]. Les récepteurs SLAM/CD150 [3] et nectine-4 [4, 5] sont (→ Voir la synthèse de Y. Touchefeu et al., page XXX de ce numéro) quant à eux utilisés par les souches vaccinales et sauvages. La protéine SLAM est une protéine de la superfamille des immunoglobulines exprimée spécifiquement sur les cellules activées du système immunitaire [6]. La protéine nectine-4 fait aussi partie de la superfamille des immunoglobulines, comme nous l'avons décrit récemment dans ces colonnes [15] (Figure 1A). Elle est principalement exprimée dans la trachée où elle est un composant des jonctions adhérentes entre les cellules épithéliales [7]. Le



**Figure 1.** La protéine nectine-4 et son interaction avec le virus de la rougeole dans les tissus sains ou cancéreux. **A.** La protéine nectine-4 est une protéine transmembranaire : son ectodomaine est composé de trois domaines Ig (immunoglobuline)-like. **B.** Dans l'épithélium des voies respiratoires, la protéine nectine-4 est exprimée à la surface basolatérale des cellules ciliées où elle participe à la formation des jonctions adhérentes situées sous les jonctions serrées (bleu foncé). Les jonctions serrées empêchent l'accès du virus à nectine-4 par la voie apicale. Seule l'infection par la voie basolatérale est donc possible. La propagation du virus dans ces cellules est assurée de façon latérale, vraisemblablement *via* les jonctions adhérentes. **C.** Dans les cellules cancéreuses où la polarité épithéliale est altérée, la protéine nectine-4 est exprimée sur toute la surface cellulaire. L'accès d'un virus de la rougeole oncolytique au récepteur est donc facilité, ainsi que sa propagation dans les cellules tumorales. VR : virus de la rougeole.



cycle vital du virus de la rougeole repose sur l'utilisation séquentielle des récepteurs SLAM et nectine-4.

### Le cycle vital du virus de la rougeole revisité

Le virus de la rougeole pénètre dans l'organisme au niveau des voies respiratoires. Alors qu'on a longtemps cru que les cellules épithéliales étaient les premières cellules infectées, une étude récente a démontré qu'un virus de la rougeole « aveugle » vis-à-vis de l'épithélium reste pathogénique chez le singe, mais ne peut pas sortir de l'organisme [8]. D'après cette étude, l'infection des cellules épithéliales serait un événement tardif nécessitant l'interaction du virus avec un récepteur exprimé à la surface basolatérale de ces cellules. Il fut par la suite confirmé que les premières cibles de l'infection sont les cellules dendritiques et les macrophages alvéolaires qui « patrouillent » au niveau de l'épithélium et qui s'infectent via le récepteur SLAM [9, 10]. Ces cellules migrent vers les organes lymphoïdes et transmettent l'infection aux lymphocytes exprimant SLAM. Le virus de la rougeole se réplique alors très activement dans les lymphocytes, expliquant l'état d'immunodépression des patients infectés. S'ensuit une virémie qui coïncide avec l'apparition des premiers symptômes. C'est à cette étape du cycle vital que l'on note l'apparition de cellules épithéliales infectées au niveau de la trachée. L'étude publiée par l'équipe du Dr Cattaneo en collaboration avec la nôtre a récemment identifié nectine-4 comme le récepteur du virus de la rougeole au niveau des cellules épithéliales [4]. Comme attendu, ce récepteur est exprimé à la surface basolatérale des cellules épithéliales de l'appareil respiratoire et permet l'émergence du virus dans les voies respiratoires aux étapes tardives de l'infection [4]. Par ailleurs, cette étude montre que le virus de la rougeole possède une forte affinité pour la nectine-4, 4 à 5 fois supérieure à celle du virus pour le récepteur SLAM.

Ainsi, le modèle proposé est le suivant : les cellules immunitaires infectées circulant dans l'organisme peuvent entrer en contact, au niveau de leur surface basolatérale, avec les cellules épithéliales respiratoires et leur transmettre le virus. Le virus se réplique alors dans ces cellules d'où il est relâché à la surface apicale, c'est-à-dire dans la lumière des voies respiratoires (Figure 1B). Ainsi, la toux et les éternuements qui apparaissent aux étapes tardives de l'infection favorisent la dissémination du virus dans l'air qui permet, *in fine*, l'infection d'un nouvel hôte. La protéine nectine-4 est le premier récepteur de virus identifié comme responsable de la dissémination extracorporelle ciblée d'un virus et, donc, du processus de contagion entre individus.

### Nectine-4, une cible pour les virus de la rougeole oncolytiques ?

Outre son rôle dans la formation des jonctions adhérentes au sein de l'épithélium respiratoire, la protéine nectine-4 est exprimée à des niveaux anormalement élevés dans certains types de cancer. C'est notamment le cas dans les cancers du sein, de l'ovaire et du poumon [11-13]. Une autre étude ayant identifié la nectine-4 comme récepteur épithélial de la rougeole a également suggéré que cette protéine pourrait en plus être un marqueur du cancer du côlon [5]. Or, la souche vaccinale du virus de la rougeole est actuellement utilisée comme virus oncolytique dans des essais cliniques visant à traiter des cancers de l'ovaire [14, 17]. Les propriétés oncolytiques de ce virus ont été attribuées à sa capacité à infecter les cellules tumorales via CD46. En effet, tout comme la nectine-4, CD46 est exprimée à des niveaux élevés dans les cellules issues d'adénocarcinomes de l'ovaire. Les essais cliniques n'ont toutefois pas démontré de corrélation entre l'effet oncolytique du virus et le niveau d'expression de CD46 dans les tumeurs de patientes. De ce fait, il semble nécessaire de tester *a posteriori* le rôle de nectine-4 dans l'efficacité

oncolytique. Nectine-4 pourrait être le récepteur majeur favorisant la propagation virale dans les tumeurs. De plus, la souche vaccinale du virus de la rougeole pourrait *a priori* constituer un outil de thérapie efficace pour le traitement d'autres cancers exprimant des niveaux élevés de protéine nectine-4. Dans les cellules épithéliales primaires polarisées, l'expression de nectine-4 est limitée aux jonctions adhérentes situées à la surface basolatérale. Dans les tumeurs d'origine épithéliale, caractérisées par une perte plus ou moins importante de polarité, l'expression de nectine-4 n'est de fait plus restreinte aux jonctions adhérentes, ce qui la rend plus accessible aux virus oncolytiques (Figure 1C). ♦

### Nectin-4, a key factor for measles virus host exit

#### RÉFÉRENCES

1. Dörig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 1993 ; 75 : 295-305.
2. Naniiche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, et al. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 1993 ; 67 : 6025-32.
3. Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 2000 ; 406 : 893-7.
4. Mühlebach MD, Mateo M, Sinn PL, et al. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 2011 ; 480 : 530-3.
5. Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, et al. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog* 2011 ; 7 : e1002240.
6. Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, et al. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 1995 ; 376 : 260-3.
7. Reymond N, Fabre S, Lecocq E, et al. Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 43205-15.
8. Leonard VH, Sinn PL, Hodge G, et al. Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 2448-58.
9. Ferreira CS, Frenzke M, Leonard VH, et al. Measles virus infection of alveolar macrophages and dendritic cells precedes spread to lymphatic organs in transgenic mice expressing human signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CD150). *J Virol* 2010 ; 84 : 3033-42.
10. Lemon K, de Vries RD, Mesman AW, et al. Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS Pathog* 2011 ; 7 : e1001263.
11. Derycke MS, Pambuccian SE, Gilks CB, et al. Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. *Am J Clin Pathol* 2010 ; 134 : 835-45.



12. Fabre-Lafay S, Monville F, Garrido-Urbani S, et al. Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer. *BMC Cancer* 2007 ; 7 : 73.
13. Takano A, Ishikawa N, Nishino R, et al. Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 6694-703.
14. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, et al. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res* 2010 ; 70 : 875-82.
15. Fournier G, Garrido-Urbani S, Reymond N, Lopez M. Nectines et nectines-like : marqueurs, acteurs et cibles de l'oncogénèse. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 273-9.
16. Lemay G. Apprivoiser nos ennemis pour en faire des alliés : la « virothérapie » anticancéreuse. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : ???.
17. Touchefeu Y, Schick U, Harrington KJ. Le virus de la rougeole : un futur traitement en cancérologie ? *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : ???.

## NOUVELLE

## Transfert nucléaire chez l'homme

### Difficile reprogrammation sept ans après le clonage

Laure Coulombel

#### Quinze ans après Dolly et Marguerite

Quatorze ans se sont écoulés depuis la naissance de la brebis Dolly en 1997 [1] et de la vache Marguerite en 1998 à l'Inra, deux mammifères « clonés », c'est-à-dire nés du transfert d'une cellule somatique dans un ovocyte énucléé, dont on a ensuite déclenché les premières divisions embryonnaires. Dolly et Marguerite vécut longtemps et eurent beaucoup d'enfants. Quelques années plus tard étaient obtenues des lignées de cellules souches embryonnaires (CSE) à partir de blastocystes établis par transfert nucléaire (nt) chez la souris [2] - et plus récemment chez des primates non humains [3]. Si aucun obstacle insurmontable ne s'oppose en théorie à la reprogrammation de noyaux somatiques humains par l'environnement de l'ovocyte, ces recherches sont non seulement techniquement très difficiles, mais surtout elles se heurtent aux questions éthiques que soulève la collecte d'ovocytes humains - le « clonage » de Woo Suk Hwang est encore dans toutes les mémoires [4] - et, dans de nombreux pays dont la France, à l'interdiction réglementaire de cette technique de transfert nucléaire. Les données publiées sont donc très rares, et ne concernent que le développement jusqu'au stade blastocyste d'un

ovocyte énucléé dans lequel un noyau somatique a été transféré [5-7], mais aucune lignée de cellules ntCSE n'en a été dérivée.

L'intérêt même du transfert nucléaire est mis en doute depuis la découverte retentissante par S. Yamanaka que l'expression transitoire de trois ou quatre facteurs de transcription dont Oct4 permet de reprogrammer (presque) n'importe quelle cellule somatique en une cellule souche pluripotente. Le père de Dolly, Ian Wilmut, avait même proclamé, dans une interview à la BBC en novembre 2007 qui avait fait grand bruit, que le transfert nucléaire n'avait plus aucun intérêt. La reprogrammation par transfert nucléaire est pourtant un exemple plus abouti de reprogrammation que les iPS, puisqu'elle aboutit à un zygote totipotent. Les iPS, comme les cellules ES, étant « seulement » pluripotentes, et incapables - si elles ne sont pas insérées dans un blastocyste hôte [8] - de se développer en un embryon. Ces ntCSE permettraient donc peut-être d'explorer les mécanismes très précoces du développement embryonnaire, ce d'autant que la pluripotence des CSE humaines est probablement assez limitée [8] (*California institute for regeneration medicine*), et pourraient être moins

médecine/sciences, 2, rue d'Alésia, 75014 Paris, France.

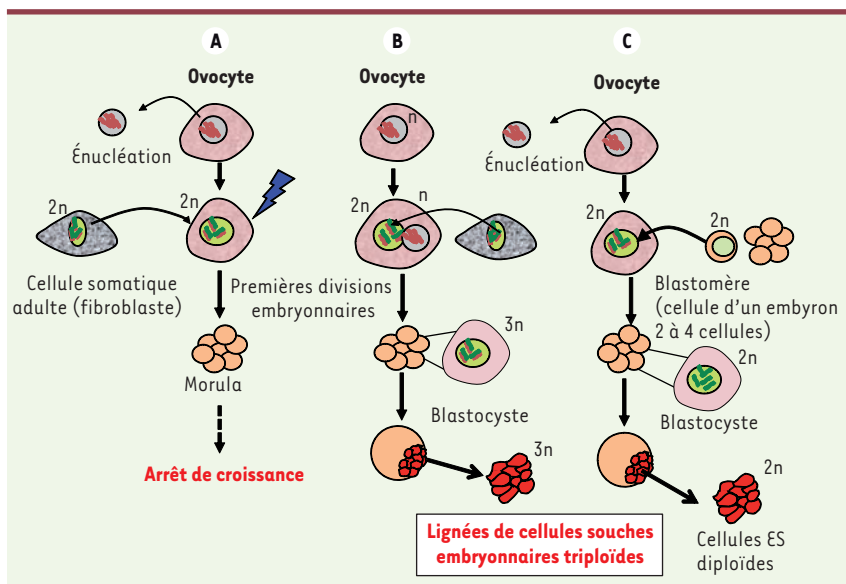
[laure.coulombel@inserm.fr](mailto:laure.coulombel@inserm.fr)

« instables » que les iPS. Ces arguments ont été développés par des scientifiques du CIRM (→) dans un article paru dans *Nature Biotechnology* en août 2011 [9], qui prônait la poursuite de ces recherches.

(→) Voir Nouvelle, page XXX de ce numéro

#### Échec de reprogrammation par transfert nucléaire chez l'homme

Or, deux mois plus tard, en octobre 2011, une équipe new yorkaise publie dans *Nature* [10] la première étude analysant en détail les événements induits par le transfert d'un noyau somatique humain dans un ovocyte humain. La force de ce travail vient du grand nombre d'ovocytes utilisés (n = 270) assurant la reproductibilité des observations [10]. Le débat éthique sur les conditions d'obtention de ces ovocytes est d'ailleurs ouvert par les auteurs dans un article séparé publié dans *Cell Stem Cell* [11] (*voir plus loin*). Les auteurs ont utilisé les conditions classiques du transfert nucléaire : fusion de la cellule fibroblastique (en l'injectant sous la membrane pellucide) avec un ovocyte au stade de métaphase II préalablement énucléé, migration du noyau dans l'ovocyte, activation artificielle de l'ovocyte par ionomycine. Les fibroblastes prove-



**Figure 1. Schéma du protocole expérimental de transfert nucléaire dans des ovocytes humains.**

**A.** Un noyau somatique ( $2n$ ) d'un fibroblaste est inséré dans un ovocyte énucléé. Une activation de l'ovocyte (éclair bleu) déclenche les divisions de clivage de l'embryon. Mais le développement de l'embryon ne dépasse pas le stade de morula. **B.** Contrairement à la procédure suivie en **A**, le noyau de l'ovocyte (haploïde,  $n$ ) est laissé en place. Le reste du protocole est identique à **A**. Dans ce cas, le développement de l'embryon atteint le stade de blastocyste, et la masse interne peut être prélevée et cultivée. Deux lignées de cellules souches embryonnaires en seront dérivées. Le noyau de ces lignées a un génome tripléide ( $2n$  venant du noyau somatique et  $n$  du noyau de l'ovocyte). **C.** Même procédure qu'en **A**, mais le noyau transféré provient d'un embryon (blastomère) et non pas d'une cellule somatique. Dans ces conditions, le développement embryonnaire se fait normalement, et on peut dériver avec succès des lignées de cellules souches embryonnaires diploïdes ( $2n$ ).

naient ici de deux hommes adultes, un individu normal et un patient diabétique. Tous les ovocytes énucléés et fusionnés avec un fibroblaste puis activés ( $n = 31$ ) déclenchent bien la première division de clivage mais le développement s'arrête systématiquement au stade 6-10 cellules, et n'aboutit jamais à un blastocyste (Figure 1A). Cet échec n'est pas imputable à la technique d'énucléation ou de transfert *per se*, mais en partie à l'âge du noyau. En effet, ce blocage de croissance n'existe pas si le noyau transféré est celui d'une cellule embryonnaire, par exemple un noyau de blastomère<sup>1</sup> (Figure 1C) ou de CSE, comme cela avait été montré

précédemment. D'autre part, 76 % des ovocytes contrôles fécondés *in vitro* par un gamète mâle (16/21), et 25 % des 52 ovocytes activés artificiellement sans énucléation (déclenchant un processus de parthénogenèse) se développent en une morula compactée puis en un blastocyste. Que se passe-t-il donc lorsqu'un noyau somatique adulte est substitué au noyau de l'ovocyte ? Ce noyau n'est pas reprogrammé, et est transcriptionnellement « inactif » : au jour 3, il n'exprime ni les gènes spécifiques de son programme antérieur, ni ceux caractéristiques d'un zygote transcriptionnellement actif. Les auteurs montrent que pour déclencher la reprogrammation du noyau de fibroblaste adulte, la présence du génome de l'ovocyte (donc du noyau haploïde) est nécessaire. La démonstration est

faite en fusionnant le fibroblaste avec un ovocyte qui n'a pas été énucléé : dans ce cas, les embryons (tripléides car leur noyau contient le génome somatique diploïde et le génome haploïde de l'ovocyte) atteignent le stade blastocyste dans 21 % des cas (13/63 ovocytes) (Figure 1B). De la masse interne de ces blastocystes tripléides, les auteurs ont dérivé 2 lignées de cellules ES (une dérivant des noyaux fibroblastiques du patient diabétique et l'autre de l'individu normal). Ces CSE, amplifiées pendant plus de 100 doublements de population en 6 mois, sont également tripléides, et leur génome mitochondrial est d'origine exclusivement ovocytaire. Des anomalies chromosomiques sont détectées dans une des deux lignées de CSE. Ces anomalies touchent les chromosomes 12 et 17 classiquement atteints aussi dans les CSE issues de blastocystes pré-implantatoires « classiques ». Le profil transcriptomique de ces lignées ntCSE est proche de celui d'autres cellules pluripotentes : lignées de CSE humaines de référence, ou lignées de CSE issues d'embryons parthénogénétiques, ou iPS issues de la reprogrammation des fibroblastes des deux individus dont les noyaux ont été transférés dans les ovocytes. Une prouesse technique basée sur le calcul du rapport (dans l'ADN génomique ou ADNc) des SNP (*single nucleotide polymorphisms*) exprimés par les allèles somatiques ( $\times 2$ ) ou ovocytaire ( $\times 1$ ) permet aux auteurs de distinguer les transcrits d'origine somatique ou ovocytaire dans cet hybride, et apporte la preuve de la reprogrammation du noyau somatique. Une observation importante, qui devra être confirmée, est que la reprogrammation serait « complète », sans qu'il n'y ait trace de « mémoire épigénétique » du fibroblaste d'origine dans le noyau somatique reprogrammé. Cette observation fragmentaire ne permet pas à elle seule d'affirmer que ces cellules ntCSE ont un degré de reprogrammation plus complet que celui des iPS

<sup>1</sup> On désigne par ce terme les cellules des premières divisions embryonnaires qui, en théorie, sont équivalentes et totipotentes.



issus des mêmes fibroblastes de peau, mais la question mérite d'être posée.

Il est difficile de prédire si ce type de recherches va ou non se poursuivre : indépendamment des difficiles questions éthiques que soulève la question du don d'ovocytes, l'intérêt scientifique est certain : l'identification des facteurs clés produits par l'ovocyte et les cellules embryonnaires précoces qui sont requis pour la reprogrammation permettrait de définir des conditions de transfert nucléaire efficace en l'absence du génome ovocytaire. Il s'agit probablement de facteurs de transcription maternels présents dans l'œuf non fécondé et le zygote. Le facteur Glis1, récemment identifié comme facilitant la reprogrammation des iPS, est un bon candidat [12].

### Des questions éthiques difficiles, une recherche controversée

Dans un article publié simultanément dans *Cell Stem Cell* [11], les auteurs de l'article de *Nature* discutent le point éthique très délicat du don d'ovocytes à visée de recherche. Une autre prise de position est également publiée, celle de I. Hyun, ancien président du sous-comité de l'ISSCR (*international society for stem cell research*) pour l'utilisation d'éléments du corps humain [13]. Les auteurs posent très clairement le problème de la rétribution des femmes donnant des ovocytes dans le cadre d'un programme de recherche, arguant que ces recherches ne pourront pas être poursuivies si les femmes ne sont pas rétribuées, compte tenu des inconvénients liés à la procédure de recueil. Dans leur article de *Nature*, les auteurs de l'article expliquent en détail leur démarche : 16 femmes parmi les 252 qui ont participé à un programme de don d'ovocytes initialement dans un objectif de reproduction ont été sélectionnées sur des critères très précis. Toutes ont été dédommagées quelle que soit la destination du don, reproduction ou recherche, et la possibilité d'un don à

la recherche n'était jamais proposée d'emblée.

Cette étude a été faite aux États-Unis, pays dans lequel la procédure du don d'ovocytes dans le cadre d'une procédure d'AMP (assistance médicale à la procréation) s'accompagne du versement d'une somme (5 à 8 000 \$) en dédommagement des frais occasionnés, somme qui n'est considérée ni comme un paiement des ovocytes eux-mêmes, ni comme incitant les femmes à prendre des risques. En revanche, si le don d'ovocytes est destiné uniquement à un protocole de recherche, la rétribution des femmes n'est pas autorisée par les bonnes pratiques édictées par *the US National Academy of Science* (NAS) ou par le *California Institute for Regenerative Medicine* (CIRM), et les chercheurs américains financés par l'état fédéral ou le CIRM ne pourront pas utiliser les lignées dérivées par Noggle *et al.* [10]. Au contraire, l'ASRM (*american society for reproductive medicine*) recommande ce dédommagement que le prélèvement se fasse dans un but reproductif ou de recherche. Le nouveau directeur du CIRM, Alan Trounson - le père du premier bébé « éprouvette » australien - semblerait, lui aussi, adopter une position plus souple que l'attitude initiale prônée par cet institut. Au Royaume-Uni, la HFEA<sup>2</sup> dans un communiqué en date d'octobre 2011 vient de modifier les conditions de dédommagement des femmes donnant des ovocytes, qui reçoivent désormais une somme de 750 £ au lieu de 250 £ précédemment. Cette modification a été approuvée par le *Nuffield Council of Bioethics*, celui-ci allant plus loin dans son rapport et prônant une compensation pour les donneuses d'ovocytes à visée de recherches. Quant à l'ISSCR<sup>3</sup> (un organisme international qui se veut l'expression de la communauté scientifique), ses recommandations n'approuvent ni d'interdisent explicitement cette rétribution, mais remarquent

que les considérations financières ne doivent pas être une incitation au don, ni le paiement fonction du nombre ou de la qualité des ovocytes. En France, le don d'ovocytes comme tous les dons d'éléments du corps humain est encadré par la loi de bioéthique ; celle-ci (révisée en 2011) interdit toute rémunération en contrepartie du don d'ovocytes, les donneuses bénéficiant de la prise en charge des frais occasionnés par le don. Le transfert nucléaire, comme la création d'embryons à visée de recherches, sont interdits par la loi de bioéthique. ♦

### Nuclear transfer at the man

#### CONFLITS D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Wilmut I, Schnieke A, McWhir E, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997 ; 385 : 810-3.
2. Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, *et al.* Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 2001 ; 292 : 740-3.
3. Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, *et al.* Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007 ; 450 : 497-502.
4. Chneiweiss H. Cloninggate ? La publication scientifique et le clonage thérapeutique face à la mystification Hwang. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 218-22.
5. French AJ, Adams CA, Anderson LS, *et al.* Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* 2008 ; 26 : 485-93.
6. Hall VJ, Compton D, Stojkovic P, *et al.* Developmental competence of human *in vitro* aged oocytes as host cells for nuclear transfer. *Hum Reprod* 2007 ; 22 : 52-62.
7. Fan Y, Jiang Y, Chen X, *et al.* Derivation of cloned human blastocysts by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer with  $\beta$ -thalassemia fibroblasts. *Stem Cells Dev* 2011 ; 20 : 1951-9.
8. Coulombel L. Pluripotence : une définition à géométrie variable. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 798-801.
9. Grieshammer U, Shepard KA, Nigh EA, Trounson A. Finding the niche for human somatic cell nuclear transfer? *Nat Biotech* 2011 ; 29 : 701-5.
10. Noggle S, Fung HL, Gore A, *et al.* Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature* 2011 ; 478 : 70-5.
11. Egli D, Chen AE, Saphier G, *et al.* Impracticality of egg donor recruitment in the absence of compensation. *Cell Stem Cell* 2011 ; 9 : 293-4.
12. Maekawa M, Yamaguchi K, Nakamura T, *et al.* Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* 2011 ; 474 : 225-9.
13. Hyun I. Moving human SCNT research forward ethically. *Cell Stem Cell* 2011 ; 9 : 295-7.

<sup>2</sup> Human fertilization embryology authority.

<sup>3</sup> International society for stem cell research.

## Quel prix à payer pour notre gros cerveau ?

### Remise en cause de « la théorie des tissus coûteux »

Ana F. Navarrete

Anthropologisches Institut und Museum, Universität  
Zürich-Irchel, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zurich, Suisse.  
[a.navarrete@aim.uzh.ch](mailto:a.navarrete@aim.uzh.ch)

> Le cerveau est un organe dont le fonctionnement est très coûteux sur le plan énergétique, et qui, contrairement à d'autres tissus, ne peut, même pour un temps très court, se passer d'apports nutritifs [1]. Le cerveau humain, par exemple, ne représente que 2 % du poids du corps, mais est à lui seul responsable de 20 % de la dépense énergétique chez un adulte et de plus de 60 % chez un nouveau-né [2]. Comment l'organisme a-t-il trouvé le surplus d'énergie nécessaire à l'augmentation de la taille du cerveau au cours de l'évolution [1] ? *The expensive tissue hypothesis* – ou « théorie des tissus coûteux » – proposée par Aiello et Wheeler en 1995 est un des concepts les plus fréquemment avancés pour expliquer ce processus [3].

#### Faut-il réduire la taille du tube digestif pour permettre la croissance du cerveau ?

Cette « théorie des tissus coûteux » avait pour objectif de proposer une explication à l'expansion particulièrement impressionnante du cerveau dans le lignage humain par comparaison aux autres mammifères. Elle stipulait que face à un taux de base constant du métabolisme corporel, l'énergie nécessaire à l'élargissement du cerveau humain devait nécessairement se faire aux dépens d'un allègement de la dépense énergétique (et de la taille) d'autres organes. Mais encore fallait-il que cette réduction ne mette pas en péril la fonction de ces organes. Selon Aiello et

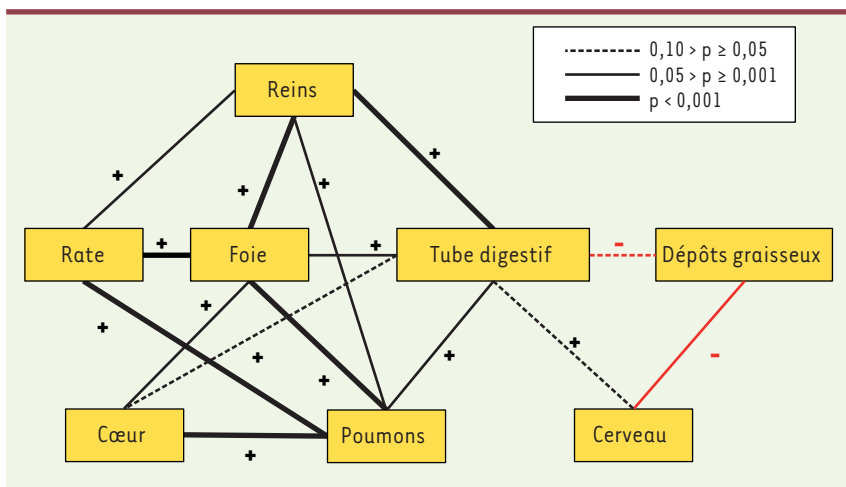
Wheeler [3], un seul organe pouvait supporter ces contraintes : le tube digestif. Il était en effet concevable qu'un régime de meilleure qualité (consommation de viande, de racines, cuisson des aliments) puisse permettre une réduction de la masse du tube digestif, épargnant ainsi de l'énergie qui pourrait être dépensée pour le développement du cerveau. À l'appui de leur hypothèse, les auteurs établirent chez 18 primates anthropoïdes (singes, grands singes et hommes) dont *homo sapiens*, l'existence d'une corrélation négative entre la masse du cerveau et celle du tube digestif. Pourtant, dans un article ultérieur [4], Aiello revenait sur ses conclusions car les données morphologiques qui avaient servi à vérifier l'hypothèse étaient entachées d'imprécisions : en effet, elles ne provenaient pas d'une seule source puisqu'il s'agissait d'une compilation de données morphologiques collectées avec des méthodologies très diverses. Quoiqu'il en soit, la « théorie des tissus coûteux » a été adoptée car elle était séduisante intuitivement, et les études qui ont tenté par la suite d'en tester la validité dans d'autres groupes de mammifères se sont heurtées au manque de données morphologiques solides.

#### La « théorie des tissus coûteux » est contestable

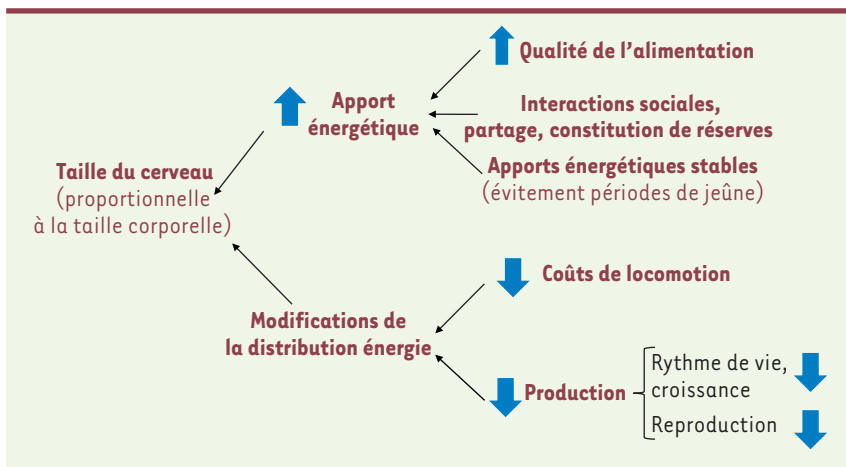
Dans une étude récemment publiée dans *Nature* [5], nous avons évalué cette « théorie des tissus coûteux » chez les mammifères dont les primates, avec une méthodologie rigoureuse. Dans ce but, nous avons accumulé de nouvelles données morphologiques directement à partir

de dissections. Au cours de celles-ci, nous avons analysé huit organes (cerveau, poumons, cœur, reins, rate, foie, estomac et intestin) et le tissu adipeux. Nous avons travaillé sur 100 espèces de mammifères, au sein desquelles nous avons isolé un échantillon de 23 espèces de primates. Nous avons analysé la corrélation entre le cerveau et les autres organes en utilisant des analyses phylogénétiques et en tenant compte de la masse corporelle indépendamment du tissu adipeux. Nous n'avons pas tenu compte du tissu graisseux dans notre appréciation de la taille du corps, contrairement à ce qui est fait habituellement, afin de minimiser les variations importantes dues aux dépôts adipeux. Contrairement aux prédictions de la « théorie des tissus coûteux », nous n'avons pas trouvé de corrélation négative entre la masse du cerveau et celle du tube digestif, que ce soit chez les mammifères en général ou dans le sous-groupe de primates (*Figure 1*). De plus, une telle corrélation négative n'existait pas non plus entre la masse du cerveau et celle des autres tissus « énergivores » ou entre la masse du cerveau et la somme des masses de ces tissus viscéraux. Nos résultats contredisent donc *the expensive tissue hypothesis* qui veut que l'expansion du cerveau se soit faite aux dépens de celle du tube digestif. Nous proposons que ce « troc » se fasse plutôt entre le cerveau et le tissu adipeux : en effet, lors de notre recherche de corrélations entre le cerveau et d'autres tissus moins énergivores mais plus abondants, nous avons observé une relation inverse entre la masse du cerveau et celle du

Traduction de l'anglais par Laure Coulombel. Merci à Thibaud Gruber de sa relecture.



**Figure 1. Corrélations entre les masses des viscères, du cerveau et des dépôts de tissu adipeux chez les mammifères.** La seule corrélation négative qui existe avec la masse du cerveau est celle des dépôts adipeux (trait rouge), alors que la masse de tous les organes viscéraux a tendance à être corrélée positivement (adapté de [5]).



**Figure 2. The expensive brain framework.** L'expansion du cerveau est possible à condition que l'apport énergétique soit stabilisé ou que la dépense énergétique dévolue à d'autres fonctions soit réduite (adapté de [5]).

tissu adipeux chez les mammifères mais pas chez les primates. Toutefois, il est possible que l'absence de corrélation négative chez ces derniers soit due au fait que nos spécimens provenaient tous d'individus maintenus en captivité.

### Cerveau et tissu adipeux : rivaux ou compères ?

Si le tissu adipeux est « bon marché » sur le plan métabolique, il peut malgré tout avoir un coût parce qu'il accroît le poids du corps. De fait, cette entrave à la locomotion peut aggraver le risque de

prédation et ses conséquences fatales. *A contrario*, des réserves graisseuses peuvent être bénéfiques en cas de jeûne. Un cerveau très développé pourrait aussi s'avérer bénéfique en cas de jeûne : on peut imaginer qu'il offre à l'individu les facultés cognitives qui lui permettraient de trouver de nouvelles ressources alimentaires et donc de combattre la disette. Ces deux tissus, cerveau et tissu adipeux, pourraient donc agir de façon complémentaire pour diminuer les conséquences d'une baisse des apports nutritifs. Deux cas de figures se présentent chez les

mammifères (notre étude ne s'applique qu'à cette espèce) : chez les animaux qui se déplacent en grimpant ou en volant, ce qui implique une dépense énergétique importante en cas de poids corporel élevé, la corrélation inverse cerveau - tissu adipeux se vérifiera. Chez les mammifères aquatiques ou les grands bipèdes, dont les humains, le coût de déplacement est faible comparativement ; ces espèces mammifères pourraient à la fois profiter de l'intelligence que procure un cerveau de taille importante et d'une accumulation de graisse.

### Le consensus actuel : the expensive brain framework ou le « paradigme du cerveau coûteux »

Ces résultats récents ont contribué à mieux appréhender la question du « coût » de l'évolution du cerveau. Ils ont permis, au même titre que d'autres données récentes sur les autres facteurs influençant l'encéphalisation, de construire un schéma général de l'évolution de la taille du cerveau chez les mammifères. Ce schéma général - que plusieurs études comparatives ont contribué à façonner - a été proposé il y a quelques années sous le terme de *expensive brain framework* que l'on peut traduire par le « paradigme du cerveau coûteux » [6] (Figure 2). Ce cadre propose deux voies - non mutuellement exclusives - qui auraient facilité l'expansion du cerveau à partir d'un stade ancestral : apport énergétique additionnel et détournement de sources d'énergie venant d'autres fonctions. Ajouter ou stabiliser l'énergie disponible pour le cerveau peut se faire via l'accroissement du métabolisme ou la réduction de la variation des apports énergétiques. Celle-ci peut être obtenue via l'amélioration du régime, le développement des interactions sociales et la réduction des fluctuations des apports énergétiques (utilisation d'outils, d'instruments de cuisine, etc.). Dans la lignée *Homo*, la consommation de viande cuite a pu y contribuer significativement. Dans l'espèce humaine, la prise de

repas en commun, le partage de nourriture, l'accumulation de provisions ont certainement facilité la constance de l'apport énergétique, en particulier celui des femmes en âge de procréer et de leurs petits très dépendants, favorisant l'élargissement du cerveau. Enfin, les capacités cognitives qu'offre ce « gros » cerveau ont permis de réduire les fluctuations dans l'apport d'énergie au cours du temps et notamment durant les saisons où cet apport est limité, comme le font également d'autres primates et les oiseaux.

La seconde voie consiste à réduire l'énergie dévolue à d'autres fonctions énergivores. Si ceci ne s'applique pas à d'autres organes comme le suggérerait *the expensive tissue hypothesis* que nous avons remise en cause, en revanche la contribution de la locomotion a été importante. L'acquisition de moyens de déplacement plus efficaces, comme le bipédisme, a certainement contribué à l'expansion du cerveau, du moins dans le cas de l'espèce humaine. Ce nouveau mode de locomotion est

moins gourmand en énergie que celui des quadrupèdes ou des animaux grimpants, et réduit les conséquences d'une augmentation du poids du corps que provoquent les dépôts de graisse. L'acquisition d'un cerveau de taille importante a pu aussi être favorisée par une réduction des coûts de production, non seulement lors du processus de reproduction, mais aussi en raison de la diminution du rythme de nos vies. Cela n'a pas empêché l'accroissement du taux des naissances dans nos espèces, certainement influencé par le rôle qu'y joue l'assistance des membres de la famille lors des naissances et le partage des ressources.

Nous proposons que, dans notre espèce, la qualité accrue de notre régime alimentaire, mais aussi les interactions sociales - le partage des ressources et l'assistance notamment aux femelles -, l'importance des fonctions cognitives permettant de surmonter les conditions défavorables, une sédentarité accrue et une diminution de l'énergie allouée à la production, ont contribué ensemble

au développement extraordinaire du cerveau. ♦

### The expensive tissue hypothesis revisited

#### REMERCIEMENTS

Je remercie Laure Coulombel d'avoir manifesté un si grand intérêt pour nos travaux et d'avoir assuré la traduction française de notre article.

#### CONFLIT D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Mink JW, Blumenschine RJ, Adams DB. Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *Am J Physiol* 1981 ; 241 ; R203-12.
2. Holliday MA. *Human growth: a comprehensive treatise*, vol. 2. In : Falkner F, Tanner JM, eds. New York : Plenum Press, 1986 : 101-7.
3. Aiello LC, Wheeler P. The expensive-tissue hypothesis: the brain and the digestive-system in human and primate evolution. *Curr Anthropol* 1995 ; 36 : 199-221.
4. Aiello LC, Bates N, Joffe T. *Evolutionary anatomy of the primate cerebral cortex*. In : Falk D, Gibson KR, eds. Cambridge : Cambridge University Press, 2001 : 57-78.
5. Navarrete A, van Schaik CP, Isler K. Energetics and the evolution of human brain size. *Nature* 2011 ; 480 : 91-3.
6. Isler K, van Schaik CP. The expensive brain: a framework for explaining evolutionary changes in brain size. *J Hum Evol* 2009 ; 57 : 392-400.

## NOUVELLE

### Contribution de cellules ES au chimérisme post-natal Échec chez le singe

Laure Coulombel

médecine/sciences, 2, rue d'Alésia,  
75014 Paris, France.  
[laure.coulombel@inserm.fr](mailto:laure.coulombel@inserm.fr)

> Classiquement, une définition stricte de la pluripotence d'une cellule implique qu'elle puisse contribuer *in vivo* à des chimères post-natales. Cela signifie que des cellules greffées dans un embryon préimplantatoire hôte ensuite transféré dans l'utérus d'une femelle pseudogestante, contribueront - au même titre que les cellules endogènes de l'embryon-hôte - aux tissus des animaux qui naîtront, y compris à la lignée germinale [1]. On sait depuis longtemps que les cellules souches embryonnaires (CSE) dérivées de

la masse interne de blastocystes de souris - et maintenant de rats comme nous l'écrivait récemment M. Cohen-Tannoudji [2] - ont cette capacité, qui caractérise aussi les cellules iPS (*induced pluripotent stem cells*) [1, 3]. CSE et iPS sont aussi capables de former à elles seules des embryons viables, par complémentarité tétraploïde, comme nous l'avons déjà discuté dans ces colonnes [1]. Mais ces tests de pluripotence *in vivo* ne sont évidemment pas applicables à des CSE et iPS humaines. Plusieurs arguments

moléculaires et fonctionnels suggèrent que le potentiel de ces dernières serait plus proche de celui de cellules pluripotentes murines de type EpiSC, dérivées de l'épiblaste de blastocystes tardifs, et dont la capacité de participer à des chimères post-natales - en particulier à la lignée germinale - est déjà très restreinte [4]. L'équipe de Shoukhrat Mitalipov, du centre de primatologie de l'Orégon (États-Unis), apporte un argument de poids à cette hypothèse en montrant l'incapacité de CSE de singes Rhésus de



contribuer à des chimères post-natales après leur injection dans des blastocystes de primates [5]. Cette équipe est une des seules équipes au monde capables de manipulations embryonnaires de ce type chez le primate non humain : elle a précédemment obtenu des lignées de CSE après transfert de noyaux somatiques dans des ovocytes de singes (sans toutefois obtenir de naissances après transfert *in utero* de ces embryons), et plus récemment, a décrit - toujours chez le singe - une approche de transfert nucléaire thérapeutique dans les maladies mitochondriales dont nous nous sommes fait l'écho [6].

### Échec de l'intégration de CSE dans des blastocystes hôtes

Dans une première approche, les auteurs ont appliqué la technique utilisée chez la souris et injecté 20 à 30 CSE dissociées

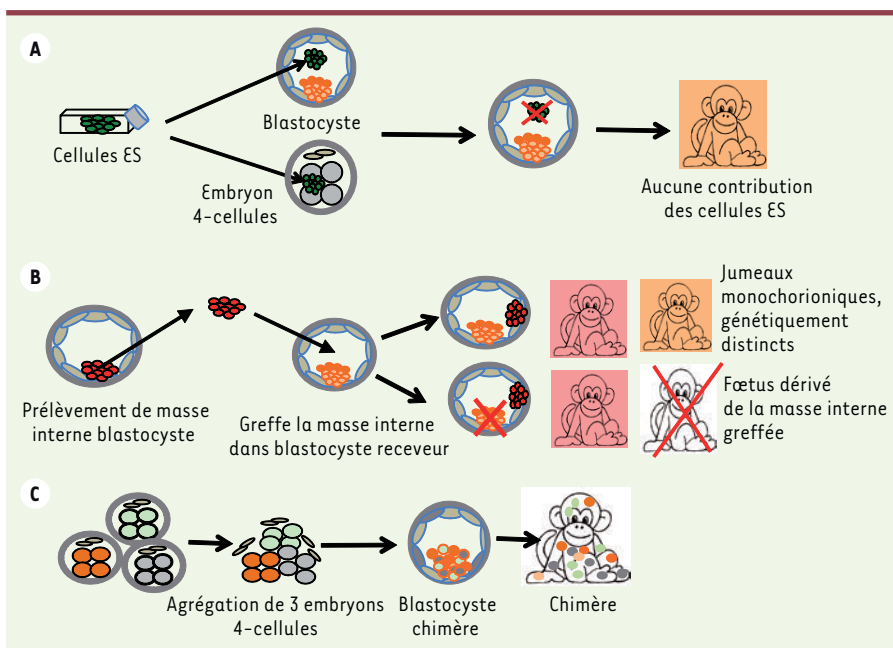
dans un blastocyste hôte, jouxtant la masse interne. Vingt-six blastocystes ainsi traités ont été transférés dans l'utérus de sept femelles. Quatre grossesses ont été obtenues, mais aucun des sept embryons analysés à mi-gestation n'exprimait de chimérisme. De même, aucune contribution des CSE de singes aux fœtus n'a été détectée après l'injection des CSE dans des embryons de 4-cellules, à un stade précédant le stade blastocyste (Figure 1A)

La dissociation des cellules pouvait être en cause : on sait que si les CSE murines la tolèrent, tel n'est pas le cas des CSE humaines. Pour tester ce paramètre, les auteurs ont donc injecté, sans les dissocier, les masses internes prélevées sur des blastocystes dans 44 blastocystes hôtes transférés ensuite chez 11 femelles. Trois furent enceintes : l'une d'entre elles portait des jumeaux

monochorioniques mais non chimères, correspondant au développement séparé des deux masses internes, celle de l'hôte et celle du donneur (Figure 1B). Un chimérisme était présent seulement dans le foie et la rate des jumeaux et témoignait probablement de l'échange de cellules lors des anastomoses vasculaires, mais pas d'un vrai chimérisme. Cela démontre certes la réceptivité de l'embryon hôte et la « pluripotence » globale de la masse interne, mais pas celle des cellules individuelles qui la composent (dont dérivent les CSE). Il faut souligner que c'est la première fois qu'un individu viable est obtenu à partir de la greffe d'une masse interne non dissociée dans un blastocyste.

Autre explication possible de l'échec : le stade de maturation trop tardif des CSE. Pour le tester, les auteurs ont remplacé deux blastomères d'un

embryon 4-cellules par deux blastomères d'un autre embryon. Des 29 embryons 4-cellules obtenus, 19 ont atteint le stade blastocyste et 10 contenaient un nombre normal de cellules, suggérant un chimérisme qui n'a pas été prouvé en l'absence de marqueur distinctif. Finalement, un chimérisme clair et net a été observé après agrégation de multiples embryons pris très précocement - 3 à 6 embryons de 4 à 6-cellules pour chaque test - bien avant l'individualisation de la masse interne (Figure 1C). Vingt-neuf embryons chimériques ont été obtenus, et 14 de ces blastocystes chimériques ont été transplantés chez cinq femelles receveuses. Toutes ont été enceintes : la grossesse a été terminée par les chercheurs avant terme chez trois d'entre elles, et l'analyse des fœtus a confirmé le chimérisme de tous les tissus y compris de la lignée germinale. Les deux autres femelles ont donné naissance à Roku et Hex (jumeaux) et à Chimero, trois singes normaux, et également chimériques.



**Figure 1. Stratégies expérimentales utilisées par l'équipe de S. Mitalipov pour obtenir des singes chimères à partir de cellules embryonnaires.** **A.** Des CSE dérivée de la masse interne de blastocystes sont injectées dans un blastocyste singe hôte, ou dans un embryon 4-cellules, et les blastocystes sont ensuite transférés dans l'utérus de femelles. Les fœtus ont été analysés à mi-gestation. Aucune chimérisme n'a été observé. **B.** La masse interne complète prélevée sur des blastocystes a été implantée dans des blastocystes hôtes, ensuite transférés dans l'utérus de femelles. Parmi les 3 fœtus analysés, deux provenaient du développement de la masse interne greffée. **C.** La seule stratégie résultant en un taux de chimérisme important consiste à agréger plusieurs embryons 4-cellules, ce qui aboutit à la formation de blastocystes qui peuvent être transférés dans l'utérus de femelles, et poursuivre leur développement jusqu'à la naissance de singes viables.



### Différences d'incorporation des CSE dans un blastocyste hôte chez la souris ou le singe : quelles hypothèses ?

Si ces résultats confirment la différence entre les systèmes du singe Rhésus (et probablement de l'homme) et de souris, l'histoire ne dit pas pourquoi les CSE de Rhésus ne contribuent pas au développement embryonnaire : incompétence des CSE, non-permissivité de l'embryon hôte ou autre facteur de restriction sans aucun rapport avec le potentiel des cellules et qui, s'il était identifié, pourrait être contourné. Les auteurs formulent au moins deux hypothèses :

Les blastocystes hôtes, comme les CSE injectées, sont peut-être au-delà de la fenêtre de permissivité propice à l'établissement du chimérisme. La compétence des CSE de primates (et d'homme) reflète en effet l'état de maturation de la masse interne dont elles sont issues. Or, l'analyse fine des masses internes des blastocystes hôtes a révélé qu'à ce stade, une organisation en deux feuilletts distincts, épiblaste et endoderme primitif, est déjà décelable. Cette ségrégation en 2 feuilletts s'oppose peut-être à l'incorporation de CSE immatures étrangères. Rappelons que chez la souris, cette ségrégation

apparaît au jour 4,5, mais que la greffe de CSE est faite au jour 3,5 ; plus tard, elle est inefficace.

D'autre part, les auteurs démontrent, en suivant grâce à un traceur les CSE injectées dans les embryons 4-cellules, qu'elles se différencient très rapidement et certainement avant d'avoir pu s'intégrer sous une forme encore immature pluripotente dans les embryons 4-cellules.

Il faut cependant remarquer que les CSE de singes Rhésus ont tous les autres attributs de la pluripotente : formation de tératomes, production de cellules différenciées fonctionnelles de multiples tissus *in vitro* (comme nous l'avons décrit à propos des travaux de M. Pucéat et P. Ménasché [7]), signature moléculaire. Est-ce que des CSE dérivées non pas de la masse interne, mais de blastomères (embryons 4-8 cellules) d'embryons de singes pourraient, elles, contribuer *in vivo* à des chimères ? Cela vaut peut-être d'être testé. Pourrait-on aussi, par un artifice de culture, induire un état plus « naïf » dans ces CSE qui élargirait leur potentiel *in vivo*, comme cela a été décrit pour les ÉpiSC de la souris que l'on peut convertir en CSE naïves [8] ?

Comme dans beaucoup de domaines, la souris - modèle d'étude « extra-ordinaire » - ne reflète que très mal la réalité de l'embryologie et de la physiologie humaines ou des primates non humains. Important, à l'heure des discussions éthiques et de la thérapie cellulaire ♦

### ES cells and postnatal chimeric Rhesus monkeys

#### CONFLITS D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Coulombel L. Pluripotente : une définition à géométrie variable. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 798-801.
2. Cohen-Tannoudji M, Guénet JL. Une nouvelle ère pour la génétique du rat. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 387-90.
3. Coulombel L. Reprogrammation nucléaire d'une cellule différenciée : on efface tout et on recommence. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 667-70.
4. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007 ; 448 : 191-5.
5. Tachibana M, Sparman M, Ramsey C, et al. Generation of chimeric Rhesus monkeys. *Cell* 2012 ; 148 : 1-11.
6. Häfner S, Coulombel L. Naissance de Mito et Tracker : prélude à la correction des mutations de l'ADN mitochondrial chez l'homme ? *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 802-3.
7. Coulombel L. Coup de cœur pour un progéniteur multipotent mésodermique dérivé de cellules souches embryonnaires humaines. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 439-41.
8. Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009 ; 4 : 487-92.

## NOUVELLE

### Nouveaux analgésiques par complète inhibition de la dégradation enzymatique des opioïdes endogènes

Bernard P. Roques, Marie-Claude Fournié-Zaluski, Michel Wurm

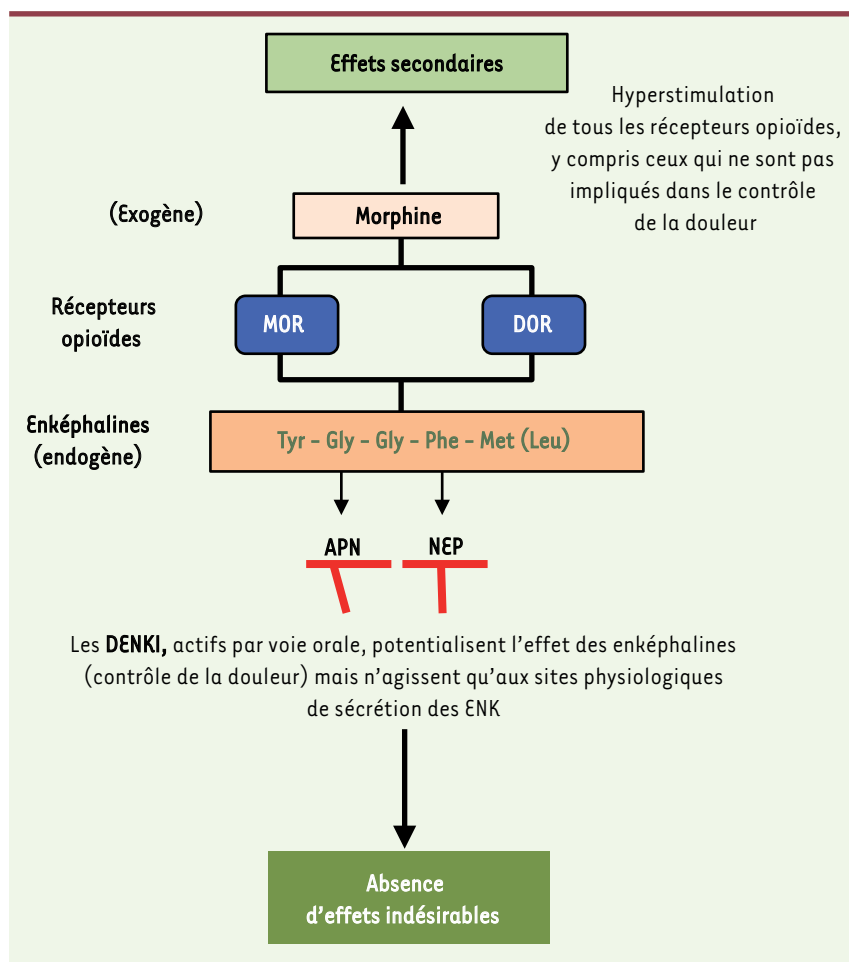
Pharmaleads SAS, 13, rue Watt, 75013 Paris, France.  
[bernard.roques@pharmaleads.com](mailto:bernard.roques@pharmaleads.com)

#### PL37, une molécule analgésique originale

En dépit d'un intérêt constant de l'industrie pharmaceutique pour la mise au point de nouveaux analgésiques puissants mais dépourvus des effets indésirables de la morphine

(sédation, constipation, accoutumance, dépression respiratoire, nausées), force est de constater qu'aucun médicament original n'a vu le jour depuis plusieurs décennies. Ainsi les douleurs neuropathiques (atteinte nerveuse due à une altération métabo-

lique, infectieuse, chimique ou mécanique du nerf : diabète, infections zostériennes, chimiothérapie anticancéreuse ou anti-VIH [virus de l'immunodéficience humaine], algies postopératoires) sont peu sensibles à la morphine et médiocrement soulagées



**Figure 1. Représentation schématique du système opioïde endogène.** Le système opioïde endogène comprend les effecteurs peptidiques Met-enképhaline et Leu-enképhaline, leurs récepteurs mu (MOR) et delta (DOR) et les deux enzymes d'inactivation des enképhalines, néprilysine (NEP) et aminopeptidase (APN). Morphine et enképhalines interagissent avec des affinités nanomolaires similaires avec DOR et MOR, de manière ubiquitaire pour la morphine, ce qui est la cause des effets secondaires, et restreinte dans le cas des enképhalines (supprimant ou réduisant ces effets secondaires). L'inhibition conjointe de la NEP et l'APN par les DENKI (dual enkephalinase inhibitors) augmente par un facteur variant de 2 à 5 la concentration extracellulaire des enképhalines libérées lors de la stimulation nociceptive entraînant des réponses analgésiques puissantes. Ainsi, par voie intraveineuse, le PL37 possède une ED50 (median effective dose) de 1,6 mg/kg, donc très proche de celle de la morphine (1,3 mg/kg).

par des antidépresseurs (duloxétine) ou des antiépileptiques (gabapentine ou prégabaline) aux effets secondaires gênants. Cette carence pourrait enfin être comblée par une molécule originale, le PL37 [1], développée par la Société Pharmed, comme le suggèrent les premiers résultats des essais cliniques : excellente tolérance, absence d'effets secondaires de type opiacé.

Le PL37 a terminé la Phase I de son développement clinique. Il a démontré une totale sécurité d'emploi et une tolérance remarquable à des doses très largement supérieures à celles envisagées en clinique et en Phase II/III (l'entrée en Phase II est prévue pour la mi-2012). Aucun des effets indésirables centraux ou périphériques des opiacés n'a été observé. Le test de pharmacologie clinique à la capsaïcine

sous-cutanée<sup>1</sup> a démontré une différence significative par rapport au placebo chez les volontaires sains, sur tous les paramètres étudiés. Ces résultats seront présentés en détail dans une prochaine publication dans une revue spécialisée.

### PL37, un DENKI (dual enkephalinase inhibitor)

Le mode d'action du PL37 s'appuie sur l'existence d'un système de contrôle physiologique de la douleur par deux neuropeptides morphinomimétiques, la méthionine- et la leucine-enképhaline (Met-E et Leu-E). Ces enképhalines (ENK) sont des pentapeptides synthétisés principalement (mais pas exclusivement) par des neurones sous forme d'un long précurseur, la préproenkephaline (PENK), puis stockés dans des vésicules synaptiques. Ces ENK sont libérées par un mécanisme dépendant du calcium et interagissent à des concentrations nanomolaires avec deux récepteurs opioïdes (OR) appartenant au groupe des récepteurs couplés aux protéines G et dénommés mu (MOR) et delta (DOR). L'activation de ces derniers bloque la propagation des messages douloureux par une modification du fonctionnement des canaux ioniques et une inhibition - dépendante du calcium - de la libération de substances pronociceptives [2].

Ce mode d'action est identique à celui de la morphine qui se lie aux récepteurs mu et delta avec des affinités similaires à celles des ENK. Injectées directement dans le cerveau, ces dernières induisent des effets analgésiques comparables à ceux de la morphine mais de très courte durée [3] du fait de leur dégradation enzymatique rapide en fragments inactifs par deux métallopeptidases à zinc, la néprilysine (NEP) et l'aminopeptidase N (APN). Ancrées dans la membrane plasmique de la cellule avec leur site

<sup>1</sup> La capsaïcine est un composé chimique irritant, et douloureux lors d'une utilisation par voie intradermique. Dans ces conditions, elle est utilisée pour tester la capacité d'une molécule à réduire les douleurs neuropathiques.

actif extracellulaire, ces enzymes dégradent les ENK circulantes sans modifier leur sécrétion [4]. Bernard P. Roques et Marie-Claude Fournié-Zaluski ont pris en compte ces processus pour proposer, dès les années 1980, de bloquer complètement le catabolisme des ENK par des inhibiteurs interagissant indépendamment ou conjointement avec la NEP et l'APN [3, 4]. Ces molécules, initialement développées dans l'Unité Inserm de pharmacochimie moléculaire et structurale animée par B.P. Roques, ont été récemment dénommées DENKI (dual enkephalinase inhibitors). Par la suite, la Société Pharmaleads (fondée par B. P. Roques et M.-C. Fournié-Zaluski en 2001) a poursuivi l'étude de ce concept et conçu plusieurs classes de DENKI possédant les propriétés (stabilité, puissance, biodisponibilité orale) qui se prêtent à une utilisation clinique [1]. L'originalité de cette approche vient de la différence entre l'administration exogène d'opiacés (morphine par exemple) qui va stimuler de manière ubiquitaire et excessive tous les récepteurs opioïdes, y compris ceux qui ne sont pas physiologiquement recrutés par les enképhalines (et là se trouve la cause principale des effets secondaires de la morphine), et l'action des ENK qui s'effectuera uniquement lors de leur libération tonique, laquelle varie en fonction du stimulus douloureux et de la voie de conduction de la douleur. On a ainsi pu démontrer par des expériences de microdialyse chez le rat vigile, que les DENKI augmentaient de manière importante la concentration circulante des ENK aux trois niveaux du contrôle de la douleur (périphérique, spinal et cérébral), mais sans jamais modifier leur sécrétion ni saturer les récepteurs opioïdes [5, 6]. Cela induit une absence totale, observée sur des modèles animaux et vérifiée dans les premières études cliniques chez le volontaire sain, de sédation, constipation ou dépression respiratoire. L'intérêt des DENKI est également d'utiliser la capacité des neuropeptides que sont

les ENK à diffuser à distance de leur site de libération [7] ce qui leur permet de stimuler des récepteurs opioïdes situés, par exemple, au niveau des nerfs lésés où ils sont hyperexprimés de chaque côté de la lésion [8]. C'est la raison de l'indication clinique (douleurs neuropathiques) retenue pour le PL37, conçu chimiquement pour agir par voie orale à la périphérie. Il est désormais admis que 50 % des effets analgésiques des opiacés s'exercent par l'inhibition de la douleur à sa source [9], c'est-à-dire au niveau des terminaisons fines des fibres afférentes projetant l'influx douloureux sur la moelle épinière qui le relaie vers le cerveau. Tous les modèles animaux de douleurs inflammatoires et neuropathiques avec allodynie (perception douloureuse d'une stimulation qui normalement ne l'est pas) et hyperalgésie (exacerbation de la sensation douloureuse), diabète induit par la streptozotocine, compression du nerf sciatique, inflammation par injection locale de substances irritantes dans la patte ou le genou ont démontré l'action analgésique, anti-allodynique et antihyperalgésique puissante du PL37. Lors d'une inflammation ou d'une neuropathie, les ENK et leurs récepteurs sont lentement hyperexprimés, le trafic intracellulaire de leur complexe n'engendrant alors pas d'accoutumance à l'inverse de la morphine [8]. On peut donc utiliser les DENKI de manière curative et même préventive comme cela a été démontré avec le PL37 [1].

Enfin, l'action des ENK protégées par le PL37 est augmentée de manière synergique lorsque l'on associe ce dernier à des analgésiques comme la morphine [6] ou la prégabaline [10]. Cela permet de réduire les doses de morphine et/ou de réaliser des administrations alternées afin de permettre aux patients de s'affranchir temporairement ou définitivement des effets indésirables de la morphine.

La relation entre l'analgésie induite par les DENKI et l'augmentation des ENK

endogènes a été démontrée par utilisation de souris knock-out pour le gène codant pour la préproenkephaline PENK ou par administration d'anticorps spécifiques immobilisant ces neuropeptides. En résumé, beaucoup de possibilités sont offertes pour la gestion des épisodes douloureux aigus ou chroniques par les différentes familles de DENKI administrés par diverses voies [1]. ♦

### New painkillers inhibiting the physiological breakdown of endogenous opioids

#### CONFLITS D'INTÉRÊTS

Bernard Roques est vice-président et directeur scientifique de Pharmaleads, Marie-Claude Fournié-Zaluski, directrice scientifique et membre du comité exécutif, Michel Wurm membre du comité exécutif, et directeur du développement.

#### RÉFÉRENCES

1. Roques BP, Fournié-Zaluski MC, Wurm M. Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain. *Nat Rev Drug Discovery* 2012 ; 11 : 293-310.
2. North RA, Williams JT, Sureprenant A, Christie MJ. Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 5487-91.
3. Fournié-Zaluski MC, Fournié-Zaluski MC, Chaillet P, et al. Analgesic effects of kelatorphan, a new highly potent inhibitor of multiple enkephalin degrading enzymes. *Eur J Pharmacol* 1984 ; 102 : 525-8.
4. Roques BP, Noble F, Daugé V, et al. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 1993 ; 45 : 87-146.
5. Noble F, Roques BP. Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. *Expert Opin Ther Targets* 2007 ; 11 : 145-59.
6. Nieto MM, Wilson J, Cupo A, et al. Chronic morphine treatment modulates the extracellular levels of endogenous enkephalins in rat brain structures involved in opiate dependence: a microdialysis study. *J Neurosci* 2002 ; 22 : 1034-41.
7. Roques BP. Novel approaches to targeting neuropeptide systems. *Trends Pharmacol Sci* 2000 ; 21 : 475-83.
8. Zollner C, Shaqura MA, Bopalal CP, et al. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol Pharmacol* 2003 ; 64 : 202-10.
9. Stein C, Schafer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 2003 ; 9 : 1003-8.
10. Menendez L, Hidalgo A, Meana A, et al. Inhibition of osteosarcoma-induced thermal hyperalgesia in mice by the orally active dual enkephalinase inhibitor PL37. Potentiation by gabapentin. *Eur J Pharmacol* 2008 ; 596 : 50-5.