



HAL
open science

Recyclage polarisé et formation de la synapse immune dans les lymphocytes T.

Andrès Alcover, Maria Isabel Thoulouze, Thierry Galli

► **To cite this version:**

Andrès Alcover, Maria Isabel Thoulouze, Thierry Galli. Recyclage polarisé et formation de la synapse immune dans les lymphocytes T.. Médecine/Sciences, 2005, 21 (1), pp.9-10. 10.1051/med-sci/20052119 . hal-02947442

HAL Id: hal-02947442

<https://hal.inrae.fr/hal-02947442>

Submitted on 24 Sep 2020

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.

NOUVELLE

Peut-on reprogrammer des cellules cancéreuses ?

Hélène Gilgenkrantz

Une réponse expérimentale innovante : le transfert nucléaire

Les modifications génétiques agissent généralement de concert avec des modifications épigénétiques pour induire un processus tumoral. Si les premières sont transmissibles, les secondes, telles que la méthylation de l'ADN ou l'acétylation des histones, sont potentiellement réversibles puisqu'elles n'altèrent pas directement la séquence d'ADN. Pour étudier le rôle de ces modifications épigénétiques dans l'oncogenèse, l'équipe de Rudolf Jaenisch a utilisé le transfert nucléaire. En effet, transférer un noyau d'une cellule différenciée dans un ovocyte énucléé s'apparente presque à appuyer sur la touche « remise à zéro » d'un programme, et donc à effacer les modifications épigénétiques. Le protocole expérimental proposé ici comprend deux étapes : transférer tout d'abord un noyau de cellule tumorale dans un ovocyte énucléé, puis tenter de dériver une lignée de cellules ES à partir des blastocystes issus de ce clonage. Les cellules ES obtenues sont alors testées pour leur double capacité : celle d'induire un processus tumoral, et celle de participer au développement d'un animal par injection dans un blastocyste diploïde ou tétraploïde (Figure 1). Les auteurs ont testé deux sortes de cellules : des cellules de carcinome embryonnaire (EC) qui produisent des tumeurs, mais sont aussi, paradoxalement, capables de participer à la mise en place de différents tissus au cours du développement embryonnaire [1], et des cellules de différentes lignées cancéreuses, dont la

pluripotence développementale n'était pas démontrée jusqu'à présent [2]. Cette approche a pour but de répondre à deux questions : (1) une inversion du potentiel tumorigène de cellules cancéreuses est-elle possible par transfert nucléaire ? (2) L'activité de reprogrammation d'un ovocyte est-elle suffisante pour rétablir la pluripotence de lignées cancéreuses ? Chez les amphibiens, il a été démontré que des noyaux de cellules EC peuvent être reprogrammés pour participer au développement embryonnaire. Mais qu'en est-il chez les mammifères ?

Reprogrammation des cellules de carcinome embryonnaire

Les cellules de carcinome embryonnaire sont issues de tératocarcinomes. Leur pluripotence est connue de longue date : injectées dans un blastocyste, elles peuvent contribuer à la formation de différents organes [3]. Trois lignées de cellules EC donnant des profils de tumorigénèse et de différenciation variés ont été utilisées pour le transfert nucléaire. Les blastocystes obtenus après clonage sont normaux et ont permis de dériver des lignées de cellules ES avec un excellent rendement. Ces cellules - injectées par voie sous-cutanée chez des souris immunodéprimées - sont équivalentes à la lignée EC parentale quant à leur propension à développer des tératomes. De même, lorsque les cellules ES sont injectées dans un blastocyste diploïde, elles possèdent le même potentiel développemental que les cellules EC parentales. Par conséquent, les capacités de développe-

Inserm U.567, Institut Cochin, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

gilgenkrantz@cochin.inserm.fr

ment et le potentiel tumoral des cellules ES sont déterminés par des modifications génétiques héréditaires ou des modifications épigénétiques « non réversibles » par la reprogrammation nucléaire. De fait, des altérations de l'ADN communes et spécifiques de chacune des lignées ont été détectées dans les cellules parentales.

Reprogrammation des lignées tumorales

Il fut beaucoup plus difficile d'obtenir des cellules ES après transfert nucléaire de lignées tumorales. Cette difficulté s'explique sans doute par le fait suivant : selon des travaux récents, l'efficacité d'obtention de cellules ES est directement corrélée à l'état de différenciation du noyau donneur [4]. Les cellules EC expriment des marqueurs de « souche » comme Oct4 ou Nanog, à l'instar des cellules ES. *A contrario*, dans les ovocytes clonés à partir de cellules différenciées ou de lignées tumorales, il est probablement nécessaire de réactiver ces marqueurs de pluripotence afin d'obtenir un développement blastocyttaire. Toutefois, des blastocystes *a priori* normaux ont été obtenus à partir de lignées de mélanome, ce qui permet de conclure que des cellules cancéreuses peuvent répondre à des signaux environnementaux pour participer à la différenciation des deux premiers lignages de l'embryon : l'épiblaste et le trophoctoderme, sans prolifération anormale. Par deux fois (sur 57 blastocystes), une lignée de cellules ES a été obtenue à partir d'un blastocyste issu d'une cellule tumorale de mélanome. Cette cellule tumorale provenait d'un animal transgénique déficient pour le locus suppresseur



de tumeur *ink4a/Arf*, et où le transgène *Ras* est activé de façon conditionnelle exclusivement dans les mélanocytes, après administration de doxycycline [5]. L'impact de la reprogrammation épigénétique sur le développement et le potentiel tumoral a été testé sur les deux lignées de cellules ES. Injectées dans des blastocystes diploïdes receveurs, une seule de ces deux lignées a contribué à la formation de multiples organes dont la peau, le cœur, le rein, le foie ou le poumon, sans passage toutefois à la lignée germinale. Afin de déterminer si les cellules du blastocyste receveur ont pu compléter les cellules ES transplantées pour leur participation au développement embryonnaire, les auteurs ont injecté les cellules ES dans des blastocystes tétraploïdes. Dans ce type d'approche, en effet, les cellules tétraploïdes contribuent uniquement au placenta et non au développement de l'embryon. Les embryons se sont développés jusqu'à 9,5 jours de vie embryonnaire et présentaient alors un cœur battant, un tube neural fermé et des ébauches de membres et de queue. Mais les remaniements chromosomiques (détectés par hybridation génomique comparative, CGH) ont probablement empêché le développement ultérieur de ces embryons.

Le potentiel tumorigène inductible des cellules ES issues de la lignée tumorale de mélanome a été testé sur les souris chimériques. Elles présentent toutes des mélanomes multiples après induction par la doxycycline, tumeurs qui régressent après retrait de la drogue et peuvent être à nouveau réinduites. Des rhabdomyosarcomes ont également été détectés dans un tiers des cas, non susceptibles au retrait de la doxycycline. Par conséquent, le phénotype malin de ces lignées tumorales peut être transitoirement supprimé par cette reprogrammation ovocytaire et autoriser un développement précoce *a priori* normal et une participation à la plupart des lignages somatiques, et ce malgré des remaniements chromosomiques importants. Néanmoins, les altérations chromoso-

miques irréversibles participent au potentiel tumorigène qui subsiste chez les souris chimères et le spectre tumoral est plus important chez celles-ci.

Différentes applications de cette stratégie

L'ensemble de ces résultats suggère que le génome de cellules cancéreuses peut être reprogrammé par l'environnement ovocytaire pour donner un état embryonnaire pluripotent, sans toutefois permettre d'établir les facteurs épigénétiques capables d'influencer le phénotype malin. Il fournit également une donnée intéressante: l'apparition de rhabdomyosarcomes dans un tiers des chimères confirme l'existence d'une voie commune entre le développement des mélanomes et ce type de tumeurs [6]. Cette approche expérimentale utilisant le transfert nucléaire pourrait donc, à l'avenir, non seulement servir à caractériser des associations entre différents types de cancer, comme c'est le cas ici, mais également à amplifier le génome potentiellement

altéré d'une cellule dans le contexte d'un développement embryonnaire précoce. Elle pourrait aussi se révéler utile dans l'étude des désordres génétiques polygéniques ou dans la création de modèles de maladies complexes comme le diabète. ♦ **Is reprogramming of carcinoma cells possible?**

RÉFÉRENCES

1. Hochedlinger K, Blueloch R, Brennan C, et al. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Gene Dev* 2004; 18: 1875-85.
2. Blueloch R, Hochedlinger K, Yamada Y, et al. Nuclear cloning of embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13985-90.
3. Andrews PW. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B* 2002; 357: 405-17.
4. Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, et al. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 2003; 130: 1673-80.
5. Chin L, Tam A, Pomerantz J, et al. Essential role for oncogenic Ras tumour maintenance. *Nature* 1999; 400: 468-72.
6. Sharp R, Recio JA, Jhappan C, et al. Synergism between INK4a/ARF inactivation and aberrant HGF/SF signaling in rhabdomyosarcomagenesis. *Nat Med* 2002; 8: 1276-80.

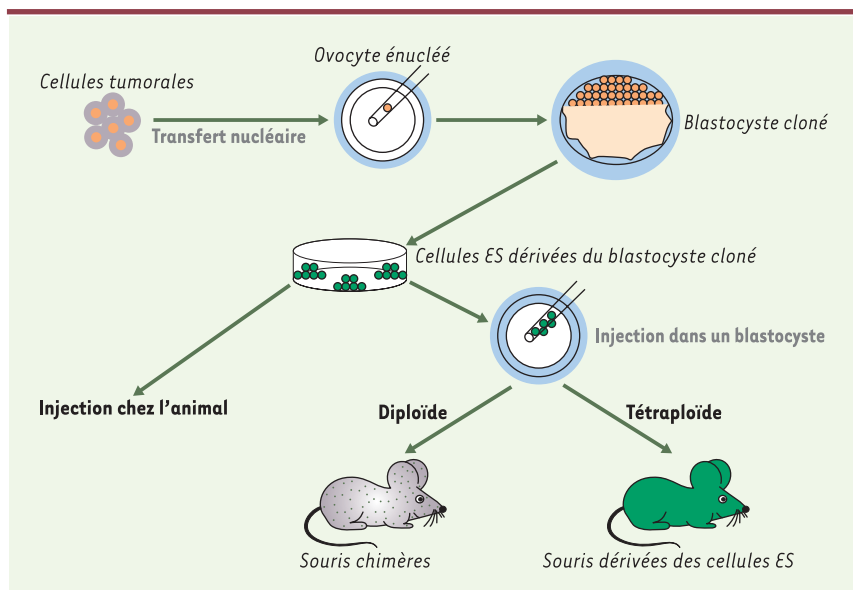


Figure 1. Approche expérimentale en deux étapes ayant permis de tester la capacité de reprogrammation de cellules tumorales. Un transfert nucléaire est établi à partir de noyaux de cellules tumorales. Des cellules ES sont dérivées des blastocystes clonés obtenus. Ces dernières sont injectées dans un blastocyste receveur diploïde - permettant d'obtenir des souris chimères (les deux génomes parentaux du blastocyste et de la cellule ES participent à la formation du souriceau) - ou tétraploïde (seules les cellules ES participent à la formation du souriceau).



Le mécanisme d'action de l'hepcidine déchiffré

Gaël Nicolas, Sophie Vaulont

> L'homéostasie du fer dans l'organisme repose sur un contrôle strict de l'absorption du fer au niveau des entérocytes matures de la villosité duodénale. Ce processus met en jeu un grand nombre de protéines dont des transporteurs de fer capables de faire traverser le métal du côté apical (la protéine DMT1, *divalent metal transporter*) et du côté basolatéral de la cellule (la ferroportine) (*Figure 1*) (pour revue, voir [1]). L'hepcidine est une petite protéine synthétisée par l'hépatocyte sous la forme d'un précurseur de 84 acides aminés. La maturation de l'hepcidine après clivage du précurseur conduit à deux formes moléculaires de 25 et 20 acides aminés. Ces formes matures, correspondant à la partie carboxy-terminale, ont été isolées et purifiées dans le sérum et dans l'urine. Elles possèdent huit cystéines formant quatre ponts disulfures qui leur confèrent une structure compacte unique. D'abord identifiée pour son activité antimicrobienne, l'hepcidine s'est révélée être un peptide hormonal clé du métabolisme du fer capable d'inhiber l'absorption intestinale du fer alimentaire. Un régime riche en fer a pour conséquence d'augmenter la production d'hepcidine afin de diminuer l'absorption de ce fer en excès [2, 3]. Dans les situations d'hémochromatose sévères (lorsque par exemple l'hepcidine est mutée, que ce soit chez l'homme ou chez la souris), cette régulation de l'absorption intestinale de fer est perdue, ce qui provoque une accumulation de fer très importante dans les organes [2, 4]. À l'inverse, une surexpression d'hepcidine crée un blocage de l'absorption de fer, ce qui entraîne une

carence en fer pouvant aboutir à une anémie [5]. Si l'on connaît bien maintenant le rôle que joue l'hepcidine dans le contrôle de l'homéostasie du fer, on ignorait encore tout de son mode d'action pour inhiber l'absorption du fer, et surtout sur quelle cible moléculaire elle était capable d'agir. L'exporteur de fer évoqué ci-dessus, la ferroportine, protéine transmembranaire présente dans la membrane basolatérale des entérocytes, semblait être une cible rêvée. C'est effectivement ce que vient de démontrer le groupe de Jerry Kaplan (Université d'Utah, USA) en collaboration avec le groupe de Tomas Ganz (Université de Californie, USA) dans une étude publiée dans *Science* [6]. Les auteurs ont utilisé un modèle cellulaire (cellules humaines HEK293) dans lequel la ferroportine fusionnée à la GFP (*green fluorescent protein*), la ferro-GFP, est exprimée de manière inducible. En présence d'inducteur, la ferro-GFP produite se localise dans la membrane et provoque, lorsque les cellules sont incubées en présence de fer, une diminution de la quantité de fer intracellulaire par augmentation de son export. Cela confirme la fonction d'extrusion du fer intracellulaire de la ferro-GFP dans ce modèle. L'ajout d'hepcidine purifiée dans le milieu de culture induit une internalisation de la ferro-GFP, associée à une augmentation du fer intracellulaire. Cette action d'internalisation est rapide (2 à 3 heures) et s'observe pour des concentrations physiologiques d'hepcidine. De plus, cet effet est réversible car la ferro-GFP retrouve une localisation membranaire lorsque l'hepcidine est retirée du milieu. La même observation d'internalisation

G. Nicolas: Inserm U.409, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16, rue Henri Huchard, BP 416, 75870 Paris Cedex, France. nicolas@bichat.inserm.fr
S. Vaulont: Inserm U.567, Institut Cochin, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris Cedex, France. vaulont@cochin.inserm.fr

de la ferro-GFP est reproduite avec une hepcidine de 25 acides aminés synthétisée *in vitro* mais, de façon intéressante, pas avec la forme la plus courte de 20 acides aminés. Les auteurs montrent par des expériences d'immunomarquage que la détection de ferro-GFP est diminuée en présence d'hepcidine et suggèrent sa dégradation *via* la voie lysosomale. La co-localisation de la ferro-GFP internalisée avec le marqueur lysosomal tardif Lamp1 renforce cette hypothèse. L'action est spécifique du couple hepcidine-ferroportine car l'internalisation de la ferro-GFP n'est pas observée en présence de protégrine, un autre peptide antimicrobien, et, inversement, l'hepcidine ne permet par l'internalisation du récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*). Les auteurs démontrent enfin, par des expériences d'immunoprécipitation, que la liaison entre l'hepcidine et la ferro-GFP est directe. Ainsi, trois ans après la démonstration du rôle crucial de l'hepcidine, ce travail permet-il de proposer une boucle de régulation assurant le contrôle de l'homéostasie du fer (*Figure 1*). Un excès de fer (par exemple, avec un régime riche en fer) induit l'expression hépatique d'hepcidine laquelle se lie directement avec la ferroportine pour entraîner son internalisation et sa dégradation. Le fer s'accumule alors

dans la cellule et n'est plus exporté. La conséquence en est une diminution du transport du fer alimentaire au niveau des entérocytes matures. L'érythropoïèse qui doit être maintenue pour produire suffisamment de globules rouges pompe alors sur les réserves de fer en excès, ce qui conduit peu à peu à dépler celles-ci et à rétablir un état d'équilibre. Du fait de sa petite taille, l'hepcidine a probablement une clairance très rapide, permettant ainsi une inversion rapide du processus.

Cet élégant travail, réalisé exclusivement sur un modèle cellulaire, demande maintenant une validation *in vivo* et pose la question de savoir si toutes les cellules exprimant la ferroportine vont être également sensibles à l'hepcidine. Outre l'entérocyte mature, l'hepcidine pourrait en effet agir sur l'export du fer, non seulement au niveau du système réticuloendothélial [2], mais également au niveau du placenta [5], en se liant sur la ferroportine qui est fortement exprimée dans les macrophages et les cellules du syncytiotrophoblaste placentaire. La prochaine étape concerne l'élucidation des interactions moléculaires entre l'hepcidine et la ferroportine et les mécanismes biochimiques mis en jeu lors de l'internalisation de la ferroportine. Il serait intéressant de déterminer à quel niveau (interaction et/ou internalisation) le processus est altéré avec les formes mutées de l'hepcidine (mutations faux-sens) identifiées chez l'homme dans des surcharges en fer sévères. De la même façon, le rôle du peptide de 20 acides aminés reste indéterminé. S'agit-il uniquement d'un produit de dégradation de la forme de 25 acides aminés ?

D'après les auteurs, la ferroportine représente le « récepteur » de l'hepcidine, mais l'hepcidine a-t-elle livré tous ses secrets? Il est en effet légitime de se demander si l'hepcidine ne pourrait pas agir (suivant sa concentration, ses partenaires, sa cible...) en utilisant un autre procédé.

Quoi qu'il en soit, ce travail constitue une

étape décisive pour le développement de molécules mimant les effets de l'hepcidine sur l'internalisation de la ferroportine pour traiter des situations physiopathologiques où l'hormone est trop faiblement produite (hémochromatose et autres). À l'inverse, le développement de molécules qui s'opposent à l'action de l'hepcidine sera recherché pour traiter des situations où la concentration urinaire de l'hormone est trop élevée, comme c'est le cas lors d'épisodes inflammatoires ou infectieux [7, 8]. L'hepcidine en excès entraînant alors une

dégradation trop importante de la ferroportine pourrait expliquer la mise en place de l'anémie fréquemment observée dans les états inflammatoires chroniques. ♦

Deciphering the action mechanism of hepcidin

RÉFÉRENCES

1. Beaumont C. Mécanismes moléculaires de l'homéostasie du fer. *Med Sci (Paris)* 2004; 20: 68-72.
2. Nicolas G, Benounn M, Devaux I, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8780-5.

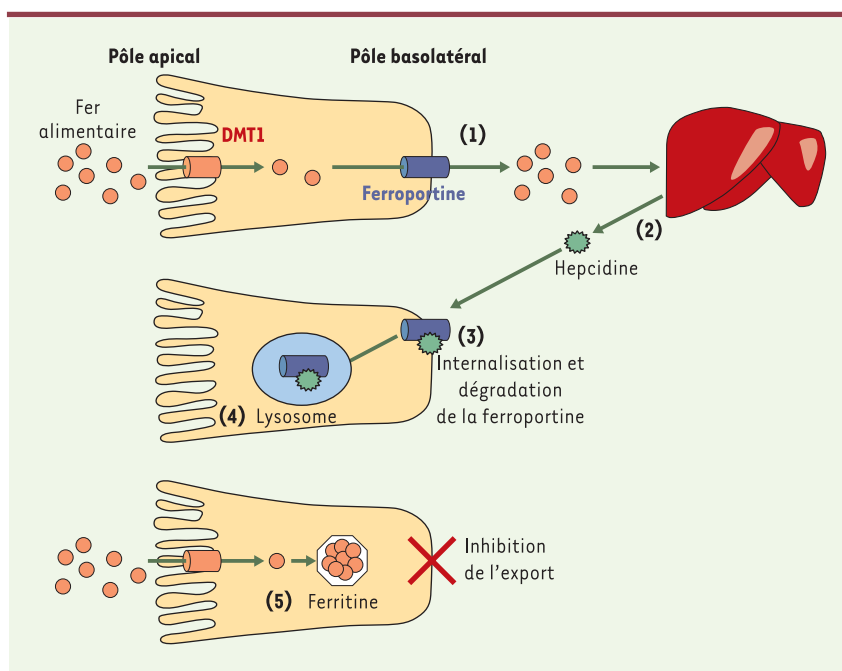


Figure 1. Modèle du mécanisme d'action de l'hepcidine. Après avoir été réduit, le fer alimentaire traverse la membrane apicale de l'entérocyte grâce au transporteur DMT1 puis transite vers la membrane basolatérale qu'il traverse en empruntant la ferroportine tout en étant réoxydé (1) (pour une revue plus détaillée des protéines impliquées, voir [1]). Le fer absorbé en excès est stocké au niveau du foie, provoquant une augmentation de la synthèse et de l'excrétion de l'hepcidine (par un mécanisme qui demeure inconnu) (2). L'hepcidine se lie alors directement sur la ferroportine (3), et induit son internalisation puis sa dégradation dans le lysosome (4). Le fer qui entre dans la cellule s'accumule alors dans la ferritine (5) et n'est plus exporté. Au final, le transport net du fer alimentaire est diminué et le pool de fer sera perdu lors de l'exfoliation de l'entérocyte au sommet de la villosité duodénale. Les réserves en fer (notamment hépatiques) sont alors utilisées pour maintenir une érythropoïèse efficace, ce qui, à terme, permet un retour à un état d'équilibre avec une diminution des réserves en fer. Lors d'une inflammation, une production excessive d'hepcidine pourrait aboutir à une dégradation trop importante de la ferroportine, engendrant une absorption insuffisante de fer. Un mécanisme similaire existerait au niveau des macrophages et des cellules du syncytiotrophoblaste, deux cibles tissulaires de l'hepcidine.



3. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; 276: 7811-9.
4. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2002; 33: 21-2.

5. Nicolas G, Benounn M, Porteu A, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4596-601.
6. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science Express* 28 octobre 2004.

7. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002; 110: 1037-44.
8. Nemeth E, Valore EV, Territo M, et al. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003; 101: 2461-3.

NOUVELLE

Recyclage polarisé et formation de la synapse immune dans les lymphocytes T

Andrés Alcover, Maria Isabel Thoulouze, Thierry Galli

> Parmi les interfaces de communication entre les cellules du système immunitaire, la synapse immune est l'une des mieux étudiées. Induite par la reconnaissance de l'antigène, celle-ci se forme à la jonction entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène. La synapse immune se caractérise par l'accumulation, puis la réorganisation à l'interface cellulaire, de divers récepteurs de surface - dont le récepteur de l'antigène des lymphocytes T (récepteur T), de protéines du cytosquelette et de protéines de signalisation cellulaire. Sa description dans les années 1990 a soulevé des questions importantes, telles que l'universalité de son organisation, la nature des mécanismes qui mènent à sa formation et le rôle de cette structure très organisée dans le processus d'activation des lymphocytes T [1]. Une question centrale s'est alors posée: comment les récepteurs membranaires sont-ils transportés et s'accumulent-ils dans la synapse immune? Plusieurs mécanismes interviendraient: les récepteurs se déplaceraient latéralement dans la membrane, soit par diffusion passive, soit par un mouvement actif facilité par le cytosquelette d'actine et par des moteurs moléculaires de type myosine [2] (Figure 1A). Les travaux récents de V. Das et al. [3] ont permis d'identifier un nouveau mécanisme de transport du récepteur T vers la synapse

immune (Figure 1B). Celui-ci met en jeu deux phénomènes différents: la propriété du récepteur T d'être internalisé et recyclé vers la membrane plasmique, et la capacité des lymphocytes T de polariser leur compartiment vésiculaire d'endocytose précoce et de recyclage vers la synapse immune. Des récepteurs T qui transitent par des endosomes peuvent ainsi être acheminés vers la synapse immune où ils sont recyclés vers la membrane plasmique. Ces travaux démontrent notamment que ce recyclage polarisé de récepteurs conduit à leur accumulation dans la synapse immune. Pour mettre en évidence ce mécanisme, des techniques de microscopie en temps réel ont d'abord été utilisées. Les résultats indiquent que des vésicules d'endocytose contenant des récepteurs T sont transportées vers la zone de contact entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène, et qu'elles recyclent les récepteurs dans cette zone de la cellule. Ces expériences démontrent en outre que ce type de transport est nécessaire pour que le récepteur T s'accumule au niveau de la synapse immune. L'exocytose des vésicules contenant les récepteurs T est sous le contrôle des protéines fusogènes SNARE, cellubrevine, syntaxine 4 et SNAP-23, homologues des protéines SNARE des

A. Alcover, M.I. Thoulouze: Unité de Biologie des interactions cellulaires, CNRS URA 2582, Institut Pasteur, 25, rue du docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.
T. Galli: Inserm U.536, Institut du Fer à Moulin, 75005 Paris, France.
aalcover@pasteur.fr

synapses neuronales. Ainsi, la quantité de récepteur T accumulé dépend à la fois de la capacité du récepteur d'être internalisé, du transport de vésicules le long des microtubules, et du recyclage et de la fusion de vésicules d'exocytose avec la membrane plasmique. Les lymphocytes T peuvent ainsi transporter des récepteurs d'un endroit

à un autre de la membrane plasmique par une voie intracellulaire impliquant des endosomes [3].

La mise en jeu d'un tel mécanisme s'étend à bien d'autres transports que celui des récepteurs T. Il ferait partie d'un mécanisme plus général qui se met en place dans les lymphocytes T consécutivement à la reconnaissance antigénique. Par exemple, le récepteur de la transferrine, qui est recyclé continuellement pour transporter du fer du milieu extracellulaire vers l'intérieur de la cellule, suit le même parcours et s'accumule également dans la synapse immune. Hormis les récepteurs membranaires, ce mécanisme pourrait également impliquer des protéines de signalisation associées à la membrane plasmique, comme la tyrosine kinase Lck ou l'adaptateur LAT (*linker of activation of T cell*). Ces protéines transitent également par un compartiment vésiculaire qui contient des protéines endosomiques, compartiment qui se polarise et semble fusionner avec la membrane au niveau de la synapse immune [4, 5].

Le transport polarisé de protéines utilisant le compartiment endosomique n'est pas spécifique des lymphocytes T. Il constitue un mécanisme conservé, utilisé lors de divers processus cellulaires. Lors de la migration cellulaire ou pendant la phagocytose, par exemple, les endosomes de recyclage se dirigent respectivement vers le front de migration ou vers la coupe phagocytaire, où ils apportent des composants membranaires [6, 7]. Dans les neurones, des endosomes de recyclage peuvent également acheminer des récepteurs postsynaptiques vers la membrane plasmique de la synapse et participer ainsi au renforcement de la transmission synaptique caractéristique de la potentialisation à long terme [8]. La mise en évidence de ce mode de transport lors de la formation de la synapse immune soulève à son tour de nombreuses questions: quelles sont les protéines régulatrices qui « connectent » le signal transmis par le récepteur T à la suite de la reconnaissance antigénique ? À quel stade contrôlent-elles ce transport ? Au niveau de la polarisation du cytosquelette, du transport de vésicules ou bien encore de leur fusion au niveau de la synapse immune ? Enfin, ces protéines régulatrices interviennent-elles aussi dans le contrôle d'autres types de trafic polarisé - celui des granules cytotoxiques [9], des vésicules de sécrétion issues de l'appareil de Golgi [10] ou bien encore celui des endosomes tardifs ? La mise en évidence d'un rôle important de l'exocytose et des protéines SNARE rapproche encore un peu plus la synapse immunologique de la synapse neuronale, site d'un trafic membranaire des plus intenses. ♦

Activation-induced polarized recycling targets T cell receptors to the immunological synapse

RÉFÉRENCES

1. Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2003 ; 3 : 973-83.
2. Wülfing C, Davis MM. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 1998 ; 282 : 2266-9.

3. Das V, Nal B, Dujeancourt A, et al. Activation-induced polarized recycling targets T cell receptors to the immunological synapse. Involvement of SNARE complexes. *Immunity* 2004 ; 20 : 577-88.
4. Ehrlich LR, Ebert PJR, MF Krummel, et al. Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity* 2002 ; 17 : 809-22.
5. Bonello G, Blanchard N, Montoya MC, et al. Dynamic recruitment of the adaptor protein LAT: LAT exists in two distinct intracellular pools and controls its own recruitment. *J Cell Sci* 2003 ; 117 : 1009-16.
6. Bretscher MS, Aguado-Velasco C. Membrane traffic during cell locomotion. *Curr Opin Cell Biol* 1998 ; 10 : 537-41.
7. Booth S, Trimble WS, Grinstein S. Membrane dynamics in phagocytosis. *Semin Immunol* 2001 ; 13 : 357-64.
8. Park M, Penick EC, Edwards JG, et al. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 2004 ; 305 : 1972-5.
9. Clark R, Griffiths GM. Lytic granules, secretory lysosomes and disease. *Curr Opin Immunol* 2003 ; 15 : 516-21.
10. Kupfer A, Mosmann TR, Kupfer H. Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 775-9.

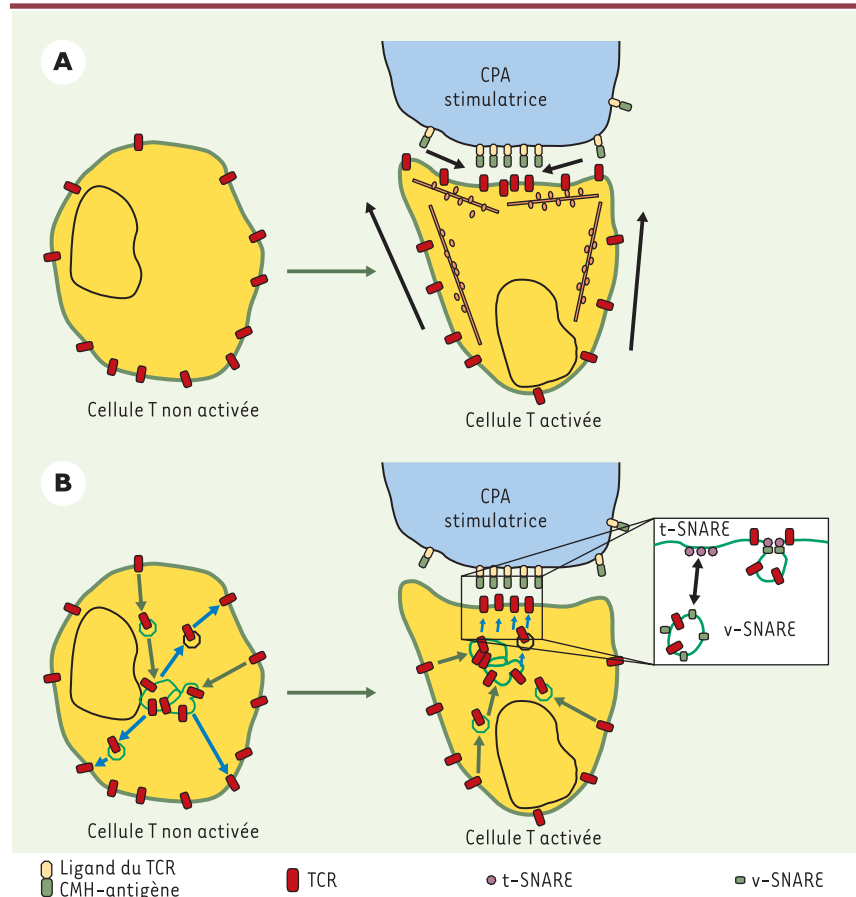


Figure 1. Modèle de ciblage du récepteur T (TCR) vers la synapse immune par recyclage polarisé. **A.** Les molécules de surface peuvent être dirigées vers la zone de contact avec la cellule présentatrice d'antigène (CPA) directement à partir de la surface cellulaire, soit par diffusion passive, soit par un mécanisme actif mettant en jeu le cytosquelette d'actine et les moteurs de type myosine. **B.** Les molécules de TCR, ainsi que les autres récepteurs qui sont recyclés tels que le récepteur de la transferrine, peuvent être adressés à la synapse immune via des endosomes de recyclage. Dans les cellules T non activées (à gauche), l'internalisation (flèches vertes) et le recyclage (flèches bleues) s'opèrent de manière aléatoire d'une région à l'autre de la membrane plasmique. En revanche, après activation par une CPA, l'internalisation peut toujours s'opérer de manière aléatoire (flèches vertes), mais l'exocytose des vésicules de recyclage (flèches bleues) prend place préférentiellement au niveau de la zone de contact avec la CPA. Le regroupement des t-SNARE, puis l'arrimage et la fusion des vésicules de recyclage contenant la v-SNARE cellulaire semblent se produire à ce niveau (*encart*): SNAP: soluble NSF-attachment protein; NSF: N-ethylmaleimide sensitive fusion protein; t-SNARE: target-membrane SNAP receptor; v-SNARE: vesicle-membrane SNAP receptor.

Des cellules souches embryonnaires humaines pour le traitement de la maladie de Parkinson ?

Anselme L. Perrier

Laboratoire de Plasticité cellulaire et thérapeutique, Inserm U.421, IM3, Faculté de Médecine, 8, rue du Général Sarraill, 94010 Créteil Cedex, France.
anselme.perrier@im3.inserm.fr

> La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte progressive d'un seul type cellulaire du cerveau, les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*. Cette perte cellulaire entraîne une déficience du striatum en dopamine, et il n'existe pour l'instant aucun traitement capable d'arrêter ou d'inverser durablement l'évolution de cette maladie. Une approche thérapeutique consiste à restaurer la fonction du striatum en transplantant des cellules neurales capables, à terme, de remplacer les neurones nigraux perdus. Des essais cliniques appliquant cette stratégie dite « substitutive » sont menés depuis maintenant près de 15 ans [1], essentiellement en transplantant des tissus mésencéphaliques issus de plusieurs fœtus humains (parfois 6 à 10 par patient). L'approvisionnement, l'amplification et la standardisation de ce type de greffon étant très problématique, la généralisation de cette approche thérapeutique n'est, au-delà de toute considération éthique, pas envisageable pour l'instant. Pour pouvoir traiter un plus grand nombre de patients parkinsoniens par transplantation cellulaire, il faudrait disposer d'une source de greffons au moins aussi efficace que les tissus fœtaux, mais permettant la préparation standardisée de grandes quantités de neurones dopaminergiques.

Dérivées à partir de certaines cellules d'embryons âgés de seulement quelques jours (stade blastocyste), les cellules souches embryonnaires (ES) sont capables de se multiplier pratiquement

sans limite et de se différencier en tous types cellulaires de l'organisme (cellules pluripotentes). Les cellules ES d'origine humaine constituent donc une source idéale de greffons pour des applications cliniques de thérapie cellulaire, mais seulement si l'on sait diriger efficacement leur croissance et leur différenciation vers les types cellulaires souhaités. Depuis quelques années, plusieurs équipes ont réussi à différencier des cellules ES murines, génétiquement modifiées ou non, en neurones dopaminergiques [2-5]. Ces neurones ont, chez le rat parkinsonien, un potentiel thérapeutique proche de celui de tissus fœtaux [6, 7]. Jusqu'à présent, les divers essais de différenciation neurale de cellules ES humaines n'avaient permis de produire que très marginalement des neurones exprimant au moins un marqueur dopaminergique [8, 9]. Dans un article récemment publié dans les *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* [10], l'équipe de L. Studer décrit un nouveau protocole permettant l'obtention de grandes quantités de neurones dopaminergiques mésencéphaliques à partir de différentes lignées de cellules ES humaines. Les auteurs montrent que les voies de différenciation et de signalisation clés au cours du développement du mésencéphale, *in vivo*, peuvent être reproduites de manière systématique afin de diriger avec succès la différenciation des cellules ES en neurones dopaminergiques.

Le premier mois de différenciation *in vitro* des cellules ES humaines permet d'obtenir des progéniteurs neuraux

ayant une forte capacité proliférative. L'induction neurale est déclenchée en cultivant les cellules à très faible densité sur une couche de cellules stromales de moelle osseuse. Cette propriété des cellules stromales est similaire à celle observée auprès de lignées de cellules ES de souris ou de singe avec plusieurs lignées de cellules stromales d'origine similaire (PA6, MS5, S17, S2) [5, 6]. À la différence de ce qui est obtenu en utilisant des cellules ES murines, la différenciation neurale de cellules ES humaines sur des cellules stromales (MS5) engendre des colonies de cellules neuro-épithéliales constituées de certaines de structures cellulaires circulaires désignées sous le terme de rosettes neurales (Figure 1A). Dans ces colonies, l'induction neurale se caractérise par l'apparition d'îlots cellulaires (préfigurant les futures rosettes) qui cessent d'exprimer des marqueurs de cellules souches embryonnaires tels que Oct-4, Nanog ou Cripto, et commencent à exprimer des marqueurs neuraux tels que le filament intermédiaire nestine (Figure 1B), les facteurs de transcription Sox-1 ou Pax-6, ou encore la molécule d'adhérence cellulaire neurale NCAM. Contrairement à ce que leur morphologie pourrait suggérer [8], les rosettes issues des cellules ES ne représentent pas un équivalent *in vitro* de tube neural. L'absence de marqueurs de régionalisation dorso-ventrale dans les rosettes indique qu'elles représentent plutôt un équivalent de plaque neurale, une structure qui apparaît plus précocement au cours du développement



neural. La régionalisation dorso-ventrale caractérisée par la formation de domaines distincts d'expression de facteurs de transcription précis est en effet très largement achevée lors de la fermeture du tube neural chez la souris. En accord avec cette interprétation, les auteurs observent que les cellules de rosettes répondent de manière spécifique à la présence de deux signaux de régionalisation, Shh et FGF8, essentiels au développement *in vivo* du mésencéphale ventral [11]. Comme cela est observé au cours du développement de la souris, des précurseurs humains exprimant les facteurs de transcription Pax2 et Lmx1b apparaissent en premier *in vitro*, suivis par des précurseurs de neurones post-mitotiques et des jeunes neurones exprimant des marqueurs spécifiques plus tardifs, tels que les facteurs de transcription En1 et Pitx3, et finalement la tyrosine hydroxylase (enzyme clé de la biosynthèse de la dopamine) (Figure 2A-B). Après environ 50 jours de culture, les neurones obtenus, bien qu'encore assez immatures, expriment la majorité des marqueurs caractéristiques des neurones dopaminergiques du mésencéphale. Ils possèdent des propriétés électrophysiologiques typiques de ces neurones et sont capables de libérer de la dopamine de manière contrôlée. La culture finale résultant de la différenciation dirigée est composée presque exclusivement de cellules neurales, parmi lesquelles figure un nombre important (~ 70%) de neurones post-mitotiques dopaminergiques (Figure 2C).

Les essais cliniques de thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson à partir de tissus fœtaux ont montré que la qualité tout autant que la quantité des tissus à transplanter étaient essentielles à l'obtention de bons résultats thérapeutiques. La possibilité de produire des neurones dopaminergiques à partir de cellules ES humaines constitue une première étape qui rend maintenant possible la mesure du potentiel thérapeutique de ces cellules dans des modèles

animaux de la maladie de Parkinson. La première étape doit d'abord permettre de valider *in vivo* la qualité du greffon issu de cellules ES humaines. Plusieurs propriétés importantes du greffon nécessitent en particulier d'être confirmées: (1) une absence totale de formation de tumeur doit être observée, démontrant l'absence de contamination par des cellules ES non différenciées, fortement tumorigènes; (2) les cellules greffées doivent survivre et maintenir,

ou même développer durablement, leur phénotype neuronal et dopaminergique *in situ* après la transplantation; (3) enfin, les neurones du greffon doivent s'intégrer fonctionnellement dans le cerveau hôte, en commençant par ré-innervier le striatum de la manière la plus complète possible. Les étapes ultérieures consistent ensuite en des tests de comportement permettant de mesurer l'efficacité thérapeutique (diminution durable des déficits moteurs) des greff-

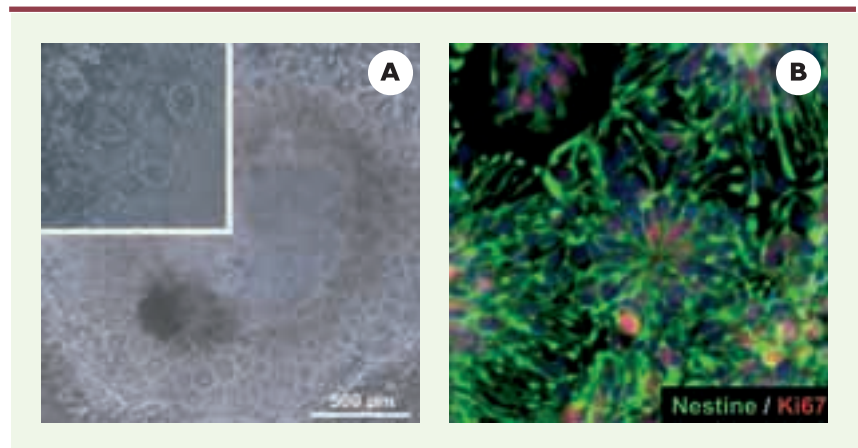


Figure 1. Induction neurale de cellules ES humaines déclenchée par des cellules stromales de moelle osseuse. A. Photo en contraste de phase d'une colonie de cellules ES humaines après 28 jours de culture sur une monocouche de cellules MS5. Plusieurs centaines de structures cellulaires en rosette sont visibles (agrandissement en encart). B. Précurseurs neuraux en rosette après 35 jours de culture: immunodétection de la nestine (en vert) et d'un marqueur de prolifération cellulaire (Ki67) (en rouge). Les noyaux sont marqués en bleu par du DAPI.

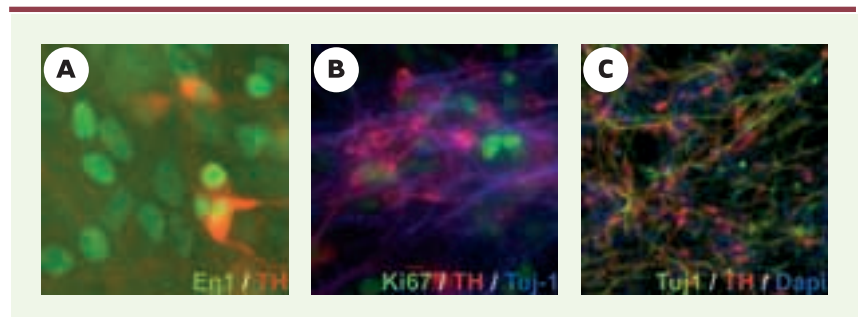


Figure 2. Caractérisation phénotypique des neurones dopaminergiques mésencéphaliques issus de cellules ES humaines. A. Certains précurseurs de neurones dopaminergiques du mésencéphale, après 42 jours de culture, co-expriment le facteur de transcription En-1 (en vert) et la tyrosine hydroxylase (TH) (en rouge). B. Après 50 jours de culture, les neurones dopaminergiques qui co-expriment la tyrosine hydroxylase (en rouge) et la tubuline β III (Tuj-1) (en bleu) sont post-mitotiques car ils ne sont pas marqués par l'anticorps Ki67 (en vert). C. Au-delà de 50 jours de culture, près de 70% des neurones Tuj-1⁺ (en vert) co-expriment la tyrosine hydroxylase (en rouge). Les noyaux sont marqués en bleu par du DAPI.



fons dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson.

La bonne maîtrise de la différenciation neuronale des cellules ES humaines est clairement indispensable à l'exploration du potentiel thérapeutique de ces cellules pour les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson [12]. En offrant la possibilité de standardiser les greffons, les cellules ES humaines permettront d'évaluer avec beaucoup plus de rigueur et de facilité, voire d'accroître, les bénéfices thérapeutiques d'une approche substitutive de thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson. Il est toutefois encore trop tôt pour déterminer si cette stratégie pourra, à terme, apporter des améliorations des symptômes, meilleures et plus stables que celles apportées par d'autres

approches thérapeutiques, pharmacologiques ou chirurgicales, comme, par exemple, les stimulations cérébrales profondes. ♦

Human embryonic stem cell in Parkinson's disease therapy?

RÉFÉRENCES

1. Bjorklund A, Dunnett SB, Brundin P, et al. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2003; 2: 437-45.
2. Perrier AL, Studer L. Making and repairing the mammalian brain : *in vitro* production of dopaminergic neurons. *Semin Cell Dev Biol* 2003; 14: 181-9.
3. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, et al. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 675-9.
4. Chung S, Sonntag KC, Andersson T, et al. Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 1829-38.

5. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 2000; 28: 31-40.
6. Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, et al. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in Parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1200-7.
7. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; 418: 50-6.
8. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, et al. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1129-33.
9. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1134-40.
10. Perrier AL, Tabar V, Barberi T, et al. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 12543-8.
11. Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, et al. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 1998; 93: 755-66.
12. Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders : how to make it work. *Nat Med* 2004; 10 (suppl): S42-50.

NOUVELLE

Le cytosquelette de la cellule dendritique au service de la présentation des antigènes

Federica Benvenuti, Stéphanie Hugues, Sebastian Amigorena

> Les cellules dendritiques capturent, dégradent et présentent les antigènes aux lymphocytes T sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces cellules possèdent la capacité unique d'activer les lymphocytes T naïfs et de déclencher la réponse immunitaire spécifique. Elles sont présentes dans les tissus périphériques sous un état immature, et se différencient, en réponse à un pathogène, en cellules matures capables de déclencher l'activation des lymphocytes T et leur différenciation en cellules effectrices. La plupart des produits bactériens sont détectés par l'organisme grâce à des récepteurs TLR (*Toll-like receptors*) exprimés à la surface des cellules den-

dritiques. L'activation de ces récepteurs entraîne un programme de maturation des cellules dendritiques, se traduisant, au niveau transcriptionnel, par une augmentation de l'expression des molécules du CMH présentant les peptides bactériens et d'autres molécules dites de « co-stimulation » nécessaires à la fonction de stimulation des lymphocytes T. D'autres changements de la machinerie cellulaire responsable de la dégradation et de la présentation des antigènes ont lieu. Pendant ce processus de maturation se produit également une réorganisation du cytosquelette d'actine de la cellule dendritique [1], conduisant à l'émergence d'extensions membranaires (dendrites). Cette acti-

Inserm U.365, Section recherche, Pavillon Pasteur, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France.

sebastian.amigorena@curie.fr

tivité membranaire est généralement sous le contrôle du cytosquelette d'actine, lui-même réglé par les petites protéines de la famille des Rho GTPases [2, 3]. Deux études récemment

publiées dans *Science*, l'une menée par le groupe de C. Watts [4] et la seconde réalisée dans notre laboratoire [5], ont permis de mieux comprendre le rôle de la régulation du cytosquelette d'actine au cours des différentes phases de la présentation antigénique.

L'équipe de C. Watts vient de montrer que l'activation des TLR à la surface des cellules dendritiques immatures conduit à une augmentation de leur capacité de macropinocytose des antigènes et, par conséquent, à une augmentation de la présentation antigénique par les molécules du CMH. Ce phénomène est rapide et transitoire, atteignant un maximum

30 à 45 minutes après l'engagement des TLR, et évolue vers une perte progressive de la capacité d'endocytose. Cette augmentation de l'endocytose des antigènes résulte d'une stimulation de l'activité des extensions membranaires de la cellule dendritique et dépend du cytosquelette d'actine de la cellule dendritique puisqu'elle est inhibée par la cytochalasine D, une substance qui dépolymérise les filaments d'actine. L'activation des TLR, outre la stimulation de l'activité membranaire de la cellule dendritique, conduit à un désassemblage rapide des podosomes, regroupements d'extensions cytoplasmiques riches en actine impliqués dans la migration des cellules [6, 7]. La perte de ces structures podosomiques est transitoire, et la cinétique de leur disparition est inversement corrélée à la phase précoce d'augmentation de la capacité d'endocytose des cellules dendritiques après l'activation des TLR.

Nous avons pu montrer que la régulation du cytosquelette de la cellule dendritique est également importante au cours des phases plus tardives de la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Les cellules dendritiques matures projettent leurs dendrites de façon aléatoire tout autour de leur corps cellulaire au sein des ganglions lymphatiques, jusqu'à ce qu'une dendrite entre en contact avec un lymphocyte T naïf. À la suite de ce contact initial, la cellule dendritique polarise activement ses dendrites vers le lymphocyte T, puis déplace entièrement son corps cellulaire pour aller « enlacer » le lymphocyte T (Figure 1). Ainsi, une interaction très stable s'établit entre la cellule dendritique et le lymphocyte T, et conduit au développement d'une réponse optimale des lymphocytes T. Seules les cellules matures possèdent la capacité d'activer les lymphocytes T naïfs. La polarisation des dendrites vers le lymphocyte T naïf est spécifique de la cellule dendritique mature et n'existe pas pour les cellules dendritiques immatures. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle ce phénomène pouvait être indispensable à l'induction d'une

réponse efficace des lymphocytes T. Le mécanisme moléculaire qui contrôle l'activité du cytosquelette des cellules dendritiques pendant les phases précoces de l'activation de lymphocytes T a été identifié. Deux petites protéines de la famille des Rho GTPases, Rac1 et Rac2, sont en effet nécessaires à l'établissement de ce phénomène de migration de la cellule dendritique vers le lymphocyte T naïf, et par conséquent à la formation d'une interaction très forte entre les deux types cellulaires. En effet, dans des cellules dendritiques déficientes pour Rac1 et Rac2 (*Rac1/2^{-/-}*), ni la formation de dendrites, ni la migration du corps cellulaire vers le lymphocyte T n'ont lieu. Par conséquent, les cellules dendritiques *Rac1/2^{-/-}* qui présentent un antigène particulier induisent une activation et une prolifération déficiente des lymphocytes T spécifiques pour cet antigène. Ces résultats démontrent pour la première fois l'importance des mouvements des dendrites, et donc du cytosquelette d'actine, des

cellules dendritiques pour l'activation des lymphocytes T.

En conclusion, ces deux études suggèrent qu'afin d'augmenter la capture et la présentation des antigènes à la suite d'une stimulation bactérienne, le cytosquelette d'actine de la cellule dendritique est très rapidement désorganisé, particulièrement au niveau des podosomes. Par la suite, alors que la capacité d'endocytose des antigènes de la cellule dendritique diminue progressivement, son cytosquelette, *via* les molécules Rac1 et Rac2, se mobilise à nouveau afin de polariser ses dendrites vers le lymphocyte T et d'induire une activation de ce dernier la plus efficace possible. ♦

Dendritic cell cytoskeleton mobilization to enhance antigen presentation

RÉFÉRENCES

1. Granucci F, Petralia F, Urbano M, et al. The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia. *Blood* 2003; 102: 2940-7.

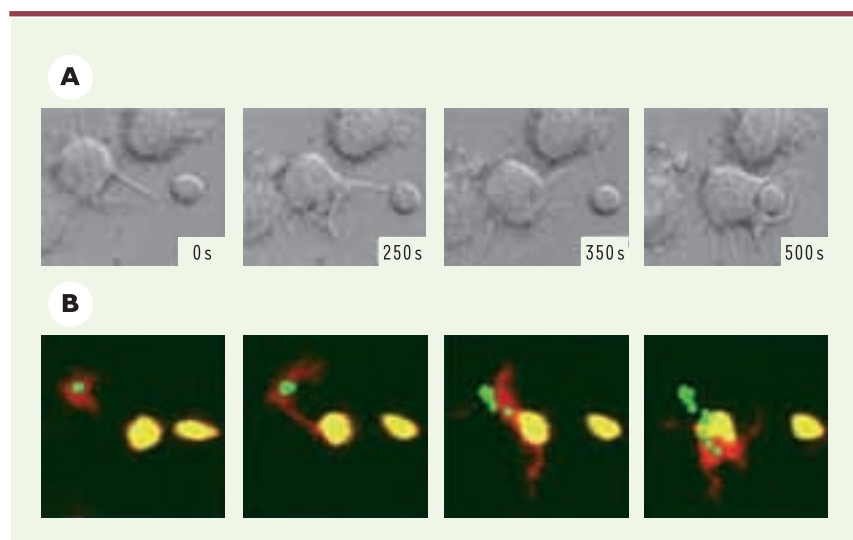


Figure 1. Interactions entre la cellule dendritique et le lymphocyte T. La cellule dendritique projette ses dendrites de façon aléatoire jusqu'à ce qu'une dendrite rencontre un lymphocyte T. Les dendrites se polarisent alors vers le lymphocyte T, et la cellule dendritique se déplace entièrement pour aller « enlacer » le lymphocyte T. Nous avons pu démontrer ce phénomène *in vitro*, grâce à la vidéo-microscopie (A) et, au sein des ganglions lymphatiques, grâce à la microscopie à deux-photons (B). Cette interaction très étroite, entre la cellule dendritique et le lymphocyte T, est dépendante du cytosquelette d'actine de la cellule dendritique et nécessaire au développement d'une réponse optimale des lymphocytes T (d'après [5]).



2. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; 420: 629-35.
3. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004; 116: 167-79.
4. West MA, Wallin RP, Matthews SP, et al. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 2004; 305: 1153-7.

5. Benvenuti F, Hugues S, Walmsley M, et al. Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming. *Science* 2004; 305: 1150-3.
6. West MA, Antoniou AN, Prescott AR, et al. Membrane ruffling, macropinocytosis and antigen presentation in the absence of gelsolin in murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 3450-5.

7. Burns S, Thrasher AJ, Blundell MP, et al. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* 2001; 98: 1142-9.

NOUVELLE

Un virus encore plus géant que les autres

Jean-Michel Claverie

> Un vent nouveau souffle sur la génomique virale, en particulier celle des grands virus à ADN. Depuis l'exploit de l'équipe de Barrell [1], déterminant la séquence complète du cytomégalovirus humain dès 1990, la séquence de nombreux génomes viraux de taille supérieure à 200 kb a été publiée sans provoquer d'émotion particulière, ni remettre en cause la notion de virus dans notre inconscient collectif. À l'exception de quelques spécialistes éclairés, nous voyons toujours les virus comme de très petits sacs de gènes à l'origine douteuse, seulement porteurs de fonctions liées à l'infection et à la réplication de leur génome, et ne méritant pas d'être considéré comme véritablement «vivants». Les plus grands de ces virus (Tableau I) contenaient pourtant plus de 300 gènes propagés par une particule virale à la structure complexe.

Les choses vont peut-être changer avec la publication [2], par notre laboratoire et celui de D. Raoult, de la séquence complète du génome du Mimivirus dont la taille (1,2 million de nucléotides) et la complexité (plus de 1000 gènes) dépassent largement celles d'une vingtaine d'organismes cellulaires (bactéries et archéobactéries) (Tableau I).

Découvert par Rowbotham il y a plus de 10 ans au sein d'amibes colonisant le système de climatisation de l'hôpital de Bradford (Angleterre), la nature virale de *Bradfordcoccus*, maintenant rebaptisé Mimivirus (*microbe mimicking virus*), avait été révélée par les deux

mêmes équipes marseillaises en 2002, au terme d'une analyse préliminaire qui laissait déjà présager un génome d'une taille record [3]. Cette fois, la surprise ne tient plus seulement à la taille exceptionnelle du génome de Mimivirus, mais à la nature même des gènes qu'il contient. Les résultats apportés par l'analyse du génome de Mimivirus sont de trois types. Tout d'abord, la présence de gènes formant l'ossature conservée du génome de toutes les familles de grands virus nucléocytoplasmiques (NCLDV, *nucleocytoplasmic large DNA virus*) a été vérifiée. Par ce critère, Mimivirus apparaît donc comme un virus «normal», membre du groupe des NCLDV. Nous avons ensuite étudié d'une manière détaillée la similarité des gènes de Mimivirus avec leurs homologues dans les différentes familles de NCLDV: *pox-*, *irido-*, *asfar-* et *phycodnaviridae*. Cette étude a montré que Mimivirus, s'il est bien ancré au sein des NCLDV, n'a pas d'affinité particulière avec aucune de ces familles préétablies. Mimivirus est donc le prototype d'une nouvelle famille, les *Mimiviridae*. Mais la plus grande surprise que nous réservait le génome de Mimivirus était la présence d'une trentaine de gènes dont les fonctions n'avaient encore jamais été rencontrées chez un virus. En particulier, nous avons pu formellement identifier huit gènes codant pour des composants essentiels de l'appareil de traduction protéique: quatre *aminoacyl tRNA syn-*

Information génomique et structurale, CNRS UPR 2589, Institut de Biologie structurale et microbiologie, 13402 Marseille Cedex 20, France.

Jean-Michel.Claverie@igs.cnrs-mrs.fr

thetases, à côté de quatre facteurs contrôlant l'initiation, l'élongation et la terminaison de la traduction. Mimivirus possédant par ailleurs six gènes d'ARNt, il apparaît donc comme très significativement impliqué dans la synthèse protéique. L'activité biologique de la *tyrosyl tRNA synthetase* de Mimivirus a été vérifiée expérimentalement. Rappelons-le, cette intrusion de la synthèse des protéines dans le monde viral viole un dogme bien établi: ne possédant pas de ribosomes, les virus n'ont pas vocation à intervenir dans la synthèse de leurs protéines, fabrication qu'ils délèguent à l'organisme cellulaire qu'ils infectent. Déjà écorné par la présence de nombreux ARNt dans des phycodnavirus [4], ce principe est définitivement battu en brèche par la présence d'enzymes-clés de la traduction chez Mimivirus. Les *aminoacyl tRNA synthetases* sont en effet un maillon essentiel dans le respect du code génétique: ce sont elles qui assurent le chargement du bon acide aminé en face des bons codons. La découverte, dans Mimivirus, des premiers homologues viraux de ces enzymes a également une conséquence pratique importante. En effet, à côté des polymérases de l'ADN et de l'ARN, ces enzymes sont parmi les rares protéines communes à

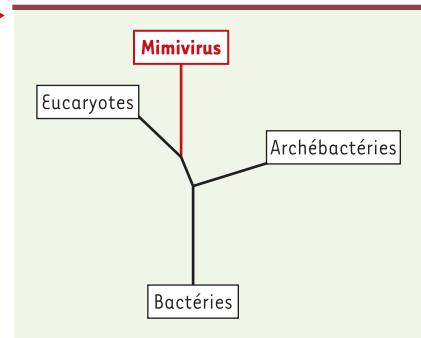
tous les organismes vivants. Elles ont des homologues dans les trois domaines du vivant: archéobactéries, bactéries et eucaryotes. Leur analyse phylogénétique permet donc de brancher l'organisme dont elles proviennent au sein d'un arbre fondamental dont la racine est le dernier ancêtre commun, LUCA (*last universal common ancestor*) pour les initiés. Cette méthode a été utilisée pour y connecter Mimivirus et, par extension, le reste des NCLDV. Et là, la surprise est de taille, car la branche qui mène à ces virus géants diverge très vite des trois grands domaines du vivant déjà définis (Figure 1). Cette position phylogénétique remarquable indique que les organismes qui ont fourni le noyau dur des gènes de Mimivirus existaient déjà à une époque précédant l'émergence des premières cellules eucaryotes. Cet hypothétique quatrième domaine de la vie n'a peut-être survécu qu'à travers le groupe des virus à ADN géants, comme parasite des organismes cellulaires actuels. Même si personne ne croit plus vraiment qu'une simple structure en arbre soit le meilleur modèle pour représenter l'origine de la vie, l'ancre de Mimivirus à une position très ancestrale (3 milliards d'années) est compatible avec plusieurs hypothèses élégantes (mais jusqu'ici sans fondement expérimental) qui établissent un lien direct entre les virus à ADN et l'émergence du noyau cellulaire [5] des eucaryotes. D'objets inanimés, les virus - du moins les grands virus à ADN - pourraient donc passer au statut beaucoup plus respectable d'ancêtre de nos cellules ! Il est clair, en tous les cas, que ces virus géants, dont la taille et la complexité génétique approchent ou dépassent celles d'organismes cellulaires, n'ont plus rien à voir avec le concept de virus «petit sac d'acides nucléiques» sans généalogie propre, enseigné dans les écoles. Une nouvelle appellation (*Archevirus*, *Girus?*) serait la meilleure façon de nous préparer aux futures découvertes de NCLDV encore plus complexes (à suivre dans www.giantvirus.org), qui semblent établir une continuité entre le monde des virus proprement dit et les organismes cellulaires parasites aux génomes les plus réduits. ♦

An extra large giant virus

RÉFÉRENCES

1. Chee MS, Bankier AT, Beck S, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 154: 125-69.
2. Raoult D, Audic S, Robert C, et al. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science Express* 14 octobre 2004.
3. La Scola B, Audic S, Robert C, et al. A giant virus in *Amoebae*. *Science* 2003; 299: 233.
4. Van Etten JL, Graves MV, Müller DG, et al. *Phycodnaviridae*: large DNA algal viruses. *Arch Virol* 2002; 147: 1479-516.
5. Pennisi E. The birth of the nucleus. *Science* 2004; 305: 766.
6. Espagne E, Dupuy C, Huguet E, et al. Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution. *Science* 2004; 306: 286-9.

Figure 1. Mimivirus dans l'arbre de la vie. La position phylogénétique de Mimivirus est calculée sur la base d'une concaténation des gènes universels identifiés dans son génome. Aucun de ces gènes ne montre des signes d'acquisition par transfert latéral.



Organisme	Code	Taille (pb)	Date de publication de la séquence
Mimivirus	Y653733	1 181 404	Novembre 2004
<i>Treponema pallidum</i>	NC_000919	1 138 011	Septembre 2001
<i>Rickettsia prowazekii</i>	NC_000963	1 111 523	Septembre 2001
<i>Chlamydia muridarum</i>	NC_002620	1 072 950	Octobre 2001
<i>Chlamydia trachomatis</i>	NC_000117	1 042 519	Septembre 2001
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	NC_002771	963 879	Octobre 2001
<i>Tropheryma whippelii</i>	NC_004572	927 303	Février 2003
<i>Onion yellows phytoplasma</i>	NC_005303	860 631	Décembre 2003
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NC_000912	816 394	Avril 2001
<i>Mycoplasma mobile</i>	NC_006908	777 079	Mai 2004
<i>Ureaplasma parvum</i>	NC_002162	751 719	Janvier 2000
<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	NC_004344	697 724	Juillet 2003
<i>Buchnera aphidicola</i>	NC_004545	615 980	Janvier 2003
<i>Mycoplasma genitalium</i>	NC_000908	580 074	Janvier 2001
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	NC_005213	490 885	Février 2004
<i>Canarypox virus</i>	NC_005309	359 853	Janvier 2004
<i>Ectocarpus siliculosus virus</i>	NC_002687	335 593	Février 2001
<i>Paramecium bursaria</i>	NC_000852	330 743	Février 1996
<i>Chlorella virus 1</i>			
<i>Shrimp white spot syndrome virus</i>	NC_003225	305 107	Novembre 2001
<i>Human herpesvirus 5</i>	NC_001347	230 287	Mars 1990

Tableau 1. Les plus grands génomes viraux comparés aux plus petits génomes procaryotes. La liste (non exhaustive) des organismes cellulaires dont la complexité génomique est plus faible que celle de Mimivirus est en rouge. Polydnavirus n'est pas indiqué car son génome (0,56 Mb), atypique, ne code pour 156 gènes [6]. Pour les autres organismes, compter un gène pour 1 000 pb. Une séquence partielle (498 kb) du génome du bactériophage G (estimé à 670 kb) est disponible sur le site du *Pittsburgh Bacteriophage Institute* (<http://pbi.bio.pitt.edu/>). Consulter www.giantvirus.org pour suivre l'actualité des virus géants.

Bases moléculaires du tropisme fœtoplacentaire de *Listeria monocytogenes*

Marc Lecuit, Pascale Cossart

> *Listeria monocytogenes*, l'espèce bactérienne responsable de la listériose, a la capacité de franchir trois barrières au cours de l'infection chez l'homme: la barrière intestinale, la barrière hémato-encéphalique et la barrière materno-fœtale. C'est un micro-organisme intracellulaire facultatif¹ capable de survivre et de se multiplier dans les cellules phagocytaires, et d'induire son internalisation dans les cellules non phagocytaires, notamment les cellules d'origine épithéliale humaine. Il a été proposé que cette capacité d'infecter les cellules non phagocytaires confère à *Listeria monocytogenes* son triple tropisme pour le tissu intestinal, le système nerveux central et l'unité fœtoplacentaire [1, 2]. Des études menées *in vitro* ont permis d'identifier les mécanismes moléculaires de l'internalisation de *L. monocytogenes* dans les cellules épithéliales. L'internaline (InlA), lorsqu'elle est ancrée à la surface des bactéries, reconnaît un récepteur exprimé à la surface de la cellule hôte, qui est un marqueur de différenciation épithéliale, la E-cadhérine [3, 4]. Cette interaction est spécifique d'espèce, l'internaline reconnaissant la E-cadhérine humaine, mais ne reconnaissant pas la E-cadhérine murine [5]. Cette observation a conduit à la mise en évidence du rôle crucial du 16^e acide aminé de la E-cadhérine mature, qui est une proline chez les espèces permissives (homme, cobaye, lapin, ovins, bovins) et un acide glutamique chez les espèces non permissives (souris, rat). L'étude par diffraction des rayons X de la

structure tridimensionnelle du complexe internaline/E-cadhérine humaine a permis de démontrer que la proline 16 de la E-cadhérine humaine est absolument nécessaire à la formation de ce complexe moléculaire [6].

Dans un modèle murin transgénique exprimant la E-cadhérine humaine, spécifiquement dans les entérocytes, *L. monocytogenes* acquiert la capacité de traverser la barrière intestinale avec une grande efficacité, démontrant le rôle crucial du couple internaline/E-cadhérine au cours de l'étape initiale de l'infection [7]. Ces résultats expérimentaux ne permettent cependant pas d'affirmer que l'internaline joue un rôle dans l'espèce humaine. De plus, ils ne permettaient pas de savoir si l'internaline joue un rôle dans la traversée des barrières materno-fœtale et hémato-encéphalique qui comportent, comme la barrière intestinale, des cellules exprimant la E-cadhérine.

Démonstration épidémiologique du rôle de l'internaline chez l'homme

Afin d'étudier le rôle éventuel de l'internaline chez l'homme, nous avons adopté une approche épidémiologique [8]. Il existe en effet des isolats de *L. monocytogenes* qui expriment une internaline tronquée, qui n'est plus ancrée à la surface des bactéries et est donc non fonctionnelle. *In vitro*, ces bactéries entrent très peu dans les cellules intestinales

M. Lecuit: Unité des Interactions bactéries-cellules, Inserm U.604, Département de Biologie cellulaire et infection, Institut Pasteur et Service des Maladies infectieuses et tropicales, Université Paris 5, Hôpital Necker-Enfants malades, 149, rue de Sèvres 75743 Paris Cedex 15, France.

P. Cossart: Unité des Interactions bactéries-cellules, Inserm U.604, Département de Biologie cellulaire et infection, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

mlecuit@pasteur.fr

humaines en culture et se comportent comme un mutant n'exprimant pas d'internaline.

Cette étude épidémiologique visait à déterminer la fréquence des isolats exprimant une internaline fonctionnelle ou tronquée au sein de deux échantillons, l'un d'isolats d'origine alimentaire², et l'autre d'isolats cliniques responsables d'infection invasive chez l'homme. Notre hypothèse de travail était que l'existence d'une fréquence plus élevée de souches exprimant une internaline fonctionnelle dans le groupe « isolats d'origine clinique » que dans le

groupe « isolats d'origine alimentaire » constituerait un argument épidémiologique en faveur du rôle de l'internaline au cours de la listériose humaine.

Cette hypothèse a été confirmée sans ambiguïté [8]. En effet, sur les 300 isolats cliniques étudiés, 96 % exprimaient une internaline « sauvage », contre seulement 65 % des 150 isolats d'origine alimentaire ($p < 10^{-7}$, OR: 12,73, IC 95%: 6,27-26,34). De plus, toutes les souches à l'origine d'infections fœtoplacentaires (61/61) et toutes celles responsables d'infections du système nerveux central, sauf une (55/56), exprimaient une internaline « sauvage ». Ces résultats démontrent non seulement le rôle crucial de l'internaline au cours de la listériose humaine, mais suggèrent également

¹ Micro-organisme intracellulaire facultatif: qui peut survivre et se multiplier en position intracellulaire et extracellulaire, par opposition aux micro-organismes intracellulaires stricts.

² On ne connaît pas *a priori* la pathogénicité des souches alimentaires, et les aliments contaminés sont retirés de la vente. On considère que ces souches alimentaires sont un bon reflet des souches auxquelles est exposée la population humaine, qu'elles soient pathogènes ou non.



qu'elle est impliquée dans la traversée des barrières fœtoplacentaire et hémato-encéphalique. De plus, toutes les souches de sérovar 4b³ expriment une internaline sauvage: ce résultat apporte donc une explication moléculaire à la prédominance de ce sérovar dans les cas de listériose humaine et est en faveur d'une pathogénicité accrue de ce sérovar pour l'espèce humaine. Enfin, ces résultats permettent de proposer d'utiliser l'expression de l'internaline comme un marqueur moléculaire de virulence pour l'homme des souches de *L. monocytogenes* isolées de sources alimentaires.

Rôle de l'internaline dans la traversée de la barrière placentaire

La barrière fœtoplacentaire comporte des cellules exprimant la ϵ -cadhérine: les cellules cytotrophoblastiques et les cellules épithéliales amniotiques. Un modèle animal transgénique exprimant en lieu et place de la ϵ -cadhérine murine la ϵ -cadhérine humaine n'est pas encore disponible [2]; il permettrait d'étudier le rôle de l'internaline à toutes les étapes du processus infectieux *in vivo* où *L. monocytogenes* est en contact avec des tissus dont les cellules expriment la ϵ -cadhérine.

Le placenta humain, qui est de type discoïde, multivilleux et hémomonochorial (Figure 1), est d'organisation voisine de celle du placenta des autres primates, mais relativement différente de nombreuses autres espèces animales. Expulsé au moment de l'accouchement, que la grossesse ait été normale ou pathologique (notamment en cas d'infections néonatales entraînant un avortement ou un accouchement prématuré), le placenta peut être étudié au laboratoire. Outre l'histologie classique, la culture primaire de cellules originaires du placenta humain ou d'explants de villosités placentaires sont réalisables.

À partir de coupes de placenta et d'amnios (membrane amniotique) issus de

sept patientes ayant eu une listériose maternofœtale, nous avons pu mettre en évidence que *L. monocytogenes* existait à l'état libre dans la chambre intervillieuse et infectait les villosités placentaires, notamment au niveau syncytiotrophoblastique, pour ensuite former des micro-abcès au sein des axes villositaires. En revanche, au niveau amniotique, les bactéries semblaient n'infecter l'épithélium amniotique qu'à partir du liquide amniotique. Ces résultats semblaient donc favoriser le scénario d'un franchissement de la barrière maternofœtale au niveau placentaire plutôt qu'amniotique. La ϵ -cadhérine est localisée non seulement au niveau du cytotrophoblaste, comme cela avait été précédemment décrit, mais aussi au niveau du syncytiotrophoblaste, notamment sur sa face apicale (Figure 2A), en contact direct avec le sang maternel. En conséquence, *L. monocytogenes*, en position extracellulaire dans le sang maternel, peut rencontrer son récepteur au niveau du placenta. À partir de cellules trophoblastiques primaires humaines et d'explants placentaires

humains, nous avons démontré la perméabilité du syncytiotrophoblaste à l'infection par *L. monocytogenes* (Figure 2B). Nous avons également reproduit au sein des explants placentaires infectés *ex vivo* des abcès villex semblables à ceux observés dans les placentas issus de patientes ayant eu une listériose maternofœtale (Figure 2C) et, enfin, démontré que l'invasion du syncytiotrophoblaste et la formation des abcès villex nécessitent la présence de l'internaline [9].

Conclusions

Ces résultats démontrent que *L. monocytogenes* utilise une stratégie commune pour reconnaître et traverser les barrières intestinale et placentaire. Ils démontrent également qu'à l'immunodépression associée à la grossesse s'associe un mécanisme spécifique qui permet à *L. monocytogenes* d'interagir avec le tissu placentaire. En effet, les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux et les cellules épithéliales des plexus choroïdes expriment la ϵ -cadhérine. Ainsi, l'invasion du système nerveux central par *L. monocytogenes* pourrait également

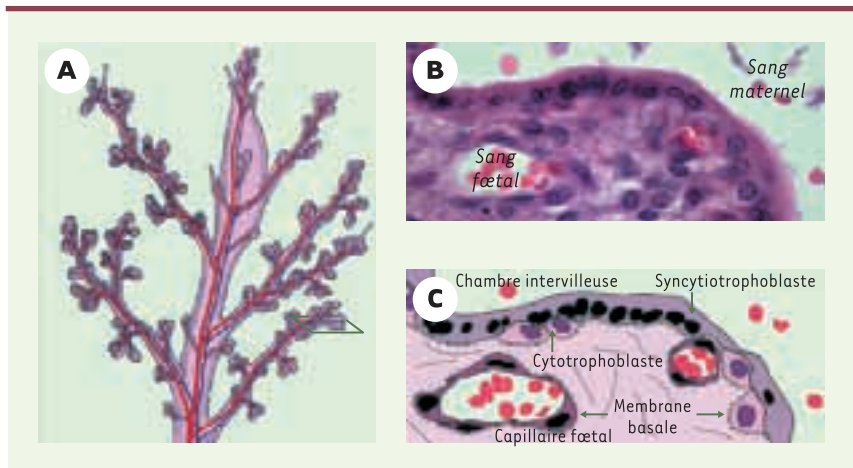


Figure 1. Anatomie de la barrière maternofœtale chez l'homme. A. Schéma des villosités placentaires. B, C. Section d'une villosité placentaire colorée à l'hématoxyline-éosine (B), et schéma histologique correspondant (C). La chambre intervillieuse est normalement remplie de sang maternel. Le syncytiotrophoblaste multinucléé, qui constitue un véritable syncytium, recouvre les villosités. Les cellules cytotrophoblastiques sont mitotiquement actives, et donnent naissance au syncytiotrophoblaste par un processus de différenciation et de fusion. Le trophoblaste est séparé de l'axe des villosités contenant les vaisseaux fœtaux par une membrane basale. La barrière placentaire séparant les circulations maternelle et fœtale est donc matérialisée par l'espace tissulaire s'étendant de la membrane apicale du syncytiotrophoblaste aux cellules endothéliales des capillaires fœtaux.

³ Taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce et caractérisé par ses propriétés antigéniques.



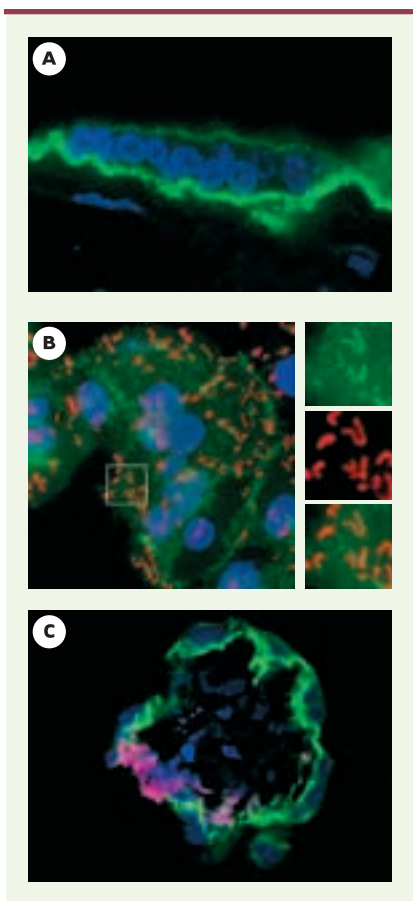
faire intervenir l'interaction entre l'internaline et la E-cadhérine. Cette interaction constituerait alors non seulement la clé du tropisme d'hôte de *L. monocytogenes*, mais également celle de son tropisme d'organe. D'autres micro-organismes pathogènes pour l'homme, tels que *Toxoplasma gondii*,

le cytomégalo-virus ou *Treponema pallidum*⁴ utilisent une porte d'entrée muqueuse et possèdent un tropisme pour le système nerveux central et l'unité fœtoplacentaire. Une approche visant à étudier les similitudes et les spécificités de ces trois barrières pourrait permettre une meilleure compréhension des stratégies utilisées par les micro-organismes pathogènes, afin de les circonvenir. ♦

Molecular basis of *Listeria monocytogenes* fetoplacental tropism

⁴ Espèce bactérienne responsable de la syphilis.

◀ **Figure 2. Rôle de l'internaline dans la traversée de la barrière placentaire.** **A.** Coupe d'une villosité placentaire humaine centrée sur le syncytiotrophoblaste, immunomarcuée avec un anticorps dirigé contre la E-cadhérine humaine. La E-cadhérine apparaît en vert, les noyaux en bleu. **B.** Adhérence et entrée de bactéries exprimant l'internaline dans du syncytiotrophoblaste humain en culture. Les bactéries apparaissent en rouge, la E-cadhérine en vert, les noyaux en bleu. Il existe un recrutement de E-cadhérine au site d'entrée des bactéries dans le syncytiotrophoblaste. **C.** Coupe d'une villosité placentaire infectée *ex vivo* par *Listeria monocytogenes*. Les bactéries ont envahi le syncytiotrophoblaste, franchi la barrière placentaire, et permis la constitution de micro-abcès villositaires semblables à ceux observés au sein de placentas issus de femmes enceintes ayant eu une listériose materno-fœtale.



REMERCIEMENTS

Nous remercions Christine Jacquet, Charles Babinet, Sandrine Vandormael-Pournin, Michael Nelson, Michel Huerre, Huot Kuhn et Marie-Cécile Vacher-Lavenue pour leur contribution aux résultats présentés dans cet article. Nous remercions également la Fondation Philips pour sa participation au financement de ce travail.

RÉFÉRENCES

- Cossart P, Pizarro-Cerda J, Lecuit M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 23-31.
- Lecuit M, Cossart P. Genetically-modified-animal models for human infections: the *Listeria* paradigm. *Trends Mol Med* 2002; 8: 537-42.
- Gaillard JL, Berche P, Frehel C, et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. *Cell* 1991; 65: 1127-41.
- Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, et al. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 1996; 84: 923-32.
- Lecuit M, Dramsi S, Gottardi C, et al. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J* 1999; 18: 3956-63.
- Schubert WD, Urbanke C, Ziehm T, et al. Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* 2002; 111: 825-36.
- Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, et al. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 2001; 292: 1722-5.
- Jacquet C, Doumith M, Gordon JL, et al. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis* 2004; 189: 2094-100.
- Lecuit M, Nelson DM, Smith SD, et al. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6152-7.

NOUVELLE

« Cycler » sans cycline D

Valérie Lobjois

> La division des cellules eucaryotes est réglée par des complexes cycline-CDK (kinases dépendantes des cyclines) qui contrôlent la progression des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire (Figure 1). Ces CDK sont, comme leur nom l'indique, en partie activées par

leur association aux sous-unités régulatrices, les cyclines, dont l'abondance varie au cours du cycle cellulaire. L'activité de ces complexes est inhibée par deux familles d'inhibiteurs (CKI): les CKI de la famille des Ink4 inhibent CDK4 et CDK6; ceux de la famille Cip/Kip inhi-

Centre de Biologie du développement, CNRS UMR 5547, IEFG IFR109, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.
lobjois@cict.fr

bent l'activité de tous les complexes cycline-CDK [1]. La progression des cellules de mammifères en phase G1, dépendante des signaux mitogènes, est contrôlée par l'association des cyclines D (D1, D2 et D3) aux kinases CDK4 et CDK6, ces complexes phosphorylant la

protéine du rétinoblastome pRB (Figure 1) [1].

Leur expression étant sensible aux signaux mitogènes [1], il est admis que les cyclines D couplent la signalisation extracellulaire à la machinerie du cycle. Afin d'étudier *in vivo* la fonction des cyclines D et de CDK4/6, des lignées murines invalidées pour chacun de ces gènes avaient été établies [2-5]. Ces souris sont pour la plupart viables, les phénotypes observés étant restreints à certains organes (Tableau 1). Ces données suggéraient une redondance fonctionnelle entre les cyclines D1, D2 et D3 et entre CDK4 et CDK6 mais elles n'avaient pas permis de préciser leur rôle physiologique, éventuellement spécifique d'un tissu, ni de savoir si ces cyclines et CDK étaient les seuls médiateurs entre la signalisation extracellulaire et le cycle cellulaire.

Récemment, l'obtention de souris invalidées pour les trois cyclines D (*D1/2/3*^{-/-}) ou pour *CDK4* et *CDK6* (*CDK4/6*^{-/-}) a apporté de nouveaux éléments de

réponse à ces questions [4, 6]. Les premières meurent à 16,5 jours et les secondes à 18,5 jours de développement. Dans les deux cas, les embryons ont une taille réduite mais la majorité des organes ont une morphogenèse normale. Seul un défaut cardiaque est décrit pour les embryons *D1/2/3*^{-/-}. Cette létalité embryonnaire est due à une anémie sévère consécutive à un défaut majeur d'hématopoïèse, lié à une diminution du taux de prolifération spécifique des cellules hématopoïétiques (Tableau 1). Ainsi, il est surprenant de constater que, dans ces embryons, seules les cellules du lignage hématopoïétique prolifèrent de façon dépendante des complexes cycline D-CDK4/6, la majorité des tissus étant indépendants de leur activité.

Les complexes cycline D-CDK4/6 étant considérés comme les capteurs de la signalisation extracellulaire lors de la ré-entrée dans le cycle des cellules quiescentes, la réponse aux signaux extracellulaires de fibroblastes dérivés

des deux types d'embryons mutants a été étudiée. En culture, ces cellules prolifèrent, mais moins activement que des cellules sauvages. Elles répondent cependant à une stimulation mitogénique, puisque, arrêtées en phase de quiescence (G0) par privation en sérum, elles ont une cinétique d'entrée en phase S, après stimulation, similaire à celle de cellules sauvages.

D'un point de vue moléculaire, M. Malumbres *et al.* montrent que dans les cellules *CDK4/6*^{-/-}, un complexe cycline D-CDK2 se forme et est, en partie, responsable de la phosphorylation de pRB, permettant ainsi la prolifération de ces cellules [4]. Cependant, les auteurs précisent que leurs expériences ne sont pas suffisantes pour prouver une compensation totale de la perte des activités CDK4 et CDK6 par CDK2. K. Kozar *et al.* montrent que les fibroblastes cycline *D1/2/3*^{-/-} ont une prolifération dépendante de CDK2 [6]. Dans ces cellules, après stimulation sérique, les complexes cycline E- et

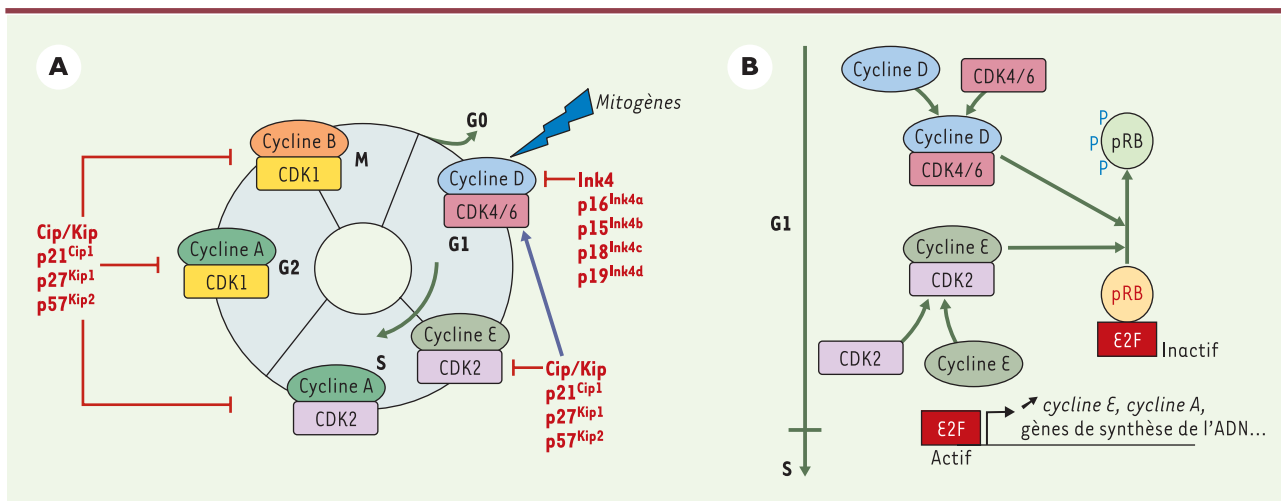


Figure 1. Cycle cellulaire chez les mammifères et complexes cyclines-CDK. **A.** Le cycle cellulaire est composé de quatre phases G1, S, G2 et M. La progression entre chaque phase est contrôlée par différents complexes cycline-CDK. L'induction de l'expression des cyclines D par des signaux mitogènes est nécessaire à la progression des cellules en début de phase G1. L'activité des complexes cycline-CDK est inhibée par deux familles d'inhibiteurs de CDK : la famille des protéines Ink4 (p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} et p19^{Ink4d}) est spécifique des complexes cycline D-CDK4/6 ; les protéines de la famille Cip/Kip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}) agissent sur tous les complexes cycline-CDK. L'association de p27^{Kip1} ou p21^{Cip1} aux complexes cycline D-CDK4/6 libère les complexes cycline E-CDK2, alors actifs. **B.** Dans les cellules de mammifères, la progression des cellules en début de phase G1, dépendante des signaux mitogènes, est contrôlée par l'association des cyclines D (D1, D2 et D3) aux kinases CDK4 et CDK6. Quand ils sont actifs, les complexes cycline D-CDK4/6 déclenchent la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRB), poursuivie en fin de phase G1 par les complexes cycline E-CDK2. Sous sa forme hyperphosphorylée, pRB est inactive et libère le facteur de transcription E2F, permettant ainsi l'expression des gènes essentiels à la transition G1-S dont le gène *cycline E*.



cycline A-CDK2 sont activés avec une cinétique identique à celle observée dans les cellules sauvages et l'activité de ces complexes suffit à inactiver pRB. Dans les deux types d'inactivations étudiées, les cellules entrent en phase S malgré une phosphorylation incomplète de pRB.

Ainsi, ces études montrent que les complexes cycline D-CDK4/6 ne sont pas indispensables à la prolifération et à l'entrée dans le cycle cellulaire de cellules quiescentes et révèlent l'existence d'un mécanisme indépendant des cyclines D, capable de coupler l'acti-

tion des complexes impliquant la kinase CDK2 à la signalisation extracellulaire. Néanmoins, l'absence des cyclines D se traduit tout de même par une susceptibilité réduite des cellules à une transformation oncogénique par Ras et Myc. De plus, le modèle actuellement admis pour

expliquer la progression en phase G1 suggère une séquestration de l'inhibiteur p27^{Kip1} par les complexes cycline D-CDK4/6 (Figure 1). Or, dans les cellules mutantes *D1/2/3*^{-/-} et *CDK4/6*^{-/-}, les concentrations de p21^{Cip1} et p27^{Kip1} sont diminuées et l'association de p27^{Kip1} à CDK2 n'est apparemment pas modifiée.

Ces résultats bouleversent donc les modèles établis, puisque, de façon inattendue, les mutants *D1/2/3*^{-/-} et *CDK4/6*^{-/-} ne montrent pas d'anomalie majeure de la prolifération. Au contraire, l'étude de ces mutants montre que la majorité des cellules de mammifères peut proliférer indépendamment des complexes cycline D-CDK4/6. La nature des mécanismes compensateurs et leur implication dans l'intégration des signaux extracellulaires avec le contrôle de la prolifération restent maintenant à élucider.

Ces études révèlent également l'existence d'une spécificité de fonction de CDK4/6 et des cyclines D dans les cellules hématopoïétiques. Or, chez la souris et le poulet, on sait que les cyclines D présentent une expression régionalisée et dynamique au

Génotype	Principaux phénotypes <i>in vivo</i>	Phénotypes observés en culture
<i>D1</i> ^{-/-}	Létalité post-natale Taille réduite Anomalies du comportement et troubles neurologiques Réduction du nombre de cellules de la rétine Défaut de lactation due à une absence de prolifération de l'épithélium mammaire	Fibroblastes embryonnaires : croissance réduite mais prolifération normale
<i>D2</i> ^{-/-}	Femelles stériles Certains mâles sont fertiles mais présentent une réduction de taille des testicules Réduction de taille du cervelet Réduction du nombre de cellules β-pancréatiques	Lymphocytes B : phase G1 prolongée.
<i>D3</i> ^{-/-}	Défaut d'expansion des lymphocytes T immatures	Lymphocytes T : diminution de la prolifération
<i>D1/D2</i> ^{-/-}	Taille réduite Défaut de développement du cervelet	
<i>D1/3</i> ^{-/-}	Létalité néonatale (apparemment due à des atteintes neurologiques) Taille réduite Rétine hypoplasique	
<i>D2/3</i> ^{-/-}	Létalité embryonnaire (18,5 jours de développement) Taille réduite Anémie sévère	
<i>D1/2/3</i> ^{-/-}	Létalité embryonnaire (16,5 jours de développement) Diminution de prolifération des différentes lignées hématopoïétiques Taille réduite Anomalies cardiaques	Cellules hématopoïétiques et fibroblastes : diminution de la prolifération, sensibilité réduite aux oncogènes
<i>CDK4</i> ^{-/-}	Viables (homozygotes présents avec un faible <i>ratio</i>) Taille réduite Anomalies du comportement et troubles neurologiques Mâles fertiles mais présentant une réduction de taille des testicules Diminution du nombre de cellules β-pancréatiques	Fibroblastes embryonnaires : diminution de la prolifération
<i>CDK6</i> ^{-/-}	Défaut d'expansion des lymphocytes T immatures	Lymphocytes T : diminution de la prolifération
<i>CDK4/6</i> ^{-/-}	Létalité embryonnaire (entre 14,5 et 18,5 jours de développement) Diminution de prolifération des différentes lignées hématopoïétiques Taille réduite	Cellules T et fibroblastes : diminution de la prolifération

Tableau I. Phénotypes des mutants dont les gènes codant pour les cyclines D1, D2 et D3 et CDK4 et CDK6 ont été invalidés (d'après [10]).

cours du développement [7-9]. Les analyses phénotypiques des souris invalidées pour CDK4/6 et les cyclines D ayant été réalisées à des stades tardifs du développement, des phénomènes compensatoires ont pu se produire. L'étude de stades plus précoces du développement ainsi que l'inactivation ciblée dans le temps de ces gènes devraient permettre de préciser les fonctions et les spécificités tissulaires de ces acteurs du cycle cellulaire. ♦

Cycling without D-type cyclin

REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr B. Ducommun pour son aide à la rédaction du manuscrit.

RÉFÉRENCES

1. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-12.
2. Rane SG, Dubus P, Mettus RV, et al. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β -islet cell hyperplasia. *Nat Genet* 1999; 22: 44-52.
3. Tsutsui T, Hesabi B, Moons DS, et al. Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7011-9.
4. Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, et al. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 2004; 118: 493-504.
5. Ciemerych MA, Kenney AM, Sicinska E, et al. Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev* 2002; 16: 3277-89.
6. Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, et al. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 2004; 118: 477-91.
7. Lobjois V, Benazeraf B, Bertrand N, et al. Specific regulation of cyclins D1 and D2 by FGF and Shh signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development. *Dev Biol* 2004; 273: 195-209.
8. Wianny F, Real FX, Mummery CL, et al. G1-phase regulators, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3: up-regulation at gastrulation and dynamic expression during neurulation. *Dev Dyn* 1998; 212: 49-62.
9. Aguzzi A, Kiess M, Ruedi D, Hamel PA. Cyclins D1, D2 and D3 are expressed in distinct tissues during mouse embryogenesis. *Transgenics* 1996; 2: 29-39.
10. Pagano M, Jackson PK. Wagging the dogma: tissue-specific cell cycle control in the mouse embryo. *Cell* 2004; 118: 535-8.

NOUVELLE

Rod-derived cone viability factor : un espoir de thérapie des dégénérescences rétinienne ?

Thierry Lèveillard, Saddek Mohand-Saïd, Olivier Poch, José-Alain Sahel

> Les rétinopathies pigmentaires, qui affectent 40 000 personnes en France, font partie d'une large liste d'affections orphelines jusqu'ici incurables. Chez les personnes atteintes, les bâtonnets sont détruits et, en conséquence, les premiers signes cliniques sont une cécité nocturne et un champ visuel qui se rétrécit en périphérie. Le champ visuel diminue progressivement jusqu'à rendre la vision «tubulaire», traduisant la perte secondaire des cônes qui assurent non seulement la vision colorée, mais aussi la vision à contraste élevé, l'acuité visuelle et toutes les fonctions visuelles en atmosphère lumineuse normale. À mesure que la maladie progresse, la vision centrale se réduit, menaçant le sujet de cécité. L'hétérogénéité génétique des rétinopathies pigmentaires (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet>) et le mode autosom-

me dominant de certaines formes représentent une limitation importante à la thérapie génique corrective. Nous avons privilégié une approche par neuroprotection des cônes, plus à même d'être généralisable à de nombreux gènes et modes de transmission. Les mutations décrites depuis 1990 dans les dystrophies héréditaires rétinienne humaines affectent, dans une très grande proportion, des gènes codant pour des protéines localisées dans le segment externe des bâtonnets [1]. Le lien entre la perte des bâtonnets et la raréfaction des cônes a été étudié sur un modèle murin, la souris *rd1*, qui porte une mutation sur le gène codant pour la phosphodiesterase

T. Lèveillard,
S. Mohand-Saïd, J.A. Sahel :
Inserm U.592, Laboratoire de
Physiopathologie cellulaire
et moléculaire de la rétine,
Université Pierre et Marie
Curie, Hôpital Saint-Antoine,
Bâtiment Kourilsky, 184, rue
du Faubourg Saint-Antoine,
75571 Paris Cedex 12,
France.
O. Poch : Institut de
Génétique et de biologie
moléculaire et cellulaire,
BP 163, 67404 Illkirch Cedex,
CU de Strasbourg, France
leveilla@st-antoine.inserm.fr

des bâtonnets [2]. Il s'agit d'une forme récessive de dégénérescence séquentielle bâtonnets-cônes retrouvée chez l'homme. Nos travaux ont montré que, lorsque des couches pures en photorécepteurs étaient transplantées dans l'espace sous-rétinien de souris *rd1* âgées de 5 semaines (à cet âge, il reste très peu de bâtonnets [$< 0,02\%$] mais encore la plupart des cônes), le transplant induit la survie d'un nombre de cônes significativement supérieur (en moyenne 40%, $p < 0,001$) à celui relevé dans la rétine de l'œil congénère, non traitée [3]. Cet effet trophique, constaté à distance du transplant, suggérait l'existence de facteurs diffusibles libérés par les cellules greffées. Des tests effectués *in vitro* par coculture de rétines *rd1* et de rétines normales, ont confirmé cette hypothèse [4, 5]. Des travaux de purification partielle ont montré que l'activité de viabi-



lité est de nature protéique [6]. Ces facteurs protéiques présomptifs ont été désignés sous le nom de *rod-derived cone viability factors* (RdCVF) [7]. La dégénérescence des bâtonnets chez la souris *rd1* - et probablement chez les humains souffrant de rétinopathie pigmentaire - aboutirait à la raréfaction de ces facteurs de viabilité et ainsi, progressivement, à la perte des cônes.

Pour identifier les RdCVF, nous avons développé une approche systématique par clonage d'expression fondée sur un test de viabilité des cônes (Figure 1) [8]. Le modèle utilisé est une culture de cellules rétinienne d'embryons de poulet, cultivées à faible densité et en l'absence

d'agents inducteurs, ce qui conduit à une différenciation en photorécepteurs par défaut de signal [9]. Ces photorécepteurs sont majoritairement des cônes, contrairement à ce qui est observé dans des cultures de cellules de mammifères. Une dégénérescence des cellules post-mitotiques est observée sur une période de plusieurs jours, dégénérescence qui est ralentie lorsque ces cultures sont réalisées en présence de milieu conditionné préparé à partir d'explants rétinien de souris normales. Une banque d'expression de rétines de souris a été construite. Les plasmides de cette banque ont été transfectés dans des cellules COS et les milieux conditionnés issus de ces cellules

transfectées ont ensuite été récoltés et transférés dans les puits des cultures de cônes dont la viabilité a été mesurée. Un clone qui présentait le plus grand effet a été isolé; il contenait une phase codante correspondant à une nouvelle protéine sécrétée de 109 acides aminés, que nous avons nommé *rod-derived cone viability factor* [8].

RdCVF présente une homologie avec la famille des thiorédoxines. Le polypeptide isolé est un variant d'épissage d'un nouveau gène (*Txn16*), tronquée dans le motif thiorédoxine et ne possédant pas l'activité thiol-oxydoréductase [10]. L'expression du messenger de RdCVF, qui est restreint à la rétine, est perdue après la perte des bâtonnets. La protéine est retrouvée dans les segments externes des bâtonnets et dans l'espace extracellulaire entourant les photorécepteurs. À plus haute résolution, un marquage plus intense, colocalisant avec la surface des cônes, suggère l'existence d'un site d'affinité pour RdCVF à la surface des cônes [8]. Sur le plan fonctionnel, l'injection de RdCVF purifié dans l'espace sous-rétinien de souris *rd1* après dégénérescence des bâtonnets, aboutit à une protection significative des cônes, sur une période d'une quinzaine de jours. *In vitro*, l'élimination par immunodéplétion de RdCVF résulte en une forte diminution de l'effet protecteur induit par le milieu conditionné.

RdCVF possède les caractéristiques d'un facteur sécrété par les bâtonnets, nécessaire à la survie des cônes, et représente une nouvelle piste thérapeutique pour les rétinites pigmentaires. RdCVF est le second membre d'une famille de protéines représentant des formes tronquées des thiorédoxines avec les caractéristiques des facteurs de croissance [11]. Il semble que, durant l'évolution, le motif protéique thiorédoxine, une protéine sécrétée, ait évolué pour assurer de nouvelles fonctions de communication intercellulaire. ♦

Rod-derived cone viability factor: a clue for therapy of retinitis pigmentosa?

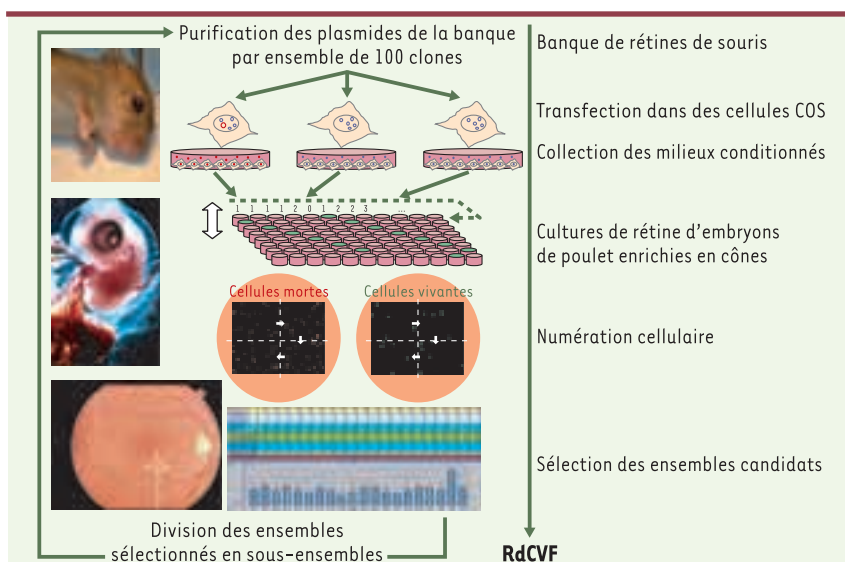


Figure 1. Procédure du clonage par expression, utilisée pour mettre en évidence le rod-derived cone viability factor (RdCVF). Les cellules rétinienne d'embryons de poulet, cultivées à faible densité et en l'absence d'agents inducteurs, se différencient en photorécepteurs par défaut de signal. Ces cellules sont majoritairement des cônes, contrairement à ce qui est observé dans des cultures de cellules de mammifères. En quelques jours, une dégénérescence des cellules post-mitotiques est observée, dégénérescence qui est ralentie en présence de milieu conditionné préparé à partir d'explants rétinien de souris normales. Une banque d'expression de rétines de souris a été réalisée et les plasmides transfectés par ensembles de 100 clones dans des cellules COS. Les milieux conditionnés issues de ces cellules transfectées ont été ensuite récoltés et transférés dans les puits des cultures de cônes. Après huit jours, la viabilité des cellules a été mesurée par des sondes fluorescentes grâce à une plate-forme de comptage automatisé. Les ensembles (100 clones) présentant une activité de survie ont été divisés en sous-ensembles de 10 clones, testés à nouveau. Dans un troisième temps, les clones individuels ont été testés afin d'identifier l'ADNc responsable de l'effet de survie observé. Cette procédure a conduit au criblage de 210 000 clones individuels; elle a permis d'isoler un clone qui contenait une phase codante correspondant à une nouvelle protéine sécrétée, le *rod-derived cone viability factor* (RdCVF).

RÉFÉRENCES

1. Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, Dryja TP. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1219-27.
2. Carter-Dawson LD, La Vail MM, Sidman RL. Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978; 17: 489-98.
3. Mohand-Saïd S, Hicks D, Léveillard T, et al. Selective transplantation of rods delays cone loss in a retinitis pigmentosa model. *Arch Ophthalmol* 2000; 118: 807-11.
4. Mohand-Saïd S, Deudon-Combe A, Hicks D, et al. Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8357-62.
5. Sahel JA., Mohand-Saïd S, Léveillard T, et al. Rod-cone interdependence: Implications for therapy of photoreceptor cell diseases. *Prog Brain Res* 2001; 131: 649-61.
6. Fintz AC, Audo I, Hicks D, et al. Partial characterization of retina-derived cone neuroprotection in two culture models of photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 818-25.
7. Léveillard T, Mohand-Saïd S, Fintz AC, et al. The search for rod-dependent cone viability factors, secreted factors promoting cone viability. *Novartis Found Symp* 2004; 255: 117-27.
8. Léveillard T, Mohand-Saïd S, Lorentz O, et al. Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet* 2004; 36: 755-9.
9. Adler R, Hatlee M. Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis. *Science* 1989; 243: 391-3.
10. Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6102-9.
11. Pekkari K, Avila-Carino J, Gurunath R, et al. Truncated thioredoxin (Trx80) exerts unique mitogenic cytokine effects via a mechanism independent of thiol oxido-reductase activity. *FEBS Lett* 2003; 539: 143-8.

NOUVELLE

Un nouveau rôle pour l'aquaporine 3

Gaëlle Bellemère, Otto Von Stetten, Thierry Oddos

Laboratoire de pharmacotoxicologie, Johnson & Johnson Consumer France, Campus de Maigremont, 27100 Val-de-Reuil, France. GBelleme@jacfr.JNJ.com

> Depuis la découverte de l'aquaporine 1 par l'équipe de P. Agre [1], récompensée par le Prix Nobel de chimie en 2003, plus de 200 aquaporines ont été identifiées dans le monde vivant, dont 11 chez les mammifères [2]. Les aquaporines sont constituées de six domaines transmembranaires qui délimitent un canal central présentant une structure typique en sablier [3]. La perméabilité de ce canal permet de distinguer deux grands groupes d'aquaporines: les aquaporines dites «classiques», perméables à l'eau *stricto sensu*, et les aquaglycéroporines, perméables à l'eau, au glycérol ainsi qu'à d'autres solutés de petite taille [4]. Localisées dans de nombreux épithéliums, les aquaporines contribuent essentiellement aux mécanismes d'absorption/excrétion de l'eau et participent à son homéostasie. À titre d'exemple, citons l'aquaporine 2, impliquée dans l'absorption rénale de l'eau et dont les mutations sont à l'origine de 10 % des diabètes néphrogéniques insi-

pides héréditaires [5]. Cependant, des études récentes indiquent que les aquaporines ne seraient pas cantonnées au seul rôle de «passeuses d'eau» des cellules.

L'aquaporine 3 est une aquaglycéroporine présente dans les couches basales des épithéliums de nombreux organes tels que le rein, le poumon ou l'intestin [2]. Dans la peau, l'aquaporine 3 est localisée dans les kératinocytes [6]. Les souris dont le gène de l'aquaporine 3 a été invalidé présentent une perte d'élasticité de l'épiderme, une altération de la barrière cutanée ainsi qu'une diminution de la quantité d'eau contenue dans le *stratum corneum* à l'origine d'une sécheresse prononcée de la peau [7]. L'ensemble de ces observations plaide en faveur d'un rôle de l'aquaporine 3 dans l'homéostasie hydrique de l'épiderme. Cependant, une étude menée par X. Zheng et W. Bollinger-Bollag suggère que l'aquaporine 3, par sa perméabilité au glycérol et en interagissant avec la phospholipase D, pourrait

également intervenir dans les mécanismes de prolifération et de différenciation des kératinocytes [8].

Les auteurs ont démontré, dans des kératinocytes en culture, que l'aquaporine 3 est détectée dans des fractions enrichies en cavéoline 1. Les cavéoles sont impliquées dans la signalisation cellulaire. En particulier, elles contribuent à la régulation de la NO synthase endothéliale et jouent un rôle dans la signalisation calcique [9]. La localisation de l'aquaporine 3 dans les cavéoles permet donc d'envisager une contribution éventuelle de ce canal à certains mécanismes de transduction du signal. À l'appui de cette hypothèse, les auteurs montrent que l'aquaporine 3 coprécipite avec la phospholipase D2, et ce même en présence de détergent, ce qui suggère l'existence d'une interaction protéique directe entre les deux protéines dans les cavéoles. La phospholipase D2 hydrolyse la phosphatidylcholine et engendre l'acide phosphatidique et la choline. En pré-



sence de glycérol, l'hydrolyse de la phosphatidylcholine par la phospholipase D2 conduit à la formation de phosphatidylglycérol. Or, le phosphatidylglycérol est un activateur de certaines isoformes de la protéine kinase C (PKC), dont certaines interviennent dans la régulation du cycle cellulaire [10]. En particulier, dans l'épiderme, l'activation de la PKC α induit l'expression de protéines spécifiques des couches basales de l'épiderme telles que la filaggrine et la lorïcine et contrôle la prolifération des kératinocytes [11]. À l'inverse, l'activation de la PKC θ induit l'expression de protéines spécifiques des couches supérieures de l'épiderme, telles que l'involucrine et la transglutaminase, indiquant un rôle de cette kinase dans l'arrêt de la prolifération et la différenciation des kératinocytes [11]. L'aquaporine 3, en établissant un couplage fonctionnel avec la phospholipase D2, pourrait faciliter la formation de phosphatidylglycérol et être impliquée dans la prolifération ou la différenciation des kératinocytes de l'épiderme (Figure 1). Afin de confirmer cette hypothèse, X. Zheng et W. Bollinger-Bollag ont étudié les variations de l'expression et de l'activité biologique de l'aquaporine 3 au cours de la différenciation des kératinocytes.

La différenciation des kératinocytes est placée sous le contrôle de plusieurs messagers dont les ions Ca^{2+} et la 1,25-dihydroxyvitamine D3. Ainsi, l'application de ces deux médiateurs sur des kératinocytes en culture entraîne une diminution très importante de l'expression de l'aquaporine 3 (à l'échelle de l'ARNm et de la protéine) alors que les concentrations de phospholipase D2 demeurent inchangées. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs démontrant que l'aquaporine 3 est exprimée principalement par les cellules des couches basales (prolifératives) de l'épiderme, et non par les cellules différenciées des couches supérieures [10]. Il est important de noter que certaines protéines de la famille de p53, telles que p63, sont exprimées exclusivement par les kératinocytes en phase proliférative [11]. Or, la séquence promotrice du gène codant pour l'aquaporine 3 présente des sites de liaison aux protéines de la famille de p53. Ces données suggèrent que la transcription du gène codant pour l'aquaporine 3 pourrait être contrôlée par p63. Par ailleurs, les auteurs ont démontré que l'application de Ca^{2+} ou de 1,25-dihydroxyvitamine D3 provoque une diminution de la capture de glycérol par les kératinocytes en culture, démontrant

ainsi que la répression de l'expression de l'aquaporine 3 provoque une diminution de son activité de transport du glycérol. L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en lumière un rôle inattendu de l'aquaporine 3 dans les mécanismes de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes. En interagissant avec la phospholipase D2 dans les cavéoles, l'aquaporine 3 facilite la formation de phosphatidylglycérol, un activateur de plusieurs isoformes de la PKC qui interviennent dans la prolifération et la différenciation des kératinocytes. De plus, de façon rétroactive, la différenciation des kératinocytes provoque une diminution de l'expression du gène codant pour l'aquaporine 3, accompagnée d'une diminution de son activité de transport du glycérol. Ce mécanisme pourrait permettre une régulation fine de l'activité de la phospholipase D2, une diminution de la formation de phosphatidylglycérol et une modulation de l'activité des PKC. Ces données confortent l'hypothèse d'une fonction spécifique supplémentaire de l'aquaporine 3 dans l'épiderme, éloignée du rôle de transporteur d'eau dans lequel elle a été cantonnée jusqu'à présent. ♦

A new role for aquaporin 3

RÉFÉRENCES

1. Denker BM, Smith BL, Kuhadja FP, et al. Identification, purification and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem* 1998; 263: 15634-42.
2. Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog Histochem Cytochem* 2004; 39: 1-83.
3. Walz T, Hirai T, Murata K, et al. The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* 1997; 387: 624-7.
4. Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, et al. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6269-73.
5. Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV, et al. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 1994; 264: 92-5.
6. Sougrat R, Morand M, Gondran C, et al. Functional expression of AQP3 in human skin epidermis and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 678-85.

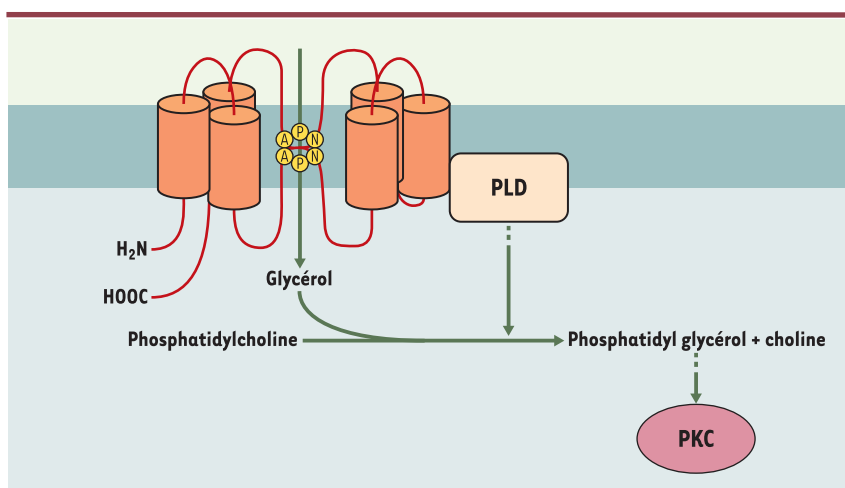


Figure 1. Interaction fonctionnelle entre l'aquaporine 3 et la phospholipase D. La perméabilité de l'aquaporine 3 au glycérol facilite la formation du phosphatidylglycérol, catalysée par la phospholipase D (PLD). Le phosphatidylglycérol est un activateur de protéine kinases C (PKC) dont certaines isoformes modulent la prolifération et la différenciation des kératinocytes.

7. Hara M, Ma T, Verkman AS. Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery. *J Biol Chem* 2002; 277: 46616-21.
8. Zheng X, Bollinger Bollag W. Aquaporin 3 colocalizes with phospholipase d2 in caveolin-rich membrane microdomains and is downregulated upon keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1487-95.
9. van Deurs B, Roepstorff K, Hommelgaard AM, et al. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 92-100.
10. Murray NR, Fields AP. Phosphatidylglycerol is a physiologic activator of nuclear protein kinase C. *J Biol Chem* 1998; 273: 11514-20.
11. Denning MF. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1141-6.
12. Nielsen S, King LS, Christensen BM, et al. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol* 1997; 273: 1549-61.
13. Parsa R, Yang A, McKeon F, et al. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1099-105.

NOUVELLE

Dépistage IRM du cancer du sein chez les femmes à haut risque : une avancée dans le dépistage ?

Martine Meunier, Dominique Stoppa-Lyonnet

> Cinq pour cent des cas de cancer du sein sont liés à une prédisposition génétique majeure. Les mutations constitutionnelles des gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont à l'origine de 65% des cas de prédisposition [1]. On estime qu'une femme sur 400 dans la population est porteuse d'une mutation de l'un ou de l'autre de ces gènes [2]. Leur risque de cancer du sein cumulé à l'âge de 70 ans est de l'ordre de 65% et 45% en cas de mutation de respectivement, *BRCA1* et *BRCA2*. À 50 ans, il est déjà de 38% et 16% [3], soit entre 8 et 20 fois supérieur à celui des femmes de la population générale auxquelles on propose de participer au dépistage organisé. Du fait de l'augmentation significative du risque dès 30 ans, la prise en charge des femmes à haut risque doit débuter à cet âge, voire dès 25 ans lorsqu'un premier cas est survenu dans une famille avant l'âge de 30 ans. Aujourd'hui, en l'absence de chimio-prévention et à l'alternative d'une chirurgie prophylactique mutilante et irréversible, seule la surveillance mammaire peut se discuter. La densité mammaire visible sur les clichés mammographiques est fonction de l'âge: les seins des femmes jeunes sont plus denses, ce qui a pour conséquence une

sensibilité de dépistage moindre de la mammographie. En 1998 et lors de sa mise à jour en 2004, un rapport d'expert a recommandé de réaliser un examen clinique tous les six mois, une mammographie annuelle dès l'âge 30 ans, généralement couplée à une échographie [4, 5]. Néanmoins, plusieurs études ont montré que, malgré cette surveillance, il y avait jusqu'à 50% de cancers d'intervalle, c'est-à-dire des cancers détectés cliniquement par une masse palpable entre deux mammographies [6-8] (on attendrait que le diagnostic soit fait par la mammographie au stade infraclinique). Ces mauvaises performances diagnostiques ont conduit certains à compléter le bilan annuel par une imagerie par résonance magnétique (IRM). Depuis une dizaine d'années, l'IRM s'est imposée dans le diagnostic des cancers du sein infiltrants. Elle peut être complétée par une injection intraveineuse de produit de contraste qui permet l'étude de la vascularisation du tissu mammaire et de la néovascularisation associée aux cancers. Si cet examen complémentaire est utilisé en pratique courante pour documenter une anomalie radiologique

d'aspect complexe, son interprétation peut être difficile et son utilisation dans le cadre du dépistage n'a jamais été validée. En effet, devant une prise de contraste, parfois de très petite taille, il est nécessaire de distinguer une lésion maligne d'une lésion bénigne (fibroadénome, mastose fibrokystique) et d'une image qui correspond à une structure anatomique (petit ganglion intramammaire, vaisseau). Par ailleurs, les critères d'interprétation n'ont pas encore été validés sur de grandes séries. En conséquence, la spécificité de l'IRM, c'est-à-dire sa capacité de classer comme bénignes des lésions effectivement bénignes, est faible. Deux études récentes ont examiné l'apport de l'IRM chez les femmes à haut risque de cancer du sein, défini par la présence d'une mutation de *BRCA1/2* [9, 10]. La sensibilité de l'IRM apparaît très supérieure à celle de la mammographie et de l'échographie (Tableau 1): la taille moyenne des tumeurs détectées par IRM est plus petite. Ces résultats doivent être considérés cependant avec prudence. En effet, dans l'étude de E. Warner, avec une sensibilité de l'IRM à 77%, 5 cancers sur 22 n'ont pas été identifiés: un cas de cancer d'intervalle à 7 mois du bilan d'imagerie, deux cancers visibles par la mammographie seule et deux autres par l'échographie seule.

M. Meunier: Service de Radiologie. D. Stoppa-Lyonnet: Service de Génétique. Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France.
martine.meunier@curie.net
dominique.stoppa-lyonnet@curie.net



Ce résultat montre la complémentarité nécessaire de ces différents examens. Par ailleurs, la spécificité et la valeur prédictive positive de l'IRM sont beaucoup moins bonnes que celles de la mammographie, conduisant notamment à un nombre élevé de biopsies pour des lésions bénignes (14% dans l'étude de E. Warner *et al.*). Si la relecture de la mammographie et de l'échographie après la détection d'une prise de contraste à l'IRM ne permet pas d'orienter les biopsies nécessaires au diagnostic de certitude de lésion

maligne, ces biopsies doivent être réalisées avec un repérage sous IRM. Ce repérage est complexe et nécessite une antenne particulière, en général disponible seulement dans les centres spécialisés. Il a été montré que 75% des prises de contraste vues en IRM n'étaient pas visibles en échographie et, parmi celles-ci, 15% correspondaient à un cancer [11]. Ainsi, on peut retenir que la prise en charge des résultats de l'ensemble de ces examens nécessite des équipes spécialisées en sénologie interventionnelle.

En conclusion, le bénéfice de la surveillance par IRM ne pourra être retenu que lorsqu'il aura été montré qu'elle est associée à une diminution de la mortalité. De plus, des questions restent à résoudre comme la combinaison et la périodicité des examens (mammographie et IRM annuelles, réalisées avec un décalage de six mois l'une par rapport à l'autre), l'assiduité des femmes à cette surveillance qui risque, à terme, d'être obérée par des examens invasifs itératifs, et, enfin, d'un point de vue socio-économique, son coût ainsi que celui des examens induits. Les résultats des études de E. Warner et M. Kriege nous encouragent à proposer, dans un cadre d'évaluation, un suivi IRM chez les patientes porteuses d'une altération d'un gène *BRCA* [9, 10]. Il faut cependant rester prudent chez les femmes dont le risque est défini par la seule histoire familiale et chez lesquelles l'incidence attendue des cancers est quatre fois moins importante que chez les femmes porteuses d'une mutation *BRCA*. En effet, dans ces conditions, la mauvaise valeur prédictive positive de l'IRM est, au moins aujourd'hui, une limite à son utilisation en dépistage. ♦

MRI for breast-cancer screening in women with predisposition: an advance in detection?

	Nombre de cas (<i>BRCA1/2</i>)	Nombre de cancers identifiés ¹	Sensibilité ² (%)	Spécificité ³ (%)	Valeur prédictive positive ⁴ (%)
[9]	236	22			
IRM			77,0	95,0	46,0
Mammographie			36,0	99,8	88,9
Échographie			33,0	96,0	29,0
[10]	1909 dont	51			
IRM	358		71,1	90,0	32,3
Mammographie <i>BRCA1/2</i>			40,0	95,0	47,8

Tableau I. Résultats des techniques de dépistage du cancer du sein chez des patientes à haut risque, obtenus à partir de deux études [9, 10]. ¹ Le nombre de cancers identifiés dans les deux études n'est pas similaire du fait de la définition des risques fondée en partie sur la seule histoire familiale dans l'étude de M. Kriege *et al.* [10] et du fait du recul du suivi différent entre les deux études. ² Sensibilité: (nombre de vrais positifs/nombre de vrais positifs + nombre de faux négatifs) x 100. ³ Spécificité: (nombre de vrais négatifs/nombre de vrais négatifs + nombre de faux positifs) x 100. ⁴ Valeur prédictive positive: (nombre de vrais positifs/nombre de vrais positifs + nombre de faux positifs) x 100.

RÉFÉRENCES

- Ford D, Easton DF, Stratton M, *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 676-89.
- Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, *et al.* A comprehensive model for familial breast cancer incorporating *BRCA1*, *BRCA2* and other genes. *Br J Cancer* 2002; 86: 76-83.
- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1117-30.
- Eisinger F, Alby N, Bremond A, *et al.* Recommendations for the management of women with a genetic risk for developing cancer of the breast and/or the ovary. *Bull Cancer* 1999; 86: 307-13.
- Eisinger F, Bressac B, Castaigne D, *et al.* Identification et prise en charge des prédispositions héréditaires aux cancers du sein et de l'ovaire. *Bull Cancer* 2004; 91: 656.
- Brekelmans CT, Seynaeve C, Bartels CC, *et al.* Effectiveness of breast cancer surveillance in *BRCA1/2* gene mutation carriers and women with high familial risk. *J Clin Oncol* 2001; 19: 924-30.
- Scheuer L, Kauff N, Robson M, *et al.* Outcome of preventive surgery and screening for breast and ovarian cancer in *BRCA* mutation carriers. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1260-8.
- Komenaka IK, Dittkoff BA, Joseph KA, *et al.* The development of interval breast malignancies in patients with *BRCA* mutations. *Cancer* 2004; 100: 2079-83.
- Warner E, Plewes DB, Hill KA, *et al.* Surveillance of *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers with magnetic resonance imaging, ultrasound, mammography, and clinical breast examination. *JAMA* 2004; 292: 1317-25.
- Kriege M, Brekelmans CT, Boetes C, *et al.* Efficacy of MRI and mammography for breast-cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. *N Engl J Med* 2004; 351: 427-37.
- LaTrenta LR, Menell JH, Morris EA, *et al.* Breast lesions detected with MR imaging: utility and histopathologic importance of identification with US. *Radiology* 2003; 227: 856-61.

Prévention de la transmission mère-enfant du VIH : un protocole simple, d'une efficacité remarquable

Marc Lallemand, Gonzague Jourdain, Sophie Le Cœur, Nicole Ngo-Giang-Huong, Vallopp Thaineua

> En l'absence de prévention, environ 35% des enfants nés de mère séropositive sont eux-mêmes infectés : 10% pendant la grossesse, 15% pendant le travail et 10% pendant l'allaitement maternel. En 2003, plus de 600 000 nouveau-nés ont été infectés par le VIH. Pourtant la majorité de ces infections auraient pu être évitées. En effet, en 1994, l'essai clinique PACTG 076-ANRS 024 démontrait l'efficacité remarquable d'un médicament antirétroviral, la zidovudine (AZT) pour prévenir la transmission mère-enfant du VIH au cours de la grossesse et lors de l'accouchement : chez ces femmes qui n'avaient pas allaité, la transmission à l'enfant était de 8% dans le groupe recevant de la zidovudine et de 23% dans le groupe placebo, soit une diminution de près de 70% du risque de transmission [1].

Actuellement, dans la majorité des pays industrialisés où l'allaitement artificiel est la règle pour les mères infectées, la transmission est encore plus faible, inférieure à 2%, grâce à l'utilisation de combinaisons d'antirétroviraux pendant la grossesse et la pratique fréquente de césariennes avant le début du travail. En revanche, dans les pays en voie de développement où vivent la grande majorité des femmes infectées, les programmes de prévention restent encore limités en raison des difficultés rencontrées par les systèmes de santé pour les mettre en œuvre. Dans le cadre d'un programme international de recherche clinique entre la Thaïlande, la France et les États-Unis, les

chercheurs du groupe IRD-PHPT (Institut de recherche pour le développement - *Perinatal HIV prevention trial*) ont réalisé, entre 2001 et 2003 en Thaïlande, un essai clinique de phase III, randomisé, en double insu, visant à déterminer si l'adjonction au traitement standard par zidovudine d'une dose de névirapine chez la mère au moment de l'accouchement, et chez son enfant peu après la naissance, pouvait réduire la transmission survenant pendant l'accouchement. Cet essai était financé par le *National Institute of Health* et l'Agence nationale de recherches sur le sida.

Dans 37 hôpitaux thaïlandais, 1844 femmes enceintes infectées par le VIH ont participé à cet essai. Toutes recevaient un traitement par zidovudine débutant à 28 semaines de grossesse ou le plus tôt possible par la suite, ainsi que leurs enfants pendant la première semaine de vie. De plus, elles n'allaitaient pas leurs enfants. Les femmes ayant donné leur consentement étaient affectées au hasard à l'un des trois groupes du protocole. Les patientes du premier groupe (référence) ne recevaient qu'un traitement standard par zidovudine. Dans le second groupe, les mères recevaient, outre le traitement standard par zidovudine, une dose unique de névirapine au moment de l'accouchement. Dans le troisième groupe, les mères étaient traitées comme celles du deuxième groupe et les enfants recevaient une dose de névirapine 48 à 72 heures après la naissance. Le diagnostic d'infection de l'en-

M. Lallemand : Institut de recherche pour le développement, Paris, France et Department of Immunology and infectious diseases, Harvard School of Public Health, Boston, États-Unis.

G. Jourdain, N. Ngo-Giang-Huong : Department of Immunology and infectious diseases, Harvard School of Public Health, Boston, États-Unis.

S. Le Cœur : Institut national d'études démographiques, Paris, France.

V. Thaineua : Ministère de la Santé publique, Bangkok, Thaïlande.

marc@phpt.org

fant était fait par un test d'amplification génique du VIH (*polymerase chain reaction*).

En mai 2002, après la première analyse intermédiaire, l'inclusion dans le groupe ne recevant pas de névirapine était interrompue car la transmission dans ce groupe était très supérieure à celle observée dans le groupe où mère et enfant recevaient une dose de névirapine (6,3% contre 1,1%, $p < 0,001$). L'inclusion dans les deux autres groupes de l'étude s'est poursuivie pour déterminer s'il était nécessaire ou non de donner de la névirapine à l'enfant en plus de la dose administrée à la mère. Lors de l'analyse finale, la transmission était de 2,0% dans le groupe où mères et enfants avaient reçu de la névirapine, et de 2,8% dans le groupe où seules les mères en avaient reçu (test de non-infériorité : $p = 0,03$).

Cet essai a donc démontré qu'il était possible, avec un traitement très simple, de réduire le risque de transmission du



VIH de la mère à l'enfant à un niveau similaire à ceux obtenus avec les procédures complexes utilisées dans les pays industrialisés.

Dans le cadre de cet essai, il était proposé aux femmes immunodéprimées (compte CD4 < 250 cellules/mm³) de démarrer une triple thérapie, prise en charge par le Ministère de la santé, après l'accouchement si ce traitement n'avait pas été institué auparavant.

L'étude de 269 femmes immunodéprimées (48 n'ayant pas reçu de névirapine au moment de l'accouchement et 221 en ayant reçu) a montré qu'après six mois de traitement, l'augmentation des CD4 était similaire dans les deux groupes. En revanche, la proportion de patientes ayant une charge virale inférieure à 50 copies/ml était de 68% chez les patientes ayant reçu de la névirapine au moment de l'accouchement, et de 49% chez les autres ($p = 0,03$). Dix jours après l'accouchement, aucune mutation du VIH associée à la résistance à la névirapine n'était trouvée chez les femmes n'ayant pas reçu de névirapine au moment de l'accouchement, alors qu'au moins une mutation était trouvée chez 32% des femmes en ayant reçu (K103N et G190A, essentiellement, diagnostiquées par les techniques de séquençage classiques). Parmi les femmes qui avaient reçu de la névirapine au moment de l'accouchement et qui présentaient des virus mutants, 38% avaient une charge virale inférieure à 50 copies/ml après 6 mois de traitement, contre 52% chez celles qui des virus mutants n'avaient pas été retrouvés ($p = 0,08$) [2].

En décembre 2003, après avoir examiné l'ensemble de ces résultats, le Ministère de la santé de Thaïlande a décidé de recommander la prophylaxie par zidovudine et dose unique de névirapine pour

son programme national de prévention de la transmission mère-enfant du VIH, tout en préconisant de commencer une triple thérapie en cours de grossesse en cas d'indication thérapeutique pour la mère (CD4 < 200/mm³). En fait, ces femmes qui ont besoin de débiter une thérapie pour leur propre santé sont, du fait de leur immunosuppression et de leur propension à avoir une charge virale élevée, les femmes chez lesquelles le développement des résistances après une simple exposition à la névirapine est la plus probable. L'Organisation mondiale de la santé a adopté cette stratégie lors de la révision de ses recommandations au début de 2004 [3].

L'utilisation de la zidovudine et d'une dose unique de névirapine s'est révélée d'une grande simplicité et d'une exceptionnelle efficacité pour la prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant. Elle ne doit pas compromettre les chances de succès thérapeutique chez les mères qui y ont eu recours. Des essais sont déjà en cours qui laissent espérer que l'administration d'une combinaison antirétrovirale à la mère pendant les quelques semaines qui suivent l'exposition à la dose unique de névirapine peut prévenir la sélection des mutations de résistance [4]. ♦

Prevention of mother-to-child transmission of HIV: a simple and highly efficacious regimen

REMERCIEMENTS

Les obstétriciens, pédiatres, infirmières, conseillers, techniciens de laboratoire et personnels administratifs des 37 hôpitaux qui ont participé à l'étude ainsi que tout le personnel de PHPT.

Les institutions qui ont soutenu PHPT sont: en Thaïlande: le Ministère de la Santé publique, les universités de Chiang Mai, de Khon Kaen et

de Mahidol; en France: l'unité de recherche 054 de l'Institut de recherche pour le développement (IRD), l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) Erm 0321 et l'Institut national d'études démographiques (INED); aux États-Unis: l'Harvard School of Public Health, Department of Immunology and Infectious Diseases, l'University of Massachusetts, le National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), le Fogarty International Center du National Institutes of Health (NIH).

La recherche a été financée par le NICHD du National Institutes of Health (R01-HD 39615), l'Agence Nationale de Recherches sur le Sida (ANRS 1208), l'IRD, l'INED, le Ministère français des Affaires étrangères, le Ministry of Public Health et le Department of Technical and Economic Cooperation, en Thaïlande. Les produits pour étude ont été fournis par les laboratoires Boehringer-Ingelheim et Glaxo-Smith-Kline, et les réactifs pour les tests de PCR-ADN-VIH par le laboratoire Roche Molecular Systems.

RÉFÉRENCES

1. Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW, et al. Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 1996; 335: 1621-9.
2. Jourdain G, Ngo-Giang-Huong N, Le Coeur S, et al. Intrapartum exposure to nevirapine and subsequent maternal responses to nevirapine-based antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 2004; 351: 229-40.
3. World Health Organization. *Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants. Guidelines on care, treatment and support for women living with HIV/AIDS and their children in resource-constrained settings.* Genève: OMS, 2004: 50 p. http://www.who.int/3by5/arv_pmtct/en/.
4. McIntyre J, Martinson N and Investigators for the Trial 1413. Addition of short course combivir (CBV) to single dose virmune (sdNVP) for prevention of mother-to-child transmission (MTCT) of HIV-1 can significantly decrease the subsequent development of maternal NNRT-resistant virus. Bangkok: XV^e Conférence Internationale sur le Sida, juillet 2004, LbOrB09.