



après l'introduction d'un ballonnet dans la carotide du rat. Il en est de même dans la néo-intima à partir du quatorzième jour. Le rôle de DDR1 dans la progression des lésions est démontré par la moindre épaisseur de la *neointima* dans des carotides de souris *DDR1^{-/-}* par rapport aux carotides de souris *DDR1^{+/+}* après abrasion de l'endothélium [10]. Ces observations sont en accord avec la diminution des capacités de prolifération, migration et adhérence au collagène des cellules musculaires lisses vasculaires *DDR1^{-/-}* observées *in vitro* [6]. DDR2 est surexprimé dans les cellules étoilées du foie de rat après intoxication par le chlorure de carbone ou ligature du cholédoque [9], résultats à rapprocher du rôle mitogène de ce récepteur sur ces mêmes cellules *in vitro* [8].

Les DDR interviennent ainsi dans la réparation des lésions artérielles et probablement dans les remaniements secondaires à la formation des plaques d'athérosclérose. De plus, l'ensemble

des résultats expérimentaux peut faire considérer les DDR comme des détecteurs de la masse de collagène dont l'activation entraîne un processus correcteur pour la destruction de la MEC par activation des MMP. ♦

Collagen receptors: discoidin domain family

RÉFÉRENCES

1. Johnson JD, Edman JC, Rutter WJ. A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin-like domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5671-81.
2. Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* 1997; 1: 13-23.
3. Curat CA, Eck M, Dervillez X, Vogel WF. Mapping of epitopes in discoidin domain receptor 1 critical for collagen binding. *J Biol Chem* 2001; 49: 45952-8.
4. Vogel WF. Ligand-induced shedding of discoidin domain receptor 1. *FEBS Lett* 2002; 514: 175-80.
5. Curat CA, Vogel WF. Discoidin domain receptor 1 controls growth and adhesion of mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2648-56.
6. Hou G, Vogel WF, Bendeck MP. The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. *J Clin Invest* 2001; 107: 727-35.
7. Olaso E, Labrador JP, Wang LH, et al. Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloprotease-2. *J Biol Chem* 2002; 277: 3606-13.
8. Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, et al. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 1369-78.
9. Vogel WF. Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *FASEB J* 1999; 13: S77-S82.
10. Franco CD, Hou G, Bendeck MP. Collagens, integrins, and the discoidin domain receptors in arterial occlusive disease. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 143-8.

NOUVELLE

Les cellules souches de la lignée germinale mâle : de l'approche fondamentale aux nouvelles technologies de transgénèse

François Cuzin, Minoou Rassoulzadegan

Inserm U.470,
Université de Nice,
Parc Valrose, 06108 Nice
Cedex 2, France.
fcuzin@unice.fr

► Au cours des 20 dernières années, les recherches en génétique moléculaire des mammifères, et bon nombre de leurs applications, ont développé et utilisé des technologies pour manipuler le génome des organismes supérieurs en général et de la souris en particulier. Il s'agit d'inscrire une modification du génome dans la lignée germinale, par une intervention à une étape très précoce du développe-

ment, avant la première mise en place des précurseurs de la gamétogenèse. Trois voies sont utilisées, la microinjection d'ADN dans un œuf fécondé, le transfert dans les cellules souches embryonnaires (lignées ES), et plus récemment, le « clonage reproductif » par reprogrammation du noyau d'une cellule somatique injecté dans un œuf énucléé. Un nouvel accès au génome de l'em-

bryon très précoce est aujourd'hui ouvert par les progrès de nos connaissances sur les cellules germinales, en particulier les cellules germinales mâles plus facilement accessibles. Modifier de manière permanente les gamètes, cellules à vie courte constamment renouvelées, exige une intervention sur les cellules souches dont ils dérivent. Or, jusqu'à une date récente, peu de choses était connu de la biologie

de la cellule souche germinale. En très petit nombre (20-30 000 par testicule adulte), ces cellules pendant toute la vie adulte produisent, à des intervalles rigoureusement définis, une cellule fille engagée dans la voie de différenciation menant à la méiose, puis à la formation du spermatozoïde (spermiogenèse) [1]. Des progrès significatifs récents ouvrent des voies nouvelles tant pour la recherche fondamentale que pour les biotechnologies.

Après une première caractérisation cyto- logique et histologique fine [2], l'étude fonctionnelle des cellules souches germinales n'est devenue possible que depuis les travaux récents du laboratoire de R. Brinster à Philadelphie [3] (Figure 1). Il a été montré que les cellules germinales extraites d'un testicule (donneur) peuvent être implantées dans un testicule receveur d'un mâle stérile. L'arrêt, temporaire ou permanent, de la spermatogénèse du receveur peut être le fait d'une mutation du récepteur Kit (récepteur du *stem cell factor*) chez le mutant W^- , d'une irradiation ou d'un traitement pharmacologique. Toutes les étapes de la différenciation germinale sont reconstituées à partir des cellules implantées. La spermatogénèse est rétablie à long terme, avec ses cycles réguliers caractéristiques, montrant bien que dans la fraction germinale transférée, relativement hétérogène, existait bien une fraction de cellules souches, minoritaire mais essentielle. Ces résultats impliquent, mais on le savait par ailleurs, que ni les traitements utilisés pour stériliser le testicule receveur, ni la mutation W^- , n'affectent les cellules somatiques de l'épithélium séminifère qui assu-

rent la fonction de support de la différenciation germinale (cellules de Sertoli). Il est à noter qu'une telle restitution complète d'un tissu adulte par transplantation de cellules souches n'a été possible jusqu'à présent que dans un autre cas, celui des cellules hématopoïétiques, capables de reconstituer tout le répertoire des cellules sanguines.

L'efficacité de la reconstruction dépend pour une large part de la préparation des cellules germinales du testicule donneur, que l'on s'attachera à enrichir en cellules souches par des moyens physiologiques ou moléculaires. L'utilisation du testicule dit cryptorchide (stérilité induite par la température) permet un enrichissement significatif. On sait que le maintien, pathologique ou expérimental, du testicule dans la cavité abdominale (à 37 °C alors qu'en position externe, il est normalement à 30-32 °C) aboutit à la disparition des cellules germinales en voie de différenciation, alors que les stades ger-

minaux précoces survivent. Les fractions germinales cryptorchides montrent ainsi une augmentation de l'ordre de 25 fois de la proportion des cellules capables de coloniser les tubes séminifères du receveur. Un second moyen a été d'utiliser des marqueurs de surface des cellules souches pour un fractionnement immunologique. Ainsi, les anticorps dirigés contre les intégrines $\alpha_1\beta_6$ caractéristiques de la cellule germinale souche ont été utilisés pour une purification, qui cependant demeure limitée (25 %) [4, 5]. Nous-mêmes avons pu obtenir des fractions très enrichies à partir de mâles transgéniques exprimant un marqueur de surface hétérologue à la surface des cellules souches. L'efficacité de colonisation du tube séminifère devient alors très élevée [6] (Figure 2). Les critères cytologiques ou moléculaires pour l'identification et la purification de ces cellules sont encore fragiles. Cependant, les techniques performantes aujourd'hui dispo-

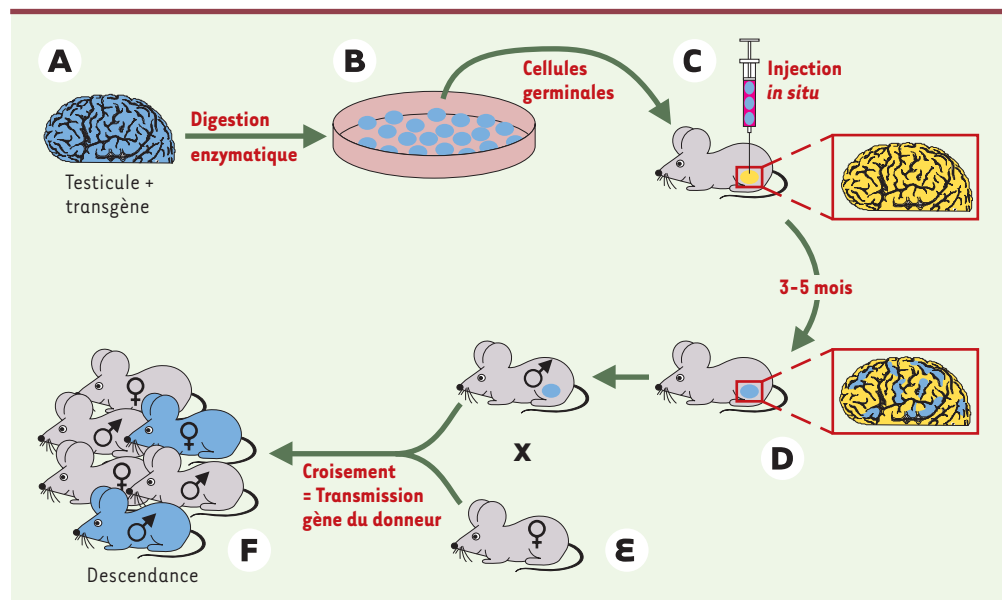


Figure 1. Stratégie de transplantation testiculaire. Une suspension cellulaire est obtenue à partir du testicule d'un donneur fertile (A). Les cellules peuvent être cultivées (B) avant leur microinjection dans la lumière de tubes séminifères d'une souris receveuse stérile (C). Seule une cellule souche pourra être à l'origine d'un processus de spermiogenèse efficace dans le testicule du receveur. Si les cellules testiculaires greffées expriment un transgène marqueur (*lacZ*) dont l'expression est symbolisée par la couleur bleue, on peut facilement détecter les clones de cellules germinales chez le receveur sous forme de bandes tubulaires bleues (D). L'accouplement du mâle receveur à une femelle sauvage (E) engendre une descendance qui porte le gène du donneur (F). Une modification génétique peut être introduite dans les cellules germinales pendant le temps de culture (B) (d'après [3]).



nibles pour l'analyse des « protéomes » et « transcriptomes », appliquées aux fractions purifiées et couplées avec le test de transplantation, ouvrent un vaste champ d'investigation pour identifier les marqueurs adéquats afin de les utiliser pour purifier les cellules souches dans différentes espèces.

Une série de questions importantes peuvent maintenant être abordées, qui seront utiles en biologie fondamentale ou pour des applications médicales et biotechnologiques. Ainsi, les régulations qui permettent, à des intervalles rigoureusement définis, le démarrage de chaque cycle spermatogénique sont encore mal comprises. L'identification des signaux impliqués peut avoir des conséquences sur notre compréhension des mécanismes encore obscurs des stérilités mâles. Une autre application médicale envisagée est de pouvoir reconstituer la spermatogénèse après les traitements anticancéreux appliqués avant la puberté. Cependant, les apports les plus importants à court terme sont dans le domaine de la bio-

technologie. Bien que seulement pour une période limitée (pour le moment), il est possible de maintenir les cellules germinales en culture avant de les réimplanter. La perspective d'une intervention génétique pendant cette période est alors tentante. En 2001, Nagano, Brinster et leurs collaborateurs ont réussi une expérience pilote de transfert génétique par un vecteur rétroviral dans des cellules germinales [7]. L'efficacité de « prise » de la greffe des cellules génétiquement modifiées est encore variable. Cependant, dans les meilleurs cas, de 1 à 8 % des descendants des mâles receveurs ont été trouvés porteurs du transgène et capables d'une transmission mendélienne stable. Ce résultat est d'un grand intérêt en transgénèse, d'abord parce que la méthode est rapide et relativement simple techniquement. Mais aussi et surtout parce que le site d'intégration du transgène est différent dans chaque cellule souche transplantée, et donc dans chacune des familles qui seront établies à partir de la première génération des des-

endants. On pourra ainsi d'emblée étudier l'expression des gènes intégrés indépendamment des effets éventuels des séquences environnantes – problème récurrent de la transgénèse classique.

Il a été également montré, toujours par le laboratoire de Brinster, que des cellules souches d'autres rongeurs, notamment de rat, pouvaient poursuivre leur maturation après leur transplantation dans le testicule de la souris [8], et les transplantations croisées entre espèces seront intéressantes pour analyser les systèmes de reconnaissance tissulaire. Un travail récent a maintenant étendu au rat la transgénèse par transplantation germinale [9].

Alors que la souris reste le premier matériel expérimental pour le généticien, le rat est particulièrement favorable pour le physiologiste. C'est sur le rat, en particulier du fait d'une plus grande taille, que beaucoup d'observations de référence ont été faites. Toutefois, une limitation importante est l'absence des puissants outils génétiques disponibles pour la souris – la microinjection d'ADN dans l'embryon précoce est peu efficace, il n'existe pas de lignées de cellules souches embryonnaires (ES). La technique aujourd'hui proposée pour la modification du génome du rat aura donc un impact certain en physiologie. Au-delà, l'amélioration par transgénèse devient possible pour tous les animaux d'intérêt économique pour lesquels les techniques classiques de modification du génome établies chez la souris s'étaient révélées impraticables. En plus de l'amélioration proprement dite du bétail, de nombreuses applications ont été envisagées, des xénogreffes à la production de protéines d'intérêt médical. Mais les recherches sont encore peu avancées, du fait des mêmes limitations que celles rencontrées pour le rat, ajoutées au coût d'essais qui doivent être pratiqués chez des animaux de grande taille. C'est au demeurant pour cette raison que l'approche surmédiatisée, laborieuse et coûteuse du clonage reproductif avait été mise en œuvre. La stratégie serait de modifier d'abord le génome d'une cellule somatique en culture (ce que l'on sait faire, en principe), puis d'obtenir la « reprogrammation » du noyau modifié, ramené à l'état embryonnaire après son injection dans un ovocyte. Cette opération est affectée aujourd'hui d'un taux d'échec considérable, même si les premiers résultats ont pu être annoncés [10]. L'exploration de voies alternatives est donc d'un intérêt certain, l'intervention sur les cellules germinales, encore balbutiante, sera peut-être une des voies de l'avenir. Et la recherche, imprévisible, ouvrira encore de nouvelles perspectives. ♦

Germ stem cells: from basic knowledge to their use in gene transfer

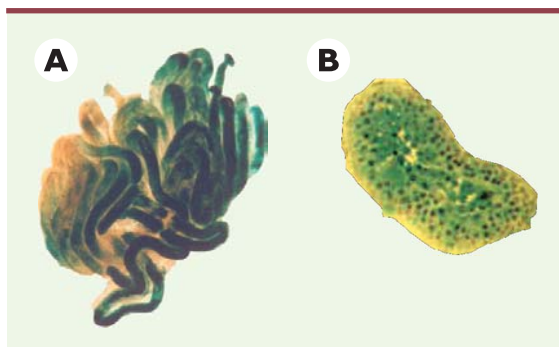


Figure 2. Reconstitution de l'épithélium séminifère après injection de cellules souches purifiées dans les tubes séminifères [6]. Les cellules souches germinales purifiées à partir du testicule d'un mâle adulte portant un transgène à expression ubiquitaire codant pour la β -galactosidase d'*Escherichia coli* (Rosa26) ont été injectées dans les tubes séminifères d'un receveur préalablement stérilisé par irradiation. **A.** Après 13 semaines, les tubes séminifères d'un testicule entier sont colorés (X-Gal) pour la détection de l'enzyme marqueur des cellules injectées. **B.** Coupe colorée montrant les cellules β -galactosidase-positives à tous les stades de différenciation. Le fait que plusieurs cycles de différenciation se sont déroulés pendant ces 13 semaines démontre une reconstitution complète à partir des cellules souches.

RÉFÉRENCES

1. Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater FL: Cache River Press, 1990.
2. De Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 694-701.
3. Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 2002; 296: 2174-6.
4. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8346-51.
5. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5504-9.
6. Giuili G, Tomljenovic A, Labrecque N, Oulad-Abdelghani M, Rassoulzadegan M, Cuzin F. Murine spermatogonial stem cells: targeted transgene expression and purification in an active state. *EMBO Rep* 2002; 3: 753-9.
7. Nagano M, Brinster CJ, Orwig KE, Ryu BY, Avarbock MR, Brinster RL. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13090-5.
8. Orwig KE, Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Functional analysis of stem cells in the adult rat testis. *Biol Reprod* 2002; 66: 944-9.
9. Hamra FK, Gatlin J, Chapman KM, et al. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14931-6.
10. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295: 1089-92.

NOUVELLE

Contrôle de la détermination cellulaire par les centrosomes

Régis Giet, Claude Prigent

► Au cours du développement, la répartition de déterminants spécifiques dans les cellules est un mécanisme fondamental de la diversification. En effet, ce mécanisme permet de déterminer un groupe de cellules à devenir un organe ou une cellule assurant une fonction bien spécifique. Un travail remarquable chez le mollusque aquatique *Ilyanassa obsoleta* a permis de mettre en évidence récemment un rôle du centrosome dans la ségrégation asymétrique d'ARNm codant pour des facteurs essentiels au développement de cet animal [1]. Ces travaux devraient ouvrir la voie à la compréhension des rôles essentiels du centrosome dans le développement et la différenciation.

Les mécanismes de création de la diversité cellulaire qui caractérise les organismes complexes ont toujours fasciné bon nombre de chercheurs. Comment, à partir d'une cellule unique - l'œuf fécondé - obtenir la multitude de cellules différenciées qui composent un embryon puis un individu? Pour ce faire, la cellule

doit disposer de moyens de répartir de façon asymétrique dans sa descendance des facteurs spécifiques pour assurer qu'une cellule A ne produit pas deux cellules A, mais une cellule B et une cellule C. Chaque cellule fille B et C est alors programmée par les facteurs distribués de façon asymétrique au cours de la division cellulaire, permettant à chacune d'évoluer vers une destinée qui lui est propre.

L'étude d'organismes eucaryotes invertébrés a permis d'identifier et de comprendre certains des mécanismes de base qui assurent cette distribution asymétrique de facteurs de détermination (→). Avant que la publication de *Nature* n'implique le centrosome [1] deux mécanismes avaient été identifiés. Le premier fait intervenir des fibres d'actine qui transportent des ARNm et les répartissent

Groupe Cycle Cellulaire, Équipe labellisée Ligue nationale contre le Cancer, Cnrs UMR 6061- Université Rennes 1, Faculté de Médecine, 2, avenue du Pr Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes Cedex, France. regis.giet@univ-rennes1.fr claud.prigent@univ-rennes1.fr

de façon à ce qu'ils ne se trouvent que dans une seule des futures cellules filles. Ce premier mécanisme est utilisé chez la levure bourgeonnante pour piéger certains ARNm dans le bourgeon de la cellule fille. Le deuxième mécanisme suggère que des facteurs protéiques sont piégés de manière différentielle

vers le cortex des futures cellules. Cela est le cas, par exemple, au cours des divisions dans le système nerveux de la drosophile où des protéines impliquées dans la détermination des cellules filles sont sélectivement recrutées vers un pôle de la cellule (→). Dans les deux cas, les microfilaments d'actine jouent un rôle essentiel et le fuseau mitotique, par son orientation, et la cytokinèse, achèvent de sceller la répartition asymétrique de ces déterminants dans les cellules filles [4, 8]. Il est néanmoins possible que ces 2 mécanismes encore mal caractérisés fassent intervenir des gènes orthologues.

C'est en s'intéressant au comportement d'ARNm spécifiques impliqués dans la spécification de l'axe antéro-postérieur

(→) m/s
2000, n° 10,
p. 1092