



calcium libéré à partir de stocks intracellulaires, le NO et la guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Cette séquence de seconds messagers est activée en cascade le long des fibres nerveuses et provoque une production récurrente de céramide de radeau en radeau (Figure 2). Ce mécanisme permet la propagation le long des fibres nerveuses de cette excitation indépendante de potentiel d'action. Cette étude récemment publiée dans la revue PLoS ONE [8] a permis de montrer qu'en plus du fonctionnement classique faisant intervenir des potentiels d'action, les neurones peuvent conduire une excitation produite par une cas-

cade de seconds messagers. Le premier type de mécanisme est adapté à un fonctionnement rapide du neurone alors que le second doit être mis en jeu dans des phénomènes plus lents. L'existence de ce nouveau mécanisme ouvre des perspectives de recherche dans le fonctionnement neuronal d'un point de vue fondamental et clinique. ♦

Nervous conduction of excitation independent of action potentials

RÉFÉRENCES

1. Mazet B, Miolan JP, Niel JP, Roman C. New insights into the organization of a gastroduodenal inhibitory reflex by the coeliac plexus. *J Auton Nerv Syst* 1993; 46 : 135-46.
2. Miolan JP, Niel JP. The mammalian sympathetic prevertebral ganglia : integrative properties and role in the nervous control of digestive tract motility. *J Auton Nerv Syst* 1996; 58 : 125-38.
3. Quinson N, Catalin D, Niel JP, Miolan JP. Release of nitric oxide within the coeliac plexus is involved in the organization of a gastroduodenal inhibitory reflex in the rabbit. *J Physiol* 1999; 519 : 223-34.
4. Fasano C, Hiol A, Miolan JP, Niel JP. Les sphingolipides : vecteurs d'agents pathogènes et cause de maladies génétiques. *Med Sci (Paris)* 2006; 22 : 411-5.
5. Hannun YA. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* 1994; 269 : 3125-8.
6. Hannun YA. *Sphingolipid-mediated signal transduction*. Heidelberg : Springer, 1997 : 188 p.
7. Liu G, Kleine L, Hebert RL. Advances in the signal transduction of ceramide and related sphingolipids. *Crit Rev Cl Lab Sci* 1999; 36 : 511-73.
8. Fasano C, Tercé F, Niel J, Nguyen HTT, Hiol A, et al. Neuronal conduction of excitation without action potentials based on ceramide production. *PLoS One* 2007; 2 : e612.

NOUVELLE

Cellules souches et progéniteurs dans la glande mammaire : rôle critique du facteur de transcription Gata-3

Marie-Liesse Asselin-Labat

The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Victorian Breast Cancer Research Consortium, 1G Royal Parade, Parkville, VIC 3050 Australia.
labat@wehi.edu.au

> La glande mammaire se développe chez l'embryon à partir de la formation de bourgeons mammaires primitifs. Après la naissance, elle subit un grand nombre de changements lors de la puberté, et chez l'adulte au cours de chaque cycle menstruel et des grossesses. Ces modifications sont contrôlées par des stimulations hormonales (œstrogène, progestérone, prolactine) et des facteurs de croissance (EGF, *epidermal growth factor...*) [1].

La glande mammaire est composée de canaux formant un réseau de branchements remplissant le coussinet graisseux. La glande est formée de trois épithélium distincts : le myo-épithélium, localisé au niveau basal, entoure les canaux et leur donne leurs propriétés contractiles. L'épithélium luminal fait face au lumen et est subdivisé en cellules longeant les canaux

et en cellules alvéolaires responsables de la production et de la sécrétion du lait au cours de la grossesse et de la lactation. Notre groupe s'intéresse à l'identification des cellules souches mammaires et de leur descendance. L'identification d'une hiérarchie cellulaire (cellules souches → progéniteurs → cellules différenciées) et des facteurs de transcription critiques pour la spécification vers un lignage cellulaire constitue une base nécessaire pour la compréhension des phénomènes oncogéniques observés dans les cancers du sein.

Identification et isolement de la cellule souche mammaire

L'importante capacité proliférative et régénérative du tissu mammaire lors de chaque cycle reproductif et l'existence

de différents lignages cellulaires ont suggéré l'existence de cellules souches de la glande mammaire (CSMa) [2]. En se fondant sur l'expression de marqueurs cellulaires membranaires et sur des expériences de transplantation *in vivo*, notre groupe [3] et l'équipe de C. Eaves [4] ont récemment identifié et isolé une sous-population de l'épithélium mammaire murin enrichie en CSMa.

La glande mammaire est composée d'une grande diversité de cellules. Par tri en cytométrie de flux (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*), nous avons éliminé les cellules exprimant les marqueurs spécifiques des cellules endothéliales et hématopoïétiques (CD31⁻CD45⁻TER119⁻ ou *Lin⁻*) et séparé les populations exprimant le *heat stable antigen* (HSA ou CD24) selon leur niveau d'expression de l'inté-

grine $\beta 1$ (ou CD29): $\text{Lin}^- \text{CD24}^+ \text{CD29}^{\text{lo}}$ et $\text{Lin}^- \text{CD24}^+ \text{CD29}^{\text{hi}}$. Elles seront nommées Lum et CSMa respectivement dans la suite du texte. Les cellules Lum expriment un niveau élevé de kératine 18, un marqueur spécifique de l'épithélium luminal, tandis que les CSMa expriment fortement la kératine 14, marqueur spécifique du myo-épithélium. Cultivées *in vitro* dans une matrice extra-cellulaire (matrigel), les cellules Lum forment des structures à couche cellulaire unique capables de produire du lait après stimulation par l'hormone lactogénique prolactine, alors que les CSMa forment des structures beaucoup plus complexes, à forte densité cellulaire. Seule une petite proportion de ces structures est capable de produire du lait après stimulation par la prolactine. La trans-

plantation des CSMa (marquées par le transgène *LacZ*) dans le coussinet mammaire grasseux d'une souris pré-pubère dont on a retiré tout épithélium mammaire, aboutit à la formation d'un réseau de canaux possédant toutes les caractéristiques phénotypiques d'une glande mammaire, dont la capacité à se différencier pour produire du lait lors d'une grossesse. Des expériences de transplantation d'un nombre limité de cellules ont montré qu'une cellule $\text{Lin}^- \text{CD24}^+ \text{CD29}^{\text{hi}}$ sur 64 est capable de former une glande mammaire. De plus, des expériences de transplantations en série ont prouvé que ces cellules ont la capacité de s'autorenouveler. Ainsi, les cellules $\text{Lin}^- \text{CD24}^+ \text{CD29}^{\text{hi}}$ sont enrichies en cellules possédant les caractéristiques définissant une cellule souche : capacité

à reformer *in vivo* tous les lignages de l'épithélium mammaire et capacité d'auto-renouvellement.

Établissement d'une hiérarchie cellulaire

L'existence d'une hiérarchie cellulaire a été bien caractérisée dans le système hématopoïétique. Les cellules souches hématopoïétiques perdent progressivement leur capacité d'autorenouvellement pour donner naissance à des progéniteurs dont l'activité est restreinte à un lignage cellulaire spécifique [5]. De façon similaire, notre but est d'établir une hiérarchie cellulaire dans la glande mammaire et d'identifier les cellules progénitrices, à forte capacité proliférative, capables de former le myoépithélium d'une part, et les épithéliums luminaux des canaux et alvéoles d'autre part. À ce jour, nous avons identifié une population enrichie en progéniteurs des cellules luminales (Figure 1B). En effet, la population Lum peut être subdivisée en deux sous-populations exprimant différents niveaux de l'intégrine $\beta 3$ ou CD61 [6]. Alors que toutes les cellules de la population enrichie en CSMa expriment CD61, seulement 30 % des cellules Lum expriment ce marqueur. Les cellules CD61^- ne forment qu'un nombre restreint de petites colonies *in vitro* tandis que les cellules Lum CD61^+ prolifèrent activement et ont une forte capacité à former des colonies. Ces colonies sont kératine 18⁺ et SMA⁻ (*smooth muscle actin*). L'ensemble de ces résultats suggère que les cellules Lum CD61^+ constituent une population de progéniteurs luminaux. De plus, la proportion de ces progéniteurs dans la glande mammaire est élevée au début de la puberté et diminue progressivement au cours de l'élongation des canaux pour atteindre un niveau stable à l'âge adulte. Lors de la phase de différenciation alvéolaire observée pendant la grossesse, le nombre de progéniteurs diminue dramatiquement. Cette population s'amplifie de nouveau après le sevrage pendant le remodelage de la glande. Ces résultats montrent que les cellules Lum CD61^+ représentent une

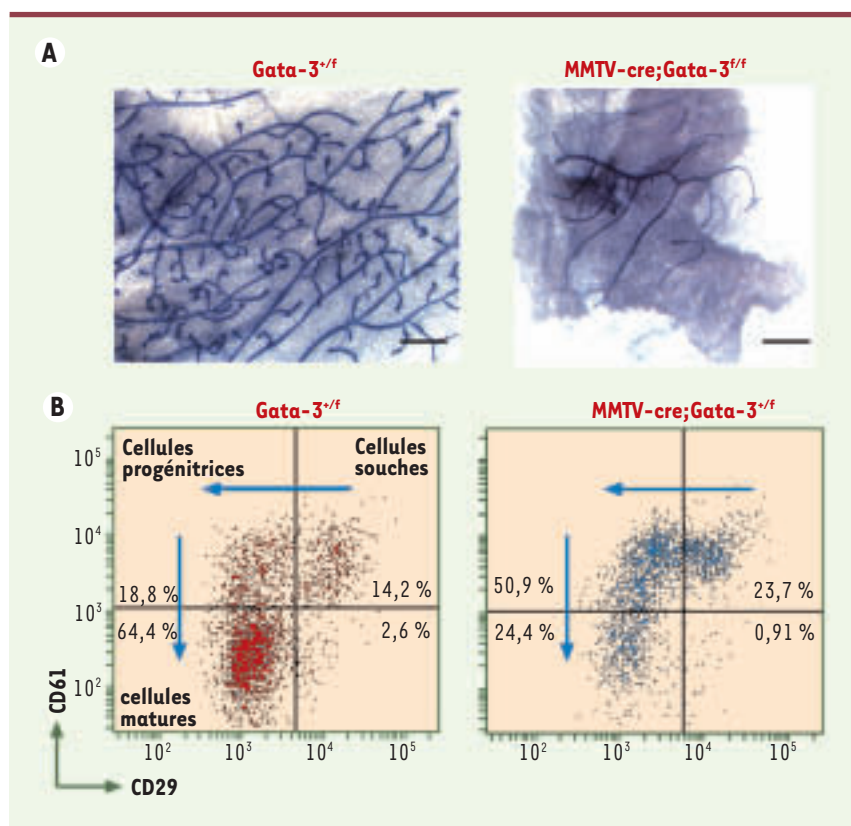


Figure 1. Gata-3 est un facteur clé du développement mammaire. **A.** Coloration par l'hématoxyline de la glande mammaire d'une souris adulte témoin ($\text{Gata-3}^{+/f}$) ou dont le gène *Gata-3* ($\text{MMTV-cre};\text{Gata-3}^{f/f}$) a été excisé, montrant le défaut de formation des canaux mammaires en l'absence de *Gata-3*. **B.** Représentation dot plot après analyse en cytométrie de flux, montrant le marquage $\text{CD61}/\text{CD29}$ des cellules $\text{Lin}^- \text{CD24}^+$ chez un animal témoin ou en l'absence de *Gata-3* ($\text{MMTV-cre};\text{Gata-3}^{f/f}$). En l'absence de *Gata-3*, les cellules progénitrices luminales ne se différencient pas en cellules matures aboutissant à l'accumulation de ces progéniteurs.

population progénitrice commune capable de se différencier en cellules canaliculaires et alvéolaires en fonction des phases de développement régies par les stimulations hormonales.

Gata-3 un facteur clé du développement mammaire

La différenciation cellulaire est dépendante de la régulation de l'activité des gènes de sorte que à chaque étape de différenciation, certains gènes sont transcriptionnellement actifs et d'autres sont réprimés. Nous avons étudié le rôle du facteur de transcription Gata-3 lors des différentes phases de différenciation de la glande [6]. Gata-3 est exprimé dès les premières phases embryonnaires du développement mammaire. Après la naissance, Gata-3 est exprimé de façon stable au cours de la puberté, chez l'adulte et pendant la grossesse. Cette expression est restreinte aux cellules de l'épithélium luminal. Grâce au système LoxP/Cre-recombinase, nous avons excisé Gata-3 dans l'épithélium mammaire à différentes phases du développement, en choisissant les promoteurs appropriés pour contrôler l'expression de Cre. La délétion lors de l'embryogenèse (Kératine14-cre/Gata-3^{f/f}) a montré que Gata-3 est nécessaire pour la formation des bourgeons mammaires primaires. Lorsque Gata-3 est excisé pendant la

puberté (MMTV-cre/Gata-3^{f/f}), la glande se développe anormalement avec la formation d'un nombre réduit de canaux (Figure 1A). La morphologie de ces canaux est anormale avec notamment une diminution de l'expression du récepteur aux oestrogènes (ER α), marqueur définitif de la différenciation luminaire. Les femelles chez lesquelles Gata-3 est inactivé en milieu de grossesse (WAP-cre/Gata-3^{f/f}, WAP *wey acidic protein* est un composant du petit-lait) sont incapables de nourrir leur progéniture. Les glandes présentent un défaut de différenciation alvéolaire et une absence de production de lait. Gata-3 est donc nécessaire lors de multiples phases du développement mammaire [6, 7]. Ayant précédemment identifié une population enrichie en CSMa, une population de cellules luminales progénitrices (LumCD61⁺) et une population de cellules différenciées (LumCD61⁻), nous avons étudié le rôle de Gata-3 lors de la détermination cellulaire luminaire. L'expression de Gata-3 augmente graduellement au cours de la différenciation, passant d'un niveau faible dans les CSMa à un niveau élevé dans les cellules luminales matures. De façon intéressante, l'absence de Gata-3 au cours de la puberté (MMTV-cre/Gata-3^{f/f}) induit un blocage de la différenciation des cellules progénitrices LumCD61⁺ en cellules matures LumCD61⁻

(Figure 1B). De plus la surexpression de Gata-3 dans les CSMa induit l'expression de protéines du lait en l'absence de stimulation par la prolactine.

Ainsi Gata-3 est un facteur critique pour la différenciation cellulaire vers une destinée luminaire.

Origine cellulaire des cancers du sein

Les implications cliniques de ce travail peuvent être importantes. Des études de *microarray* ont permis de subdiviser les cancers du sein en cinq grandes familles ([8, 9], et voir l'article récent de E. Charaffe-Jauffret *et al.* dans *Médecine/Sciences* [10]). Le phénotype « luminal » (subdivisé en groupes A et B) représente la grande majorité des cancers du sein. Ce type de cancer est ER α ⁺PR⁺, exprime de forts niveaux de Gata-3 et possède un meilleur pronostic. Les autres sous-types sont appelés « normal-like », « basal » (ER α ⁻PR⁻ErbB2⁺) et ErbB2⁺. Le phénotype « basal » présente le pire pronostic. L'existence de ces différences phénotypiques suggère une origine cellulaire différente pour chaque type de cancer. Nous avons montré que les CSMa possèdent des caractéristiques phénotypiques du sous-type basal (ER α ⁻PR⁻ErbB2⁺) pouvant suggérer que les CSMa sont les cibles de mutations oncogéniques induisant ces tumeurs [11]. Ces dernières pourraient également avoir pour origine un progéniteur bipotent (luminal et myoépithélial), un progéniteur luminal encore non différencié, une cellule épithéliale luminaire ayant perdu l'activité de Gata-3 et ainsi perdu l'expression de ER α et de marqueurs luminaux, ou encore une cellule du lignage myoépithélial. Nos travaux montrant le rôle critique de Gata-3 pour la différenciation des cellules luminales normales pourraient expliquer pourquoi les tumeurs luminales ER α ⁺, exprimant de forts niveaux de Gata-3, sont plus différenciées et, de ce fait, ont un meilleur pronostic. L'origine de ces tumeurs peut également être variée. Une petite proportion seulement des cellules progénitrices LumCD61⁺ expriment ER α tandis que la majorité des cellules différenciées sont ER α ⁺. Ces tumeurs pour-

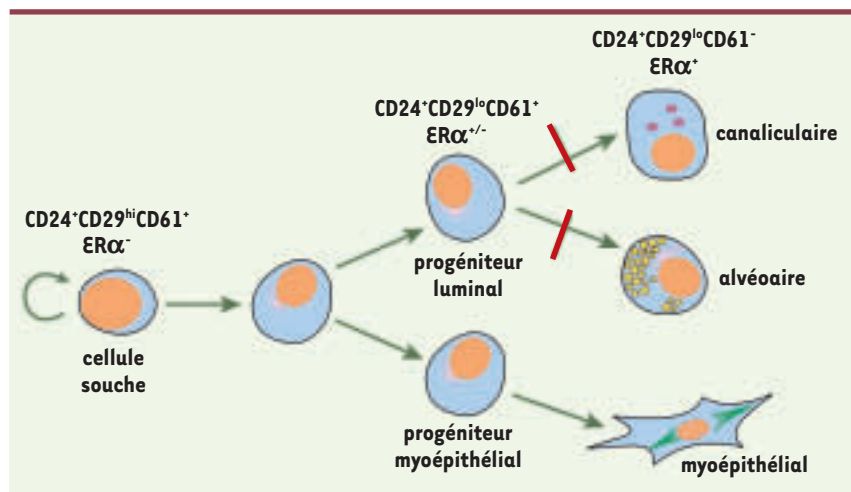


Figure 2. Modèle proposant une hiérarchie cellulaire dans la glande mammaire et indiquant le rôle clé de Gata-3 (barres rouges : inactivation conditionnelle) pour la différenciation des progéniteurs luminaux.

raient provenir de cellules progénitrices ou de cellules différenciées ayant acquis une capacité proliférative.

L'ensemble de ces questions reste en suspens et l'identification d'une hiérarchie cellulaire mammaire dans le tissu humain pourra apporter certaines réponses. ♦

Mammary stem and progenitor cells: critical role of the transcription factor Gata-3

REMERCIEMENTS

M-L A-L est financée par un fellowship Inserm/NHMRC. L'auteur remercie le Dr Jacques Bertoglio pour sa relecture critique du manuscrit.

RÉFÉRENCES

1. Hennighausen L, Robinson GW. Information networks in the mammary gland. *Nat Rev* 2005 ; 6 : 715-25.
2. Deome KB, Faulkin LJ Jr, Bern HA, Blair PB. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res* 1959 ; 19 : 515-20.
3. Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 2006 ; 439 : 84-8.
4. Stingl J, Eirew P, Ricketson I, et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 2006 ; 439 : 993-7.
5. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000 ; 404 : 193-7.
6. Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, et al. Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol* 2007 ; 9 : 201-9.
7. Kourou-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD, Werb Z. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell* 2006 ; 127 : 1041-55.
8. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000 ; 406 : 747-52.
9. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 10869-74.
10. Charafe-Jauffret E, Chaffanet M, Bertucci F, et al. Les cancers du sein : vers un modèle cellulaire et moléculaire intégré. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 626-32.
11. Asselin-Labat ML, Shackleton M, Stingl J, et al. Steroid hormone receptor status of mouse mammary stem cells. *J Natl Cancer Inst* 2006 ; 98 : 1011-4.

NOUVELLE

Mutations de l'amphiphysine 2 (BIN1) dans les myopathies centronucléaires récessives

Anne Toussaint, Anne-Sophie Nicot, Jean-Louis Mandel, Jocelyn Laporte

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, F-67400 France ;
Inserm, U596, Illkirch, F-67400 France ;
CNRS, UMR7104, Illkirch, F-67400 France ;
Université Louis Pasteur, Strasbourg, F-67000 France ;
Collège de France, chaire de Génétique Humaine, 75005 Paris, France.
mtm@igbmc.u-strasbg.fr

► Les myopathies centronucléaires (CNM) sont des myopathies rares caractérisées par l'apparition d'une hypotonie associée à une histologie anormale des fibres musculaires squelettiques, avec présence de noyaux en position centrale (Figure 1). Les CNM sont classiquement répertoriées en trois formes : la forme liée au chromosome X aussi appelée myopathie myotubulaire qui est la plus fréquente et la plus sévère avec une hypotonie généralisée néonatale, la forme intermédiaire autosomique récessive apparaissant dans l'enfance, et la forme autosomique dominante la plus légère apparaissant à l'âge adulte avec une hypotonie lentement progressive [1]. Des mutations dans le gène codant pour la myotubularine (MTM1) sont responsables de la forme liée au chromosome X [2], et des mutations dans la dynamine 2 (DNM2) ont été identifiées dans la majorité des cas de CNM autosomiques dominantes [3]. La myotubularine est une phosphatase à phosphoinositides impliquée

dans le trafic membranaire et l'endocytose. La dynamine 2 est quant à elle une grande GTPase dont le rôle est également important pour l'endocytose, le trafic membranaire mais aussi l'assemblage des filaments d'actine et la fonction du centrosome [4]. L'identification de ces deux gènes suggérerait que les myopathies centronucléaires seraient liées, au moins en partie, à des défauts du trafic membranaire. En revanche aucun gène impliqué dans les formes autosomiques récessives n'avait encore été identifié à ce jour. Les patients atteints de CNM autosomiques récessives présentent une fai-

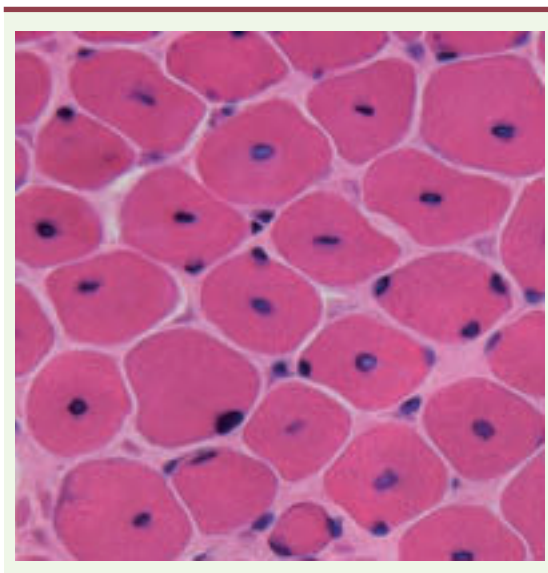


Figure 1. Immuno-marquage à l'hématoxyline-éosine d'une coupe transversale de muscle d'un patient atteint de myopathie centronucléaire récessive (muté dans le gène BIN1). La majorité des fibres musculaires présente une localisation anormalement centrale des noyaux (violet) (© photo : Anders Oldfors).