

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-

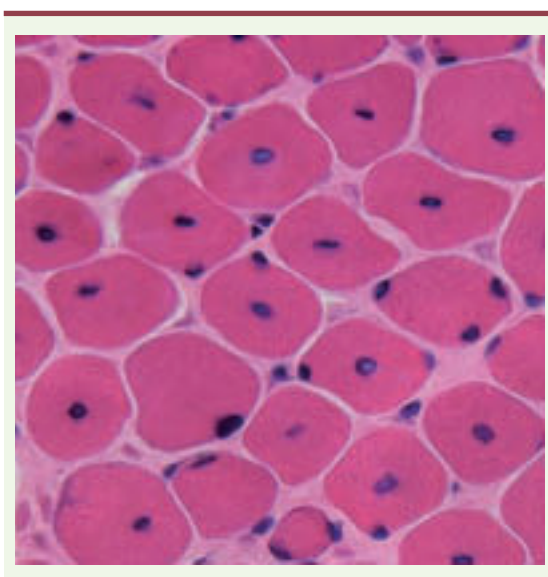


Figure 1. Immuno-marquage à l'hématoxyline-éosine d'une coupe transversale de muscle d'un patient atteint de myopathie centronucléaire récessive (muté dans le gène BIN1). La majorité des fibres musculaires présente une localisation anormalement centrale des noyaux (violet) (© photo : Anders Oldfors).



blesse musculaire progressive touchant leurs extrémités proximales et/ou distales, l'hypotonie s'accompagnant ou non d'une ophtalmoparésie [1]. Ne disposant que de familles de très petite taille, nous avons préféré l'approche candidats fonctionnels à celle du clonage positionnel. Les protéines candidates ont été sélectionnées pour leurs fonctions reliées à celles de la myotubularine. L'amphiphysine 2 (BIN1) est apparue comme un bon candidat par son implication dans le trafic membranaire, sa régulation par les phosphoinositides et son rôle dans la biogenèse des tubules-T du muscle squelettique [5], ces derniers semblant altérés dans les CNM liées au chromosome X. De plus, il a été montré que l'absence de l'orthologue de BIN1 chez la drosophile conduisait à des anomalies du muscle squelettique [6]. Nous avons tout d'abord identifié une mutation dans *BIN1* créant un codon stop prématuré chez un malade atteint de CNM autosomique récessive. La cartographie par homozygotie sur puce SNP Affymetrix à partir de cas sporadiques issus de familles consanguines nous a permis d'identifier 2 substitutions d'acides aminés dans 2 familles homozygotes pour la région 2q14 contenant *BIN1*. BIN1 est constitué d'un domaine BAR (*Bin1/amphiphysin/RVS167*) capable de courber les membranes, d'un domaine de fixation au facteur de transcription Myc, et

d'un domaine SH3 (*Src homology 3*) liant des protéines à domaine riche en proline tels que la synaptojanine et la dynamine 2. Dans le cas de l'isoforme 8 de BIN1, spécifique du muscle squelettique, la protéine possède également un domaine qui se lie aux phosphoinositides et permettrait la tubulation des membranes lors de la formation des tubules-T dans le muscle [5]. Les deux substitutions d'acides aminés sont localisées dans le domaine BAR tandis que le codon stop prématuré est situé dans le domaine SH3. Afin d'étudier l'impact des mutations du domaine BAR, nous avons observé la capacité de BIN1-iso8 sauvage et muté à tubuler les membranes après surexpression dans des cellules COS-1 (Figure 2), cette propriété de BIN1-iso 8 sauvage ayant déjà été décrite [5]. Les deux substitutions abolissent la capacité de la protéine à produire des tubules, tandis que la mutation non-sens permet une tubulation normale. Il a été montré que la dynamine 2, qui est mutée dans la forme dominante des CNM, se lie au domaine SH3 de BIN1 [7]. Des tests d'interaction par *GST-pull down* avec le domaine SH3 sauvage ou muté démontrent que le codon stop prématuré, enlevant la moitié du domaine SH3, diminue fortement l'interaction entre les deux protéines. *Ex vivo*, cette mutation perturbe le recrutement par BIN1-iso8 de la dynamine 2

aux tubules membranaires. Ces résultats permettent donc l'identification du premier gène muté pour les myopathies centronucléaires autosomiques récessives, et suggèrent que plusieurs fonctions de BIN1 pourraient être altérées [8]. Rappelons que BIN1 (amphiphysine 2) est également proposé jouer un rôle dans le cancer du sein comme modificateur négatif de la progression tumorale [9] et que l'amphiphysine 1 est un régulateur du recyclage des vésicules synaptiques. Il

est intéressant de noter que ces résultats permettent aussi de relier les formes autosomiques récessives et dominantes et suggèrent qu'un découplage entre BIN1 et la dynamine 2 serait à l'origine des CNM. De plus, ces deux protéines sont régulées par les phosphoinositides ce qui pourrait constituer le lien avec la myotubularine. Il reste à identifier les autres gènes des CNM autosomiques récessives, les mutations de BIN1 ne rendant compte que d'environ 5 % des familles étudiées.

Le système sarcotubulaire est constitué d'une invagination de la membrane plasmique, le tubule-T, encadrée des citernes du réticulum sarcoplasmique et permet le couplage excitation-contraction musculaire. L'immuno-marquage d'une biopsie musculaire de patient, avec des marqueurs associés aux tubules-T au cours du développement ou dans le muscle mature, met en évidence une augmentation du marquage de la cavéoline-3 et du DHPR α à l'intérieur des fibres, et des vacuoles élargies cerclées de cavéoline-3 [8]. Une perturbation de la biogenèse des tubules-T et/ou de l'endocytose par des mutations dans *BIN1* pourrait donc être à l'origine de la pathologie musculaire chez les patients. La caractéristique la plus marquante des CNM est la localisation centrale des noyaux. Au cours de la myogenèse, les noyaux migrent du centre des fibres vers la périphérie. Les patients atteints de myopathies centronucléaires ne présentent pas de phénomènes de nécrose-régénération qui sont la cause de la centralisation des noyaux dans certaines dystrophies telle que la dystrophie de Duchenne, et le modèle souris construit pour mimer la forme liée à l'X ne présente pas de défaut de maturation des fibres musculaires [10]. Diverses hypothèses pourraient expliquer que le défaut des protéines mutées dans les CNM conduise à la centralisation des noyaux: (1) des anomalies de remodelage des membranes affecteraient également la membrane nucléaire; (2) la myotubularine et BIN1 régularaient la fonction de la dynamine 2 sur le centrosome; (3) il existerait une fonction encore inconnue de ces trois protéines sur le positionnement des noyaux. \diamond

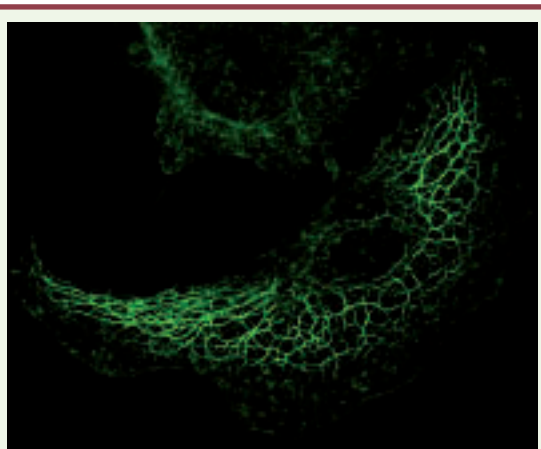


Figure 2. Test de tubulation des membranes *ex vivo*. Des cellules COS-1 ont été transfectées avec une construction BIN1-iso8 sauvage fusionnée à la GFP. Lorsqu'elle est surexprimée, la protéine induit la formation de tubules membranaires.

Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) cause autosomal recessive centronuclear myopathy

REMERCIEMENTS

Les familles et les cliniciens ayant participé à l'étude, et Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Collège de France, Agence Nationale de la Recherche et Association Française contre les Myopathies.

RÉFÉRENCES

1. Pierson CR, Tomczak K, Agrawal P, et al. X-linked myotubular and centronuclear myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64 : 555-64.
2. Laporte J, Hu, LJ, Kretz, C, et al. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet* 1996; 13 : 175-82.
3. Bitoun M, Maugeenre S, Jeannet PY, et al. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet* 2005; 37 : 1207-9.
4. Praefcke GJ, McMahon HT. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5 : 133-47.
5. Lee E, Marcucci M, Daniell L, et al. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 2002; 297 : 1193-6.
6. Razzaq A, Robinson IM, McMahon HT, et al. Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 2001; 15 : 2967-79.
7. Owen DJ, Wigge P, Vallis Y, et al. Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J* 1998; 17 : 5273-85.
8. Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, et al. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* 2007; 39 : 1134-9.
9. Chang MY, Boulden J, Sutanto-Ward E, et al. Bin1 ablation in mammary gland delays tissue remodeling and drives cancer progression. *Cancer Res* 2007; 67 : 100-7.
10. Buj-Bello A, Laugel V, Messaddeq N, et al. The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 : 15060-5.

NOUVELLE

Baisse des capacités régénératives du foie avec l'âge Quelques pistes moléculaires...

Hélène Gilgenkrantz, Jacques-Emmanuel Guidotti

Inserm U567, CNRSUMR 81-04, Institut Cochin, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France. gilgenkrantz@cochin.inserm.fr

Une histoire ancienne...

Le temps ne fait rien à l'affaire... Avec le temps, va tout s'en va... : ainsi en est-il de la régénération hépatique ! Bien sûr, la baisse des capacités régénératives avec l'âge n'est pas propre au foie. La sénescence induit également une moindre capacité réparatrice de la peau ou du muscle et une diminution de la qualité ou de la quantité de certaines cellules souches. Pourtant, peu d'explications moléculaires ont été avancées jusqu'à présent pour expliquer la perte des capacités prolifératives avec l'âge. Le raccourcissement des télomères et la composition du complexe qui y est associé interviennent dans la limitation de la capacité répliquative de certaines cellules, notamment lorsque celles-ci se divisent en permanence [1]. Deux pistes avaient été suggérées pour le foie qui, finalement, pourraient n'en former qu'une !

Après avoir retiré chirurgicalement les deux tiers du foie d'une souris jeune, 95 % des hépatocytes restants sortent de leur quiescence de façon quasi-syn-

chrone décrivant un pic de synthèse d'ADN étroit. Cette prolifération contrôlée du foie est le fruit de l'activation d'une cascade de gènes savamment orchestrée codant notamment des cytokines, des facteurs de transcription, des facteurs de croissance et finalement des protéines du cycle cellulaire [2]. Par conséquent, aucune population cellulaire spécifique dite souche n'est requise au cours de ce processus. En revanche, chez la souris de plus de 12 mois, le pic de synthèse d'ADN est considérablement émoussé. De même, la progression en mitose est significativement diminuée et l'induction des protéines nécessaires à la prolifération est retardée.

C/EBP α et diminution de l'activité régénérative du foie âgé

L'équipe de G. Darlington (Houston, États-Unis), avait démontré, il y a environ 10 ans, que le foie de vieux rats contenait des niveaux anormalement élevés du facteur de transcription C/EBP α alors que ce dernier diminue de 4 fois chez l'animal jeune après hépatectomie [3]. Or, les animaux

dépourvus de C/EBP α ont une augmentation de leur prolifération hépatocytaire pré-natale, suggérant un rôle négatif de C/EBP α sur la progression du cycle cellulaire. Après des années de recherches infructueuses pour tenter d'identifier les cibles transcriptionnelles de C/EBP α , il semble qu'en réalité ce facteur ralentisse le cycle cellulaire en inhibant directement dans le foie, les kinases cdk2 et cdk4 [4, 5] et potentiellement en interagissant avec les facteurs E2F et Rb (*Retinoblastoma*). Timchenko et son équipe (Houston, Texas) ont alors mis en évidence, spécifiquement dans le foie de souris âgées (22 mois), un complexe protéique de haut poids moléculaire qui comprend, en dehors du facteur C/EBP α , les protéines E2F4, Rb et Brahma (Brm) [6]. Des expériences d'immuno-précipitation ont alors montré que l'interaction protéique était directe entre C/EBP α et Brm. En revanche, et contrairement au foie de souris jeune (8 mois), aucune association n'est retrouvée avec la protéine cdk2. L'augmentation du facteur Brm dans le foie des animaux âgés semble responsable de ce changement de nature des complexes avec l'âge [6]. Brm et cdk intera-