sente dans les tumeurs, et si les gènes qu'ils contiennent jouent ou non un rôle dans le processus oncogénique. En d'autres termes, il faut déterminer le rôle de ces régions dans l'oncogenèse. Cependant, historiquement, les SFC ont été majoritairement cartographiés dans les lymphocytes [15]. En accord avec ces nouveaux résultats [5], pour déterminer l'implication des SFC dans les remaniements génomiques associés aux différents types de cancers, une carte de ces SFC devra être établie dans le type cellulaire dont le cancer est originaire. ♦

Genome: does a paucity of initiation events lead to fragility?

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

1. Durkin SG, Glover TW. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet* 2007 ; 41 : 169-92.
2. Ait MF, Durkin SG, Ragland RL, Glover TW. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair (Amst)* 2006 ; 5 : 1126-35.
3. Bignell GR, Greenman CD, Davies H, et al. Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature* 2010 ; 463 : 893-8.
4. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability : an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010 ; 11 : 220-8.
5. Letessier A, Millot GA, Koundrioukoff S, et al. Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* 2011 ; 470 : 120-3.
6. Le Beau MM, Rassool FV, Neilly ME, et al. Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction : implications for the mechanism of fragile site induction. *Hum Mol Genet* 1998 ; 7 : 755-61.
7. Schwartz M, Zlotorynski E, Kerem B. The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Lett* 2006 ; 232 : 13-26.
8. Helmrich A, Stout-Weider K, Hermann K, et al. Common fragile sites are conserved features of human and mouse chromosomes and relate to large active genes. *Genome Res* 2006 ; 16 : 1222-30.
9. Palumbo E, Matricardi L, Tosoni E, et al. Replication dynamics at common fragile site FRA6E. *Chromosoma* 2010 ; 119 : 575-87.
10. Zanesi N, Fidanza V, Fong LY, et al. The tumor spectrum in FHIT-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 10250-5.
11. Grégoire D, Brodolin K, Méchali M. HoxB domain induction silences DNA replication origins in the locus and specifies a single origin at its boundary. *EMBO Rep* 2006 ; 7 : 812-6.
12. Dazy S, Gandrillon O, Hyrien O, Prioleau MN. Broadening of DNA replication origin usage during metazoan cell differentiation. *EMBO Rep* 2006 ; 7 : 806-11.
13. Hansen RS, Thomas S, Sandstrom R, et al. Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 139-44.
14. Hiratani I, Ryba T, Itoh M, et al. Global reorganization of replication domains during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Biol* 2008 ; 6 : e245.
15. Sutherland GR. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* 1977 ; 197 : 265-6.

NOUVELLE

La révolution 3D des cellules souches : fabrication d'une rétine *in vitro*

Muriel Perron

UPR 3294 CNRS neurobiologie et développement,
Université Paris-Sud, Orsay,
France.
muriel.perron@u-psud.fr

► Depuis plus d'un demi-siècle les biologistes ont recours à la culture cellulaire dite conventionnelle pour maintenir, en dehors d'un organisme, des cellules qui ne sont pas organisées en un tissu mais qui sont capables de se diviser et/ou de se différencier *in vitro*. Pour relever le défi de fabriquer *ex vivo* des tissus, voire des organes, des cultures cellulaires tridimensionnelles ont récemment été mises au point. Ce type d'approche vient de permettre à des chercheurs de l'Institut Riken au Japon de fabriquer pour la première fois une rétine en culture. Ces chercheurs ont montré que des cellules souches embryonnaires (CSE) pluripo-

tentes sont capables de s'auto-organiser *in vitro* pour former une structure tridimensionnelle respectant la forme, la polarité, la composition et l'agencement des différents types cellulaires d'une rétine telle qu'observée *in vivo*. Il semblerait donc que la morphogenèse rétinienne soit dictée par un programme intrinsèque au tissu et ne dépende pas, comme nous l'imaginions, d'inductions en cascades entre différents territoires embryonnaires. Cette découverte pourrait trouver des applications dans le domaine de la thérapie cellulaire pour soigner des patients atteints de dégénérescence rétinienne pour lesquels l'ab-

sence actuelle de traitement conduit à une perte de vision. Grâce à une telle avancée technologique, du tissu rétinien pourrait en effet être fabriqué en boîte et à la carte, pour une application de greffe aux malades.

Comment se forme un œil ?

La formation de l'œil des vertébrés a depuis longtemps fasciné les embryologistes et son étude fut à l'origine de la découverte de concepts fondamentaux en biologie du développement, comme les phénomènes d'induction ou de compétence. L'organogenèse de l'œil commence en fin de neurulation par

Figure 1. Développement in vivo d'une rétine de vertébré. Les photos illustrent les étapes de développement du stade vésicule optique au stade cupule optique. Il s'agit de coupes transversales de rétines en formation à différents stades de développement du xénope (espèce de grenouille). L'hybridation *in situ* révèle en bleu l'expression du gène *Rx*, marqueur de la rétine neurale en formation. Évaginée à partir du tube neural, la vésicule optique (A) s'invagine progressivement (B, C) pour former la cupule optique (D). CO : cupule optique ; E : épiderme ; EPR : épithélium pigmenté rétinien présomptif ; ME : mésenchyme extraoculaire ; RN : rétine neurale ; TN : tube neural ; VC : vésicule cristallinienne ; VO : vésicule optique. Barre d'échelle : 50 µm (photos : Morgane Locker).

l'évagination des vésicules optiques dans la région antérieure du tube neural [1] (Figure 1). L'épiderme contre lequel ces vésicules entrent en contact va alors s'épaissir puis s'invaginer en vésicules cristalliniennes pour donner les cristallins. Les vésicules optiques vont, elles aussi, subir un processus d'invagination et former les cupules optiques. Au sein de ces cupules, des phénomènes de spécification (*patterning*) vont alors gouverner la mise en place d'identités régionales distinctes. Deux régions, distale et proximale, vont notamment s'individualiser : la rétine neurale et l'épithélium pigmenté rétinien respectivement. Ces événements morphogénétiques dépendent clairement d'interactions coordonnées entre la rétine, l'épiderme de surface et le mésenchyme extra-oculaire. Cependant, la complexité des remaniements morphogénétiques et la multiplicité des signaux mis en jeu n'ont pas permis de déterminer sans ambiguïté l'implication de chaque tissu. En particulier, le rôle de l'épiderme de surface et du cristallin dans l'invagination de la vésicule optique reste l'objet de controverses [2]. Une fois la cupule optique formée, les progéniteurs rétinien entament leur

processus de différenciation qui donne naissance aux différents types cellulaires spécialisés qui composeront la rétine fonctionnelle, dont les photorécepteurs, neurones capables de capter la lumière et de la transformer en influx nerveux.

De la cellule souche aux cellules rétiniennes

Ces dernières années, de nombreuses équipes ont cherché à produire des photorécepteurs *in vitro* à partir de CSE. Le défi était de déterminer la combinaison de facteurs la plus appropriée [3, 4]. L'équipe de Yoshiki Sasai a mis au point un protocole séquentiel de culture pour diriger des CSE murines vers un destin rétinien [5]. Bien que ces travaux montrent qu'il est possible d'induire *in vitro* des neurones de rétine, les conditions n'étaient pas réunies pour forcer ces cellules à s'organiser en une structure épithéliale. En revanche, des progéniteurs rétiniens issus de la différenciation de CSE puis réimplantés dans un embryon de grenouille, sur ses flancs par exemple, s'agencent spontanément pour former des rétines ectopiques [6]. Une étape était franchie, mais d'autres défis restaient à relever pour réaliser le rêve de certains de former de toute pièce un œil *ex vivo*.

De la cellule souche à une rétine 3D

C'est à nouveau l'équipe de recherche de Yoshiki Sasai, de l'Institut Riken au Japon, qui vient de réussir l'exploit de fabriquer des rétines à partir de CSE de souris, et ce, exclusivement en culture. Son équipe eut l'idée de cultiver les cellules non plus en deux dimensions sur le fond d'une boîte de Pétri mais en 3D sur du matrigel [7]. Le matrigel est une mixture gélatineuse protéique, dont la composition, la structure et les propriétés physiques constituent pour les cellules un substrat similaire aux matrices extracellulaires rencontrées dans leur milieu naturel. En associant des conditions de culture promouvant le destin neural à ce support matrigel, l'équipe japonaise a réussi à créer l'environnement adéquat pour que s'opèrent *in vitro* des mouvements morphogénétiques conduisant à la formation d'une rétine en 3D.

Après six jours de culture dans ces conditions, les agrégats de CSE forment des sphères constituées d'un neuroépithélium polarisé (côté apical à l'intérieur, côté basal à l'extérieur). Au sein de ces sphères, on distingue différentes populations cellulaires exprimant ou non des facteurs rétiniens, dont le marqueur *Rx*. Deux jours plus tard, les régions exprimant *Rx* se mettent à bourgeonner pour former des structures étonnamment similaires aux vésicules optiques d'un embryon de souris. Selon les sphères, il peut y avoir de une à quatre vésicules optiques en protrusion. Chaque vésicule va alors se subdiviser, comme elle le ferait *in vivo*, en une portion distale qui exprime des marqueurs de rétine neurale, et une portion proximale qui exprime des marqueurs d'épithélium pigmenté rétinien. Se produisent ensuite spontanément des phénomènes d'invagination qui conduisent à la formation d'une cupule optique. Les cellules ont donc réussi dans ce support 3D à s'auto-organiser spatialement et à conduire leur morphogenèse indépendamment du reste de l'embryon. En outre, ces observations démontrent que la formation de la cupule optique peut s'effectuer en l'absence de cristallin et de tissu épidermique sus-jacent.

Figure 2. Les différentes étapes de formation in vitro d'une rétine en 3D à partir de CSE de souris. Cultivés en agrégats dans du matrigel, les CSE forment un épithélium. Certaines portions, exprimant le facteur rétinien Rx (en vert), vont s'évagner. Des mouvements cellulaires d'aplatissement, d'inflexion et d'invagination vont ensuite se produire spontanément dans ces régions (flèches). Ainsi voit-on se développer progressivement une cupule optique. Quatre phases peuvent être distinguées dans ce processus : au cours de la phase 1, la vésicule optique a une forme hémisphérique ; en phase 2, l'expression de Rx diminue dans la partie proximale (vert clair) pour se restreindre uniquement à la partie distale qui s'aplatit ; la phase 3 conduit à une réduction des angles de jonction entre les domaines de la rétine neurale et de l'épithélium pigmenté présomptif (à ce stade seule la rétine neurale exprime Rx, vert) ; lors de la phase 4, l'épithélium de la rétine neurale s'invagine pour former une cupule optique.

Les auteurs ont modélisé cette morphogenèse spontanée en quatre phases successives, analogues à celles décrites *in vivo* (Figure 2) et se sont penchés sur les mécanismes moléculaires et biophysiques qui la gouvernent. Pour chacun des domaines mis en place, différents paramètres ont été examinés : (1) les propriétés du cytosquelette connues pour façonner la forme de divers épithéliums ; (2) la rigidité tissulaire à l'aide d'un microscope à force atomique ; (3) le niveau de compression entre cellules via des expériences d'ablations cellulaires ciblées à l'aide d'un faisceau laser d'excitation multiphotonique ; (4) l'expression génique différentielle. L'ensemble de leurs résultats démontre qu'au cours de la morphogenèse *in vitro* de l'épithélium rétinien, différentes régions acquièrent spontanément et séquentiellement des propriétés biochimiques, moléculaires et mécaniques distinctes.

La cupule optique va ensuite grossir grâce aux divisions cellulaires. Pendant cette étape, des migrations complexes des noyaux interviennent selon l'axe apicobasal (elles sont classiquement observées dans les neuroépithéliums et

sont appelées mouvements nucléaires interkinétiques). Dix à 14 jours plus tard, une stratification s'opère, signe de différenciation cellulaire. Tous les types majeurs rétiens ont pu être détectés : les photorécepteurs, les cellules ganglionnaires, horizontales, bipolaires, amacrines, et les cellules gliales de Müller. Il est remarquable de constater que ces différents types cellulaires naissent dans le même ordre qu'*in vivo* indiquant que leur histogenèse naturelle est conservée *in vitro*.

Ainsi, ces travaux montrent qu'une véritable architecture rétinienne est capable de s'autoformer *in vitro* à partir de CSE et qu'elle respecte le programme spatiotemporel observé au cours de l'embryogenèse. Il s'agit du tissu le plus complexe jamais créé *in vitro*, une véritable prouesse technologique, qui ouvre de nombreuses pistes de recherche pour la formation d'organes en culture.

Applications en médecine régénérative

Si un tel système est un modèle révolutionnaire pour étudier en contexte simplifié la morphogenèse de l'œil, il n'en constitue pas moins une avancée

notable en recherche appliquée dans le domaine médical ophtalmologique. La dégénérescence des photorécepteurs dans des maladies telles que la rétinopathie pigmentaire ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge conduit progressivement à la cécité. On estime à 30 000 le nombre de patients atteints de rétinopathies pigmentaires en France et environ 12 % de la population âgée de 65 à 75 ans présente une dégénérescence maculaire. La médecine régénérative est un espoir pour le traitement de ces pathologies oculaires [3, 8]. Des rétines synthétiques humaines pourraient constituer une source de cellules transplantables chez les patients. Par ailleurs, elles pourraient servir de modèles *in vitro* de maladies de la rétine ou être utilisées pour explorer l'intérêt de thérapies géniques ou pour cribler des composés à la recherche de nouveaux médicaments. Au préalable et dans une perspective de recherche translationnelle, la prochaine étape sera d'adapter le protocole de Y. Sasai et collaborateurs aux CSE humaines.

3D revolution of stem cells: building a retina in vitro

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie Morgane Locker pour sa relecture et pour les photos de rétines de la Figure 1.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

1. Fuhrmann S. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol* 2010 ; 93 : 61-84.
2. Okada TS. From embryonic induction to cell lineages: revisiting old problems for modern study. *Int J Dev Biol* 2004 ; 48 : 739-42.
3. Lamba DA, Karl MO, Reh TA. Strategies for retinal repair: cell replacement and regeneration. *Prog Brain Res* 2009 ; 175 : 23-31.
4. Comyn O, Lee E, McLaren RE. Induced pluripotent stem cell therapies for retinal disease. *Curr Opin Neurol* 2010 ; 23 : 4-9.
5. Ikeda H, Osakada F, Watanabe K, et al. Generation of Rx⁺/Pax6⁺ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 11331-6.
6. Viczian AS, Solessio EC, Lyuu Y, Zuber ME. Generation of functional eyes from pluripotent cells. *PLoS Biol* 2009 ; 7 : e1000174.
7. Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 2011 ; 472 : 51-6.
8. West EL, Pearson RA, McLaren RE, Sowden JC, Ali RR. Cell transplantation strategies for retinal repair. *Prog Brain Res* 2009 ; 175 : 3-21.

Collection SCIENCE ET BIOMÉDECINE

ISBN : 2-84254-107-3 64 pages

ISBN : 2-84254-108-1 80 pages

ISBN : 2-84254-111-1 86 pages

Bon de commande

À retourner à EDK, 2, rue Troyon - 92316 Sèvres Cedex
Tél. : 01 55 64 13 93 - Fax : 01 55 64 13 94 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Les oligo-éléments** : 10 € + 3 € de port = **13 € TTC**

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Acides gras, acides aminés et peptides** : 12 € + 3 € de port = **15 € TTC**

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Stress oxydatif et alicaments** : 14 € + 3 € de port = **17 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

☐ Par chèque, à l'ordre de **EDK**

☐ Par carte bancaire : ☐ Visa ☐ Eurocard/Mastercard

Carte n° |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |