

Tag-lite et Richard Miller (Chicago) pour nous avoir fourni le clone de CXCR4.

## LIENS D'INTÉRÊT

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

## RÉFÉRENCES

1. Rekad T, Gronning M. Treatment of spasticity related to multiple sclerosis with intrathecal baclofen: a long-term follow-up. *J Rehabil Med* 2011 ; 43 : 511-4.
2. Gorsane MA, Kebir O, Hache G, et al. Is baclofen a revolutionary medication in alcohol addiction management? Review and recent updates. *Subst Abuse* 2012 ; 33 : 336-49.
3. Addolorato G, Leggio L, Agabio R, et al. Baclofen: a new drug for the treatment of alcohol dependence. *Int J Clin Pract* 2006 ; 60 : 1003-8.
4. Bowery NG. GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993 ; 33 : 109-47.
5. Froestl, W. Chemistry and pharmacology of GABAB receptor ligands. *Adv Pharmacol* 2010 ; 58 : 19-62.
6. Guyon A, Kussrow A, Olmsted IR, et al. Baclofen and other GABAB receptor agents are allosteric modulators of the CXCL12 chemokine receptor CXCR4. *J Neurosci* 2013 ; 33 : 11643-54.
7. Banisadr G, Rostene W, Kitabgi P, Parsadaniantz S. Chemokines and brain functions. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005 ; 4 : 387-99.
8. Guyon A, Massa F, Rovere C, Nahon JL. How cytokines can influence the brain: a role for chemokines? *J Neuroimmunol* 2008 ; 198 : 46-55.
9. Toth PT, Ren D, Miller RJ. Regulation of CXCR4 receptor dimerization by the chemokine SDF-1alpha and the HIV-1 coat protein gp120: a fluorescence resonance energy transfer (FRET) study. *J Pharmacol Exp Ther* 2004 ; 310 : 8-17.
10. Ortega A. A new role for GABA: inhibition of tumor cell migration. *Trends Pharmacol Sci* 2003 ; 24 : 151-4.
11. Guyon A, Skrzydelski D, Rovere C, et al. Stromal-cell-derived factor 1alpha /CXCL12 modulates high-threshold calcium currents in rat substantia nigra. *Eur J Neurosci* 2008 ; 28 : 862-70.
12. Pello OM, Martínez-Muñoz L, Parrillas V, et al. Ligand stabilization of CXCR4/delta-opioid receptor heterodimers reveals a mechanism for immune response regulation. *Eur J Immunol* 2008 ; 38 : 537-49.
13. Sohy D, Parmentier M, Springael JJ. Allosteric transinhibition by specific antagonists in CCR2/CXCR4 heterodimers. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 30062-9.
14. Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, et al. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 9895-903.
15. Babcock GJ, Farzan M, Sodroski J. Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 3378-85.
16. Baksh MM, Kussrow AK, Mileni M, et al. Label-free quantification of membrane-ligand interactions using backscattering interferometry. *Nat Biotechnol* 2011 ; 29 : 357-60.

## NOUVELLE

### Contrôle de la mitophagie par les microARN

#### Une étape clé de l'érythropoïèse

Isabelle Barde<sup>1</sup>, Benjamin Rauwel<sup>1</sup>, Ray Marcel Marin-Florez<sup>2</sup>, Andrea Corsinotti<sup>1</sup>, Elisa Laurenti<sup>1,3</sup>, Sonia Verp<sup>1</sup>, Sandra Offner<sup>1</sup>, Julien Marquis<sup>1</sup>, Adamandia Kapopoulou<sup>1</sup>, Jiri Vanicek<sup>2</sup>, Didier Trono<sup>1</sup>

> Un adulte en bonne santé produit jusqu'à cent milliards de nouveaux globules rouges chaque jour, afin d'en maintenir les stocks sanguins. Le globule rouge, ou érythrocyte, contient l'hémoglobine responsable de transporter l'oxygène des poumons vers l'ensemble du corps. L'érythrocyte a son origine dans la moelle osseuse, dérivant de la cellule souche hématopoïétique via un processus complexe de prolifération et de différenciation [1, 2]. Il reste encore beaucoup à apprendre sur les mécanismes moléculaires de ces événements, non seulement pour comprendre la cause de certains troubles hématologiques, mais aussi pour envisager un jour la production de globules rouges en laboratoire – un enjeu important pour la transfusion.

#### Le système KRAB/KAP1

Les génomes des vertébrés supérieurs codent pour des centaines de protéines à doigt de zinc dotées d'un domaine KRAB (KRAB-ZFP). Ces protéines reconnaissent des séquences spécifiques de l'ADN via leurs doigts de zinc, et y recrutent leur cofacteur universel KAP1 via le motif KRAB (*Kruppel-associated box*). KAP1, également connu sous les noms de TRIM28 (protéine à motif tripartite 28), TIF1β (facteur de transcription intermédiaire 1β), ou Krip-1 (*KRAB-interacting protein 1*), agit ensuite comme une plate-forme pour un complexe multimoléculaire qui réprime la transcription par l'induction d'hétérochromatine [3, 4]. Le système KRAB/KAP1 a probablement d'abord évolué pour minimiser les

<sup>1</sup>School of Life Sciences and Frontiers in Genetics Program ;

<sup>2</sup>School of Basic Sciences, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), 1015 Lausanne, Suisse.

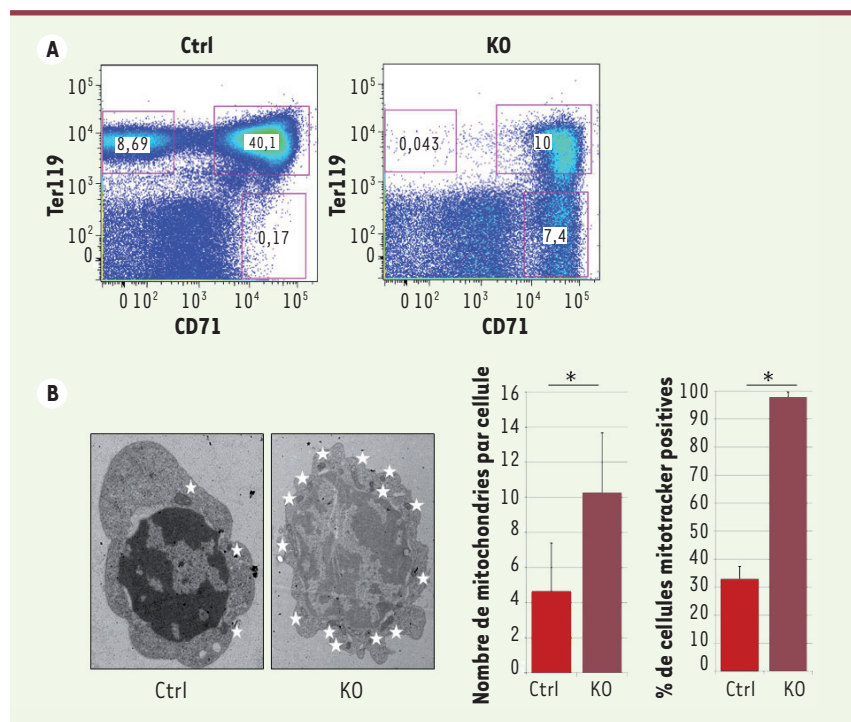
<sup>3</sup>Adresse actuelle : Campbell Family Institute for Cancer Research, Ontario Cancer Institute, Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network and Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

[didier.trono@epfl.ch](mailto:didier.trono@epfl.ch)

perturbations du génome induites par l'invasion des rétroéléments [5], mais des données récentes indiquent qu'il contrôle également de multiples aspects de la physiologie des mammifères [6, 7].

#### Défaut de mitophagie en l'absence de KAP1

Afin d'étudier le rôle potentiel de ce système dans l'hématopoïèse, nous avons construit une souris adulte dont le gène codant pour KAP1 est invalidé sélectivement (*knock-out*, KO) dans les lignées hématopoïétiques. Le phénotype de ces souris se caractérise par une série d'anomalies hématologiques dont la plus remarquable est une anémie due à un arrêt de différenciation des précurseurs des érythrocytes – les



**Figure 1. Phénotype des érythroblastes KAP1 KO : arrêt de maturation et accumulation des mitochondries.** **A.** Analyse par FACS (fluorescence-activated cell sorting) des cellules exprimant les marqueurs de surface CD71 et Ter119, issues de la moelle osseuse des souris contrôles (Ctrl) ou de souris dont le gène *KAP1* a été invalidé dans les lignées hématopoïétiques (KO). Le pourcentage de chaque population dans la moelle totale est indiqué sur le graphique. **B.** Microscopie électronique des cellules CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> contrôles et KAP1 KO. Panneau de gauche : les étoiles indiquent les mitochondries observées ; panneau du milieu : nombre moyen de mitochondries mesuré par cellule ( $n = 10$ , \* $p < 0,05$ ) ; panneau de droite : résultats obtenus avec la coloration MitoTracker ( $n = 4$ , \* $p < 0,05$ ).

érythroblastes - au stade où ils expriment fortement les marqueurs de surface CD71 (le récepteur de la transferrine) et Ter119 (marqueur associé à la glycophrine A chez la souris) (Figure 1A).

L'examen de ces érythroblastes dépourvus de KAP1 en microscopie électronique et par une technique de coloration spécifique (MitoTracker) a révélé qu'ils contenaient plus de mitochondries que les contrôles (Figure 1B). En corollaire de cette observation, l'analyse de l'expression des gènes a montré dans ces cellules une diminution des transcrits (comme ceux de BNIP3L, ULK1 [*unc-51 like autophagy activating kinase 1*], Gabarapl2 [*GABA(A) receptor-associated protein-like 2*], Sh3glb1 [*SH3-domain GRB2-like endophilin B1*], Atg12 [*autophagy related 12*], Becn1 [*beclin 1*] et

BCL2L1) impliqués dans la mitophagie, mécanisme d'élimination des mitochondries (Figure 2A). Cette dernière représente une étape importante dans le processus de différenciation des globules rouges.

### Comment l'absence de KAP1 entraîne-t-elle un défaut de mitophagie ?

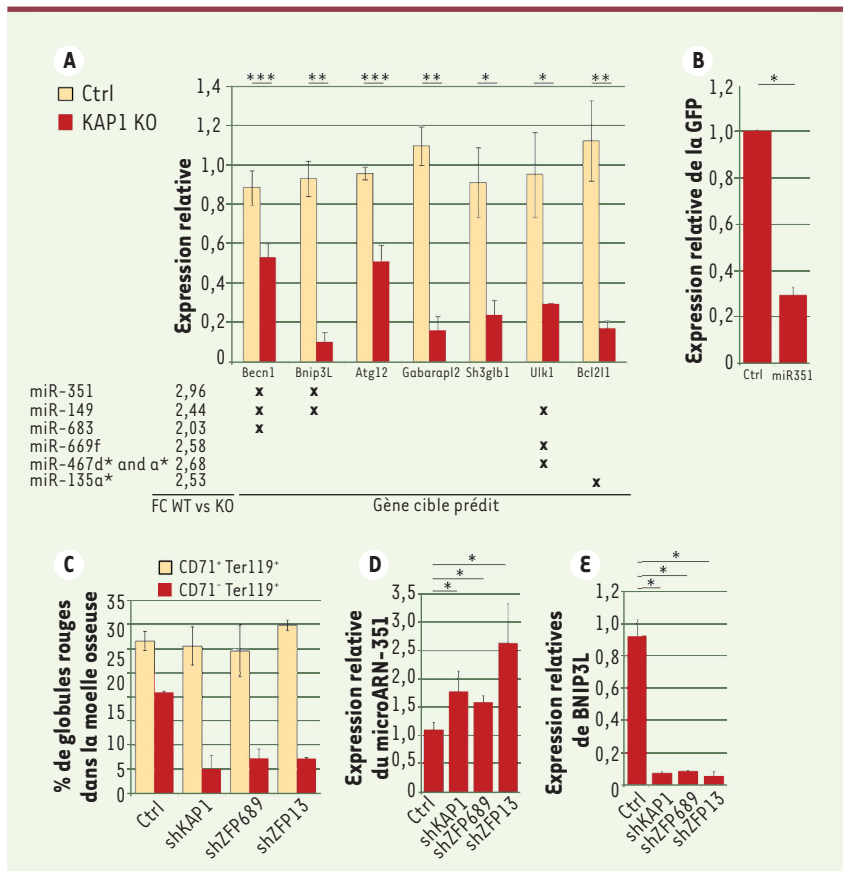
#### KAP1 régule négativement plusieurs microARN contrôlant un gène clé de la mitophagie dans les érythroblastes

Cependant, comme le système KRAB/KAP1 est surtout connu pour induire la répression de la transcription [8], il semblait peu probable que la diminution de l'expression de ces gènes de la mitophagie puisse être due à un effet direct du KO de KAP1. L'analyse des petits ARN

a révélé une augmentation de 11 des 455 microARN testés dans les érythroblastes KAP1-KO. Les microARN sont des régulateurs post-transcriptionnels capables d'atténuer l'expression d'un gène. Grâce à un système de prédiction informatique récemment développé au sein d'un laboratoire de l'EPFL [9], nous avons pu établir une relation entre l'augmentation de l'expression de certains microARN et la diminution de transcrits spécifiques de la mitophagie dans les érythroblastes KAP1 KO. En particulier, une des prédictions concernait le microARN-351, susceptible d'agir sur la région terminale non codante du gène BNIP3L (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like*), gène clé de la mitophagie dans les érythrocytes. Or, l'analyse de l'expression naturelle de ce microARN-351 a révélé qu'elle était diminuée spécifiquement dans les érythroblastes CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> tandis que l'expression de sa cible, BNIP3L, elle, augmentait au cours de la différenciation des globules rouges. La preuve de l'interaction directe entre miARN-351 et BNIP3L a été obtenue en surexprimant dans la lignée cellulaire MEL (une lignée établie de cellules murines issues d'une érythroleucémie) microARN351 et sa séquence cible insérée dans la région terminale non codante du gène codant pour la GFP (*green fluorescent protein*). La surexpression du microARN a induit dans les cellules MEL l'extinction spécifique de l'expression de la eGFP qui portait la cible prédite (Figure 2B).

#### KAP1 contrôle les miARN par l'intermédiaire de protéines KRAB

Deux autres microARN (503 et 322), proches du microARN-351 et formant avec ce dernier un petit cluster sur le chromosome X, étaient également exprimés plus fortement dans les érythroblastes KAP1 KO. Or, un site de liaison de KAP1 a été mis en évidence par immunoprécipitation de la chromatine couplée à un séquençage d'ADN à moins de 4kb de ce groupe de gènes codant pour les trois microARN, suggérant fortement une



**Figure 2. Une cascade impliquant des KRAB-ZFP spécifiques des érythroblastes, le microARN-351 et le gène BNIP3L contrôle la mitophagie dans les globules rouges.** **A.** Expression des gènes impliqués dans la mitophagie dans les érythroblastes contrôles (Ctrl) et KAP1 KO (n = 4, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001). En dessous du graphique est indiquée l'expression des microARN dans les mêmes échantillons, la croix (X) désignant leurs cibles potentielles prédites. **B.** Le microARN351 cible directement la région terminale non codante du gène BNIP3L. **C.** Analyse par FACS des globules rouges de la moelle osseuse de souris greffées avec des cellules souches hématopoïétiques modifiées génétiquement par un vecteur lentiviral permettant l'extinction de l'expression de ZFP689 ou 13. Le contrôle (Ctrl) correspond à l'utilisation d'un vecteur vide ou ne ciblant aucun gène. Pour chaque condition, l'expression du microARN351 (**D**) et du gène BNIP3L (**E**) dans les cellules CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> a été mesurée (n = 6, \*p < 0,05).

possible régulation de ce locus génomique par le système KRAB/KAP1. Comme KAP1 n'est pas une protéine de liaison directe à l'ADN, nous avons cherché à identifier les protéines KRAB-ZFP responsables de son recrutement dans cette région. Neuf protéines KRAB-ZFP ont été identifiées qui sont exprimées exclusivement dans les érythroblastes et ont un orthologue humain. Deux d'entre elles, ZFP689 et ZFP13, sont exprimées spécifiquement à deux étapes de différenciation successives de l'érythropoïèse (CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> et

CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>-</sup>, respectivement), et se sont révélées être – dans le système cellulaire des MEL – des régulateurs potentiels de l'expression du microARN351 et du gène BNIP3L. Nous avons ensuite validé la fonction de ces deux candidats *in vivo* dans un modèle animal permettant d'éteindre leur expression dans le système hématopoïétique : des cellules hématopoïétiques ont été modifiées génétiquement par un vecteur lentiviral permettant l'expression d'un petit ARN interférent (shARN) ciblant spécifiquement ZFP689 ou 13, puis

greffées à un animal receveur. L'analyse de la lignée érythroblastique appauvrie en ZFP689 ou 13 a révélé une diminution du nombre de cellules CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> de même ampleur que celle qu'entraîne la diminution de l'expression de KAP1 (Figure 2C). De plus, les analyses moléculaires ont confirmé l'expression accrue du microARN351 et celle diminuée de BNIP3L dans les cellules appauvries en ZFP689 ou 13, un profil identique à celui des cellules KAP1 KO (Figure 2D-E).

Finalement, dans une dernière série d'expériences, nous avons pu montrer que la neutralisation du système KAP1 avait un effet similaire sur des globules rouges humains, l'orthologue du microARN351 semblant être le microARN-125a-5p.

### Différenciation érythroblastique : une subtile combinaison de protéines et ARN

Ces résultats révèlent l'existence d'un système de régulation de la transcription où protéines et ARN se superposent en une combinatoire subtile pour que soit déclenchée au moment opportun une étape clé de l'érythropoïèse. Dans ce processus, plusieurs protéines KRAB-ZFP sont impliquées dans le contrôle de plusieurs microARN, eux-mêmes ayant pour cibles plusieurs transcrits de gènes associés avec la mitophagie ou d'autres événements intervenant lors de la maturation érythrocytaire. Cette apparente redondance – ou plutôt addition – d'effets parallèles ciblant le même processus physiologique a déjà été relevée dans le domaine de l'interférence ARN [10]. La découverte que ce dernier puisse lui-même être modulé par le système des KRAB-ZFP, qui agissent également de façon multifactorielle, ajoute un remarquable degré de modularité et de robustesse à ce type de régulation. ♦

### A KRAB/KAP1-miRNA cascade regulates erythropoiesis through stage-specific control of mitophagy

#### LIENS D'INTÉRÊT

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



## RÉFÉRENCES

- Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood* 2011 ; 118 : 6258-68.
- Xu J, Shao Z, Glass K, et al. Combinatorial assembly of developmental stage-specific enhancers controls gene expression programs during human erythropoiesis. *Dev Cell* 2012 ; 23 : 796-811.
- Nielsen AL, Ortiz JA, You J, et al. Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J* 1999 ; 18 : 6385-95.
- Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ 3rd. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 2002 ; 16 : 919-32.
- Rowe HM, Jakobsson J, Mesnard D, et al. KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells. *Nature* 2010 ; 463 : 237-40.
- Jakobsson J, Cordero MI, Bisaz R, et al. KAP1-mediated epigenetic repression in the forebrain modulates behavioral vulnerability to stress. *Neuron* 2008 ; 60 : 818-31.
- Santoni de Sio FR, Massacand J, Barde I, et al. KAP1 regulates gene networks controlling mouse B-lymphoid cell differentiation and function. *Blood* 2012 ; 119 : 4675-85.
- Schultz DC, Friedman JR, Rauscher FJ 3rd. Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev* 2001 ; 15 : 428-43.
- Marin RM, Vanicek J. Efficient use of accessibility in microRNA target prediction. *Nucleic Acids Res* 2011 ; 39 : 19-29.
- Ebert MS, Sharp PA. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell* 2012 ; 149 : 515-24.

## NOUVELLE

### Une relation « inflammée » entre le complexe GPS2 et le tissu adipeux dans l'obésité

Amine Toubal<sup>1</sup>, Eckardt Treuter<sup>2</sup>, Nicolas Venticlef<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de cardiométabolisme et nutrition (IHU-ICAN), Centre de recherche des Cordeliers, Inserm, U872, équipe 7 nutriomique, 15, rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France ;

<sup>2</sup>Karolinska Institutet, Center for Biosciences, Department of Biosciences and Nutrition, S-14183 Huddinge, Suède. [nicolas.venticlef@upmc.fr](mailto:nicolas.venticlef@upmc.fr)

#### L'obésité : une pathologie inflammatoire

L'obésité est considérée comme une maladie inflammatoire que caractérise une détérioration métabolique et inflammatoire du tissu adipeux [1]. Dans le cadre d'une réponse physiologique, l'inflammation est un mécanisme de défense qui protège l'organisme d'un traumatisme ou d'une infection. Cependant, le maintien de cette réponse inflammatoire est délétère pour l'organisme. L'obésité est associée à une inflammation dite de bas grade et chronique au niveau systémique et tissulaire. De nombreuses études mettent en évidence les effets néfastes de cette inflammation chronique qui est notamment associée au développement de pathologies métaboliques comme le diabète de type 2 et l'athérosclérose [2]. Le tissu adipeux n'est plus considéré comme un organe de stockage, mais comme une glande endocrine sécrétant un nombre important d'hormones appelées adipokines (adiponectine, leptine), mais

aussi des molécules inflammatoires (IL [interleukine]-6, IL-8, MCP-1 [*monocyte chemoattractant protein 1*]). L'inflammation du tissu adipeux chez le sujet obèse s'accompagne d'une modification morphologique des adipocytes (hypertrophie et hyperplasie adipocytaires) et d'une infiltration de cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes et mastocytes). Si de nombreuses études ont permis de caractériser les mécanismes cellulaires altérés dans l'obésité, les mécanismes de régulation de la transcription des gènes impliqués sont à ce jour mal compris.

#### Les corégulateurs : un rôle crucial dans le contrôle de la transcription des gènes inflammatoires

Il a été clairement établi que l'activation des voies relayées par les *toll-like receptor* (TLR) ou par le TNF (*tumor necrosis factor*) induit l'activation d'un large spectre de facteurs de transcription, tels que NFκB (p65) et AP-1, qui régulent l'expression des gènes inflammatoires

(IL-6, TNFα et IL1β) dans les cellules du tissu adipeux (adipocytes et macrophages notamment) [3]. Cependant, la régulation de la transcription des gènes inflammatoires (inductibles) fait intervenir différents processus biologiques tels que le remodelage de chromatine, la liaison de facteurs de transcription et des échanges de corégulateurs. Tout ce processus dynamique est régulé de manière coordonnée afin de permettre une régulation de la transcription adaptée à la situation [4]. Existe-t-il une dérégulation de cette coordination dans l'obésité ?

Les corégulateurs de la transcription sont indispensables à la répression ainsi qu'à l'activation de cette dernière. Ils représentent une superfamille de régulateurs de la transcription comprenant plus de 300 membres [5] au sein de laquelle on distingue deux groupes : les coactivateurs (activateurs de la transcription tels que CBP/P300 et SRC) et les corépresseurs (inhibiteurs de la transcription tels que NCOR [*nuclear receptor corepressor*], SMRT