

de *HoxB4* avec la différenciation lymphoïde, puisque sa surexpression dans d'autres circonstances entraîne une différenciation myéloïde privilégiée.

La morale de cette superbe histoire est que la difficulté survient là on ne l'attend pas nécessairement. Cela confirme, s'il en était besoin, que nous avons du pain sur la planche avant que ne paraisse dans *Cell* le premier article sur l'efficacité thérapeutique du transfert nucléaire chez l'homme. *médecine/sciences* 2020 ? ♦

Therapeutic cloning: illustration in *Rag*^{-/-} mutant mice

RÉFÉRENCES

1. Rideout WM, Hochedlinger K, Kyba M, Daley GQ, Jaenisch R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 2002 ; 109 : 17-27.
2. Notarangelo LD, Villa A, Schwartz K. RAG and RAG defects. *Curr Opin Immunol* 1999 ; 11 : 435-42.
3. Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, Yanagimachi R, Mombaerts P. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 14984-9.
4. Jouveau A, Renard JP. Cellules souches embryonnaires et clonage thérapeutique. *Med Sci* 2002 ; 18 : 169-80.
5. Wang ZQ, Kiefer F, Urbaneck P, Wagner EF. Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech Dev* 1997 ; 62 : 137-45.
6. Kyba M, Perlingeiro RCR, Daley GQ. *HoxB4* confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* 2002 ; 109 : 29-37.
7. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations *in vitro* and *in vivo*. *Genes Dev* 1995 ; 9 : 1753-65.
8. Schleinitz N, Lopez F, Vivier E, Vely F. Les cellules *natural killer* : tuer ou ne pas tuer ? *Med Sci* 2001 ; 17 : 504-9.
9. Mazurier F, Fontanellas A, Salette S, et al. A novel immunodeficient mouse model-RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants-requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. *J Interferon Cytokine Res* 1999 ; 19 : 533-41.

NOUVELLE

L'érythropoïétine : un facteur de croissance neuronale

Patrick Mayeux

Département d'Hématologie,
Institut Cochin,
27, rue du Faubourg Saint-Jacques,
75014 Paris, France.

> L'érythropoïétine (Epo) est bien connue comme facteur de croissance hématopoïétique contrôlant la production de globules rouges. L'inactivation des gènes codant pour l'Epo [1] ou son récepteur (EpoR) [1-3] est létale chez la souris. La mort des animaux survient entre 13 et 14 jours de gestation et est due à l'absence de globules rouges issus de l'érythropoïèse « définitive » dans le foie. Au tout début de la gestation, les érythrocytes, qui sont nucléés, sont produits dans une annexe extra-embryonnaire, le sac vitellin, et cette érythropoïèse, dite primitive, est partiellement indépendante de l'Epo. En revanche, à partir du 12^e jour de gestation chez la souris, le foie devient le principal site de

l'érythropoïèse. Cette érythropoïèse hépatique est très comparable à l'érythropoïèse médullaire définitive tant par le type de globules rouges produits - ceux-ci sont énucléés - que des mécanismes de contrôle de cette production. En particulier, comme c'est le cas pour l'érythropoïèse médullaire, l'érythropoïèse hépatique est strictement dépendante de l'Epo, hormone indispensable pour assurer la survie et la prolifération des progéniteurs érythroïdes. La mort précoce par anémie des souris dont les gènes codant pour l'Epo ou pour son récepteur avaient été invalidés n'avait pas permis, dans les expériences initiales, d'identifier d'autres actions importantes de l'Epo. Un défaut de développement car-

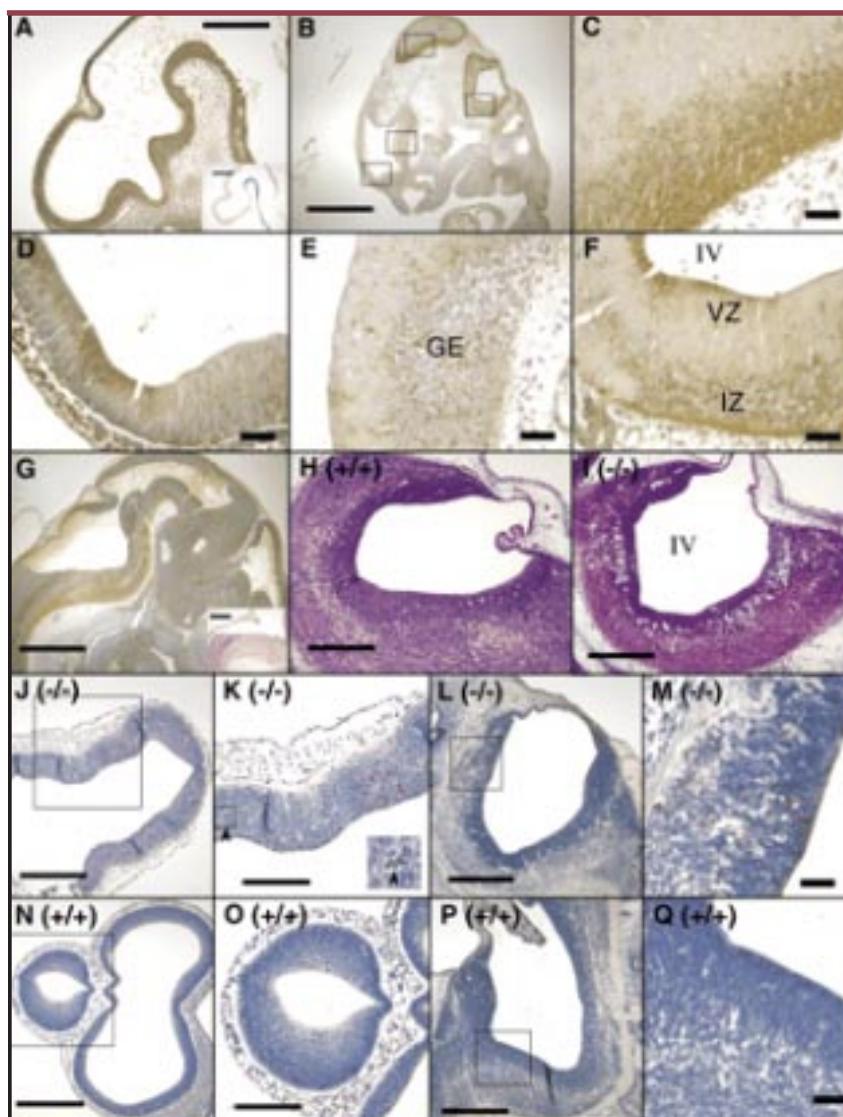
diacque avait été rapporté chez ces souris en 1999 [4] et, récemment, un article publié par le groupe de T. Noguchi montre que l'EpoR est aussi impliqué dans la formation du cortex cérébral [5]. Ces auteurs montrent d'abord par immunohistochimie une forte expression de l'EpoR, à partir de 10,5 jours de gestation, dans toutes les couches neuro-épithéliales (zones germinatives) du cerveau, dont le cortex. L'expression du récepteur diminue ensuite graduellement au cours des jours suivants selon un axe rostro-caudal, et se restreint d'abord à la zone intermédiaire sous-ventriculaire. Le cerveau des souris *EpoR*^{-/-} présente plusieurs défauts. Une hypoplasie tissulaire de la couche neuro-épithéliale dans la région adjacente au quatrième

ventricule est visible dès J11,5 et augmente ensuite (Figure 1). Par ailleurs, la méthode TUNEL révèle une apoptose importante dans différentes couches de cellules nerveuses y compris dans le cortex dès J10,5. À cet âge, les fœtus ne présentent pas encore de signe d'anémie due au blocage de l'érythropoïèse définitive ou aux malformations cardiaques, ce qui suggère très fortement que cette apoptose est bien une conséquence directe de l'absence d'expression de l'ÉpoR. De plus, les zones présentant une apoptose chez les souris $EpoR^{-/-}$ correspondent parfaitement aux zones qui expriment l'ÉpoR dans les souris sauvages (Figure 1).

Les auteurs dissèquent ensuite les zones corticales cérébrales de souris $EpoR^{+/+}$, $EpoR^{+/-}$ et $EpoR^{-/-}$ aux jours 9,5, 10 et 10,5 de gestation. À cette période, cette zone se présente sous la forme d'une seule couche de cellules germinales neuro-épithéliales exprimant la nestine. Si, au jour 9,5, il n'y a pas de différences entre les trois types de souris, au jour 10,5 le nombre de cellules exprimant la nestine obtenues à partir des embryons $EpoR^{-/-}$ est inférieur de 50 % à celui qui est obtenu à partir d'embryons sauvages $EpoR^{+/+}$, ou hétérozygotes $EpoR^{+/-}$, confirmant ainsi les observations histologiques (Figure 1). De plus, la capacité de ces cellules germinatives $EpoR^{-/-}$ à se

différencier *in vitro* en neurones est significativement diminuée. En présence de 20 % d'oxygène et de facteurs de croissance neuronaux, la survie des cellules est identique, qu'elles expriment ou non l'ÉpoR. En revanche, en conditions hypoxiques (2 % d'oxygène) et en l'absence de facteurs de croissance, l'apoptose est fortement retardée dans les neurones exprimant l'ÉpoR. Notons toutefois que les conditions de sevrage utilisées par ces auteurs sont particulièrement drastiques puisque le milieu de culture utilisé est exclusivement un milieu salin glucosé sans ajout des cofacteurs indispensables à un bon fonctionnement cellulaire comme des acides

Figure 1. Production du récepteur de l'érythropoïétine dans le cerveau. A-G. Localisation par immunohistochimie du récepteur de l'Épo dans le cerveau normal de souris à 10,5 (A), 11,5 (B-F), et 12,5 (G) jours de développement. L'encadré montre l'expression d'un transgène rapporteur $EpoR-LacZ$ qui permet l'expression de $LacZ$ dans les régions où le gène $EpoR$ s'exprime normalement à E10,5 (A) et E12,5 (G). Les illustrations C à F sont des agrandissements des encadrés de la figure B. J-Q. Analyse de l'apoptose tissulaire par la technique TUNEL chez les souris $EpoR^{-/-}$ (J-M, K, N, O) et $EpoR^{+/+}$ (L, M, P, Q). Les embryons analysés sont âgés de 10,5 jours de développement (J, K, N, O) et 12,5 (L, M, P, Q). Une apoptose accrue est détectable dès E10,5 dans la couche neuro-épithéliale (J, K) du cerveau antérieur, et caudal (L, M) à 12,5. K, M, O, Q sont des agrandissements des encadrés J, L, N, P respectivement. GE : ganglionic eminence ; IV : fourth ventricle ; VZ : ventricular zone ; IZ : intermediate zone ; barres : 1 mm (B, G) ; 0,4 mm (A, G, H-J, L, N, P) ; 0,2 mm (K, O) et 0,005 mm (C-F, M, O, Q). (Reproduit de *Development* [5], avec la permission de l'éditeur).



aminés ou des vitamines. Outre ces pré-curseurs corticaux issus d'embryons très précoces (J10,5), les auteurs utilisent des cellules d'embryons normaux de rats plus âgés (J18) et la lignée neuronale humaine NT2 pour tenter de comprendre les mécanismes de cette protection par l'Épo. Leurs résultats sont assez préliminaires et leurs conclusions reposent plus sur des corrélations que sur des relations causales clairement établies. L'hypoxie entraîne à la fois une production d'Épo et d'ÉpoR dans ces différentes cellules. Le facteur de transcription GATA3 pourrait participer à l'activation transcriptionnelle du gène codant pour l'ÉpoR. Cependant, l'activation de l'ÉpoR semble également contrôler l'expression du gène *GATA3*. En effet, l'accumulation des ARN messagers *GATA3* est fortement diminuée dans les neurones de fœtus *EpoR^{-/-}* et est augmentée par l'Épo dans les neurones de fœtus *EpoR^{+/+}*. Ces données suggèrent l'existence d'une boucle d'amplification entre *GATA3* et l'ÉpoR. L'effet anti-apoptotique pourrait être dû à une accumulation, via *STAT5*, de la protéine Bcl-X_L de la famille Bcl-2, et associée, dans les précurseurs érythroïdes, à la protection anti-apoptotique conférée par l'Épo. Il est à noter que le même mécanisme contribue au contrôle de la survie des progéniteurs érythroïdes.

Un autre article récemment publié par le groupe de S. Weiss suggère que le rôle de l'Épo sur les neurones pourrait être plus complexe [6]. Ces auteurs montrent, également par immunohistochimie, la présence d'ÉpoR dans les couches germinales du cerveau du fœtus de souris à J14. Ils réalisent ensuite des cultures de cellules souches neuronales (CSN) soit à partir de cerveaux de fœtus, soit à partir de cellules isolées de la zone sous-ventriculaire de cerveaux de souris adultes. Il existe en effet dans cette zone, chez l'adulte, une source de cellules souches neuronales assurant le renouvellement permanent des neurones du bulbe olfactif (→).

(→) m/s
2002, n°4,
p. 401

In vitro, ces cellules prolifèrent en culture en présence d'EGF (*epidermal growth factor*) sous forme de neurosphères, et peuvent engendrer des cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes), des neurones, et des cellules à nouveau capables d'engendrer des neurosphères secondaires, témoignant d'un autorenewement. Si on soumet ces cultures à un stimulus hypoxique, il se produit une augmentation de la formation des neurones aux dépens de l'autorenewement des CSN. Ces effets sont reproduits par de l'Épo exogène et bloqués par des anticorps anti-Épo, ou par des inhibiteurs de NF-κB. Un traitement de 24 h par l'Épo se traduit par une augmentation de 2 fois des neurones et une diminution des CSN secondaires après 14 jours de culture. L'Épo semble donc induire la différenciation des CSN vers la voie neuronale. Les auteurs ne notent aucune modification de l'apoptose dans les cellules exposées ou non à l'Épo. Cependant, contrairement à celles qui étaient utilisées dans le travail précédent, les conditions de culture utilisées ici ne sont pas susceptibles d'induire une forte apoptose. *In vivo*, l'effet de l'Épo injectée directement dans les ventricules latéraux est le même qu'*in vitro* : diminution, dans la zone sous-ventriculaire, du nombre de CSN et augmentation de précurseurs neuronaux destinés au bulbe olfactif avec une augmentation de la prolifération cellulaire. Selon ces auteurs, l'Épo pourrait contrôler, via NF-κB, l'expression du facteur de transcription Mash-1, et induire ainsi l'engagement des CSN dans la différenciation neuronale sans modifier la survie des cellules. Un article récent de Digicaylioglu et Lipton avait déjà montré que NF-κB intervenait dans le rôle anti-apoptotique de l'Épo dans le système neuronal [7]. L'expression de l'Épo et

de son récepteur (ÉpoR) dans les cellules nerveuses est connue depuis une dizaine d'années [8, 9]. L'action anti-apoptotique de l'Épo sur ces cellules est maintenant bien établie. Un article récent montre par ailleurs que l'Épo peut aussi protéger de l'apoptose les motoneurones de la moelle épinière [10]. Outre son indication maintenant clairement établie pour le traitement de certaines anémies, l'utilisation d'Épo recombinante pourrait aussi être envisagée pour le traitement de certaines pathologies du système nerveux comme le suggèrent Celik *et al.* [10]. De plus, ces articles indiquent que l'Épo a aussi un rôle physiologique dans le système nerveux en dehors de situations d'agression, et qu'elle est nécessaire à son développement correct. Il est regrettable que la mort prématurée des fœtus *EpoR^{-/-}* ne permette pas d'évaluer les conséquences réelles des défauts constatés sur les cerveaux de ces animaux. L'inactivation de l'ÉpoR ciblée dans les cellules nerveuses en utilisant le système *Crelox* pourrait évidemment permettre de répondre à cette question. Cependant, il existe peut-être aussi un moyen plus facile d'approcher le problème. Le groupe de J. Ihle a récemment produit des souris exprimant un ÉpoR

RÉFÉRENCES

1. Wu H, Liu X, Jaenish R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995 ; 83 : 59-67.
2. Kieran MW, Perkins AC, Orkin SH, Zon LI. Thrombopoietin rescues *in vitro* erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 9126-31.
3. Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* 1996 ; 10 : 154-64.
4. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 1999 ; 126 : 3597-605.
5. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, *et al.* Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 2002 ; 129 : 505-16.



muté et fortement tronqué à la place du récepteur normal. Dans des conditions physiologiques normales, ce récepteur permet de maintenir une érythropoïèse efficace et les souris sont viables [11]. Néanmoins, ce récepteur présente de sérieux défauts de signalisation intracellulaire et, en particulier, l'activation de STAT5 est extrêmement faible. Il serait intéressant d'étudier le système nerveux de ces souris au cours de leur vie fœtale et adulte. ♦

Erythropoïétin : a growth factor for brain-derived cells

6. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the *in vitro* and *in vivo* production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 2001 ; 21 : 9733-43.
7. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 2001 ; 412 : 641-7.
8. Masuda S, Nagao M, Takahata K, et al.

Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 11208-16.

9. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 19488-93.
10. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, et al.

Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 2258-63.

11. Zang H, Sato K, Nakajima H, McKay C, Ney PA, Ihle JN. The distal region and receptor tyrosines of the Epo receptor are non-essential for *in vivo* erythropoiesis. *EMBO J* 2001 ; 20 : 3156-66.

NOUVELLE

Les inhibiteurs de la protéase virale du VIH affectent le facteur de transcription SREBP-1

Martine Caron, Jean-Philippe Bastard, Corinne Vigouroux, Véronique Jan, Mustapha Maachi, Martine Auclair, Jacqueline Capeau

➤ Les traitements anti-rétroviraux se compliquent fréquemment d'effets secondaires de type lipodystrophie, ou altération de la répartition du tissu adipeux, et/ou troubles métaboliques [1]. Le tissu adipeux est la cible de ces traitements qui modifient sa répartition et est en partie responsable des altérations métaboliques présentes, insulino-résistance, dyslipidémie et plus rarement troubles de la tolérance au glucose, voire diabète.

Les lipodystrophies ont une origine multifactorielle et impliquent des facteurs liés à l'infection, au patient (âge, sexe, facteurs nutritionnels, sédentarité) et au traitement. Les deux classes de molécules antirétrovirales les plus utilisées ont été incriminées : analogues nucléo-

sidiés (NRTI) et inhibiteurs de la protéase virale (IP) avec un poids important de la durée de traitement et des molécules individuelles [2].

Pour essayer d'analyser le rôle des différentes molécules, plusieurs équipes ont privilégié l'étude de lignées de cellules adipocytaires capables de se différencier *in vitro*, le plus souvent 3T3-L1 ou 3T3-F442A. Les études à court terme ont montré que les adipocytes différenciés sont sensibles aux IP et en particulier à l'indinavir, qui induit une résistance transitoire en inhibant directement le transporteur de glucose GLUT4, spécifique de l'adipocyte et du muscle [3]. Les études à long terme ont montré, pour la plupart, que les IP empêchent le pro-

cessus de différenciation adipocytaire [4]. Nous avons ainsi mis en évidence, dans les cellules 3T3-F442A, un blocage par les IP, au niveau de la membrane nucléaire, du facteur de transcription SREBP-1 (*sterol regulatory binding protein*) qui participe à la différenciation adipocytaire, ce qui aboutit à un défaut de différenciation, à une résistance à l'insuline

[5], puis à une mort cellulaire par apoptose [6]. Les différents IP testés affectent de façon variable ces fonctions : l'indinavir a plus d'effet que le nelfinavir, alors que l'amprénavir est, dans ces conditions, quasiment dénué d'effets. En outre, dans certains adipocytes traités par IP, l'enveloppe nucléaire présente une altération de la structure du réseau filamentaire tapissant la membrane nucléaire, la « lamina », formée des deux types de lamines présentes dans les cellules différenciées, la lamine A/C et les lamines B [6]. Il est intéressant de noter que des altérations semblables de la « lamina » sont observées dans les

Hôpital Tenon et Hôpital Rothschild, Inserm U.402, Faculté de médecine Saint-Antoine, 27, rue Chaligny, 75571 Paris Cedex 12, France. capeau@st-antoine.inserm.fr