



GCN2 (souris *GCN2^{-/-}*). Conformément aux données de la littérature décrites chez le rat, nous avons montré que la prise alimentaire de souris sauvages était fortement diminuée en réponse à une carence nutritionnelle en un acide aminé indispensable, la leucine [3]. En revanche, les souris *GCN2^{-/-}* consomment indifféremment les régimes complet ou carencé (Figure 1A), bien que la leucémie soit fortement diminuée, quel que soit le génotype, par la consommation du régime carencé en leucine (Figure 1B). De plus, des souris présentant une invalidation du gène codant GCN2 uniquement dans le cerveau se comportent comme les souris *GCN2^{-/-}* (Figure 1C). Afin de localiser le site d'activation de la kinase GCN2 dans le cerveau, nous avons analysé le niveau de phosphorylation de son substrat (eIF2 α) par immuno-histochimie. Vingt minutes de consommation d'un régime carencé en leucine entraînent une forte induction de la phosphorylation de eIF2 α dans les neurones de l'APC des souris sauvages, alors qu'aucun marquage n'est obtenu avec les souris *GCN2^{-/-}* (Figure 1D).

Nos résultats montrent que l'activité de GCN2 dans le cerveau est indispensable au développement de l'aversion alimentaire résultant du déficit en acides aminés. En couplant la carence en acide aminé à la phosphorylation de eIF2 α dans les neurones de l'APC, GCN2 doit agir *via* ses effets sur la traduction des protéines et/ou la transcription de gènes cibles (Figure 2). Les mécanismes mis en route en aval de l'activation de cette kinase restent à déterminer. Cependant, il est probable que d'autres régions du cerveau soient secondairement impliquées pour aboutir à la réponse comportementale.

La voie GCN2/eIF2 α a été conservée chez tous les eucaryotes, de la levure aux mammifères. Chez la levure, cette voie de signalisation régule la biosynthèse des acides aminés en fonction de leur disponibilité. Ces travaux montrent que, chez les omnivores, elle est utilisée pour limiter la consommation d'une nourriture carencée en acides aminés, favorisant par défaut une alimentation équilibrée. ♦

GCN2 regulates feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores

RÉFÉRENCES

1. Leung PM, Rogers QR. Importance of prepyriform cortex in food-intake response of rats to amino acids. *Am J Physiol* 1971 ; 221 : 929-35.
2. Gietzen, DW. Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J Nutr* 1993 ; 123 : 610-25.
3. Maurin AC, Jousse C, Averous J, et al. The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab* 2005 ; 1 : 273-7.
4. Hao S, Sharp JW, Ross-Inta CM, et al. Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. *Science* 2005 ; 307 : 1776-8.
5. Averous J, Bruhat A, Jousse C, et al. Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 5288-97.
6. Bruhat A, Jousse C, Carraro V, et al. Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol Cell Biol* 2000 ; 20 : 7192-204.
7. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 2000 ; 6 : 1099-108.
8. Dong J, Qiu H, Garcia-Barrio M, et al. Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell* 2000 ; 6 : 269-79.
9. Lu PD, Harding HP, Ron D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* 2004 ; 167 : 27-33.
10. Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 11269-74.

NOUVELLE

Origine du muscle squelettique : rôles de Pax3/Pax7

Mounia Lagha, Didier Rocancourt, Frédéric Relaix

► L'ensemble de la musculature du corps et des membres dérive des somites, structures embryonnaires segmentées émanant du mésoderme présomitique [1]. Chaque somite se compose d'un sclérotome ventral, à l'origine du squelette axial, et d'un dermomyotome épithélial dorsal à l'origine du derme (peau) et des muscles. Les premières cellules

myogéniques (caractérisées par l'expression des facteurs de détermination myogéniques *Myf5*, *MyoD* et/ou *Mrf4*) apparaissent aux bordures de ce dermomyotome. Elles migrent ensuite entre le dermomyotome et le sclérotome pour former le myotome primaire, premier muscle squelettique du corps [2, 3],

essentiellement formé de cellules post-mitotiques : myoblastes en cours de différenciation et fibres musculaires différenciées.

La formation des muscles au cours du développement des vertébrés est un processus progressif avec la mise en place de plusieurs vagues successives de cellules musculaires (dites embryonnaires, fœtales et adultes) dont l'origine cellulaire était restée obscure. Nous avons maintenant identifié une population de

Département de Biologie du développement, Génétique moléculaire du développement, CNRS URA 2578, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. freilax@pasteur.fr

cellules progénitrices à l'origine de ces différents lignages [4], ce qui nous permet de proposer un modèle unifié du développement musculaire (Figure 1).

Nous avons tout d'abord observé l'existence d'une population de cellules au sein du myotome des embryons de souris n'exprimant ni les facteurs myogéniques, ni les marqueurs de différenciation. En revanche ces cellules expriment Pax3 (Figures 2B et 2C), et son paralogue Pax7, deux facteurs de transcription à homéodomaine, importants au cours de l'organogenèse chez la souris et impliqués chez l'homme dans des cancers (rhabdomyosarcomes) et dans une maladie génétique rare (syndrome de Waardenburg) [5]. Cette nouvelle population de cellules est présente tout au long du développement embryonnaire et fœtal dans un état prolifératif (contrairement aux myoblastes) au sein même des masses musculaires du tronc et des membres.

Grâce aux stabilités différentielles de gènes rapporteurs insérés aux locus Pax3 (Pax3GFP/+) et Pax7 (Pax7LacZ/+), nous avons pu étudier la contribution de cette population de progéniteurs à la croissance musculaire. En effet, la protéine GFP (green fluorescent protein) étant très stable, il est possible de suivre le devenir des cellules qui ont exprimé Pax3 à un moment donné (Pax3+, GFP+), et ce même dans les cellules où Pax3 est éteint (Pax3-, GFP+). En revanche, la stabilité du rapporteur β-Gal (Pax7LacZ/+) est similaire à celle de la protéine endogène Pax7, reflétant l'expression endogène de ce gène (Figure 2A). La comparaison de l'expression de ces deux rapporteurs (GFP et β-gal) dans des embryons Pax3GFP/+ : Pax7LacZ/+ nous a permis de montrer que ces cellules contribuent à la croissance musculaire (les fibres sont GFP+ mais β-gal-), tout en restant en prolifération dans les masses musculaires. Elles ont donc des caractéristiques de cellules souches. Ainsi, cette population de cellules Pax3+/Pax7+ constitue un nouveau compartiment de cellules progénitrices/souches musculaires résidentes capables de contribuer à la croissance musculaire tout au long du

développement (Figures 2D et 2E).

Chez l'adulte, on rencontre des cellules mononucléées, appelées cellules satellites, en périphérie de chaque fibre musculaire multinucléée. Ces cellules souches musculaires fournissent l'essentiel du réservoir de croissance et de régénération chez l'adulte et sont capables de prolifération et de différenciation après activation. La localisation le long des fibres, le fort potentiel myogénique ainsi que l'expression des facteurs de transcription Pax3 et/ou Pax7 suggèrent que les progéniteurs musculaires résidents identifiés chez le fœtus sont à l'origine des cellules satellites de l'adulte : nous avons montré que ces cellules adoptent progressivement une position de cellule satellite, c'est-à-dire le long des fibres différenciées sous la lame basale, chez le fœtus juste avant la naissance [4]. Des études complémentaires de lignage réalisées chez le poulet ont confirmé ce résultat [6].

Les mutants de souris pour le gène Pax7 n'ont pas de phénotype musculaire pendant

l'embryogenèse et meurent dans les premières semaines après la naissance [7]. Les embryons portant l'allèle perte de fonction pour Pax3 présentent des défauts majeurs de développement du système nerveux central et périphérique ainsi qu'un phénotype musculaire important. En effet, la musculature des membres est absente et les somites sont réduits. Ces phénotypes sont, entre autres, causés par une perte cellulaire consécutive à l'apoptose en l'absence de Pax3 [8]. Cependant, chez le mutant Pax3, une partie de la musculature du tronc se forme, et ce malgré les défauts d'organisation des somites [9]. Cela est vraisemblablement dû à une redondance fonctionnelle avec son paralogue Pax7, puisque le remplacement du gène Pax3 par Pax7 chez la souris est capable d'assurer la plupart des fonctions de Pax3 dans le tronc [10].

Les cellules progénitrices musculaires nouvellement identifiées co-expriment Pax3 et Pax7, deux gènes fonctionnellement redondants. Afin de comprendre les rôles de Pax3 et de Pax7 au sein de cette

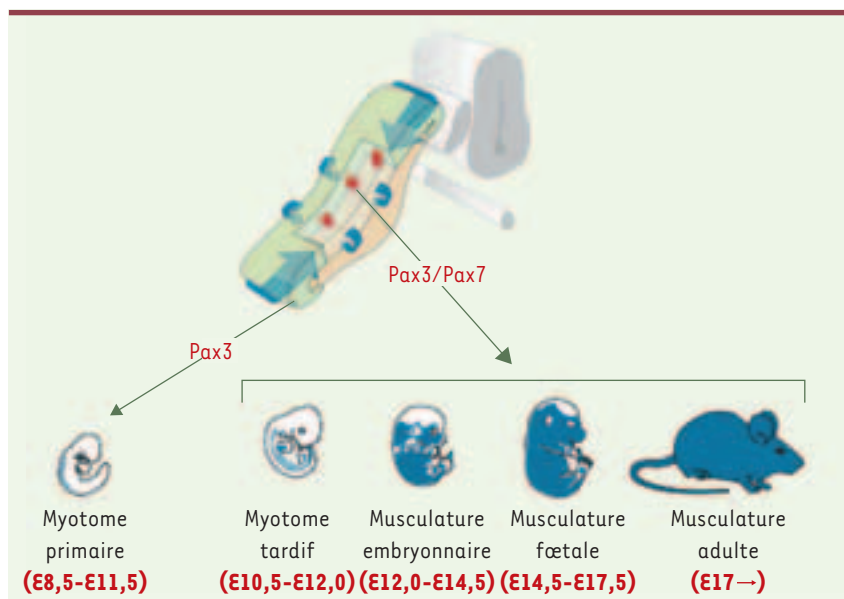


Figure 1. Les muscles squelettiques du corps se forment progressivement à partir de plusieurs vagues de myogenèse ayant une origine somitique. La première vague de myogenèse (E8.5-E11.5) s'effectue au niveau des lèvres du dermomyotome (flèches bleues) et contribue au myotome primaire. Ces cellules expriment Pax3. Toutes les autres vagues de myogenèses (embryonnaire, fœtale et adulte) sont alimentées à partir d'un pool de cellules progénitrices résidentes exprimant Pax3/Pax7 et migrant à partir de la région centrale du dermomyotome (en vert) dans le myotome (couleur saumon) (flèches roses). La position du somite est indiquée par rapport aux structures neurales axiales.



population, nous avons donc analysé le phénotype des embryons double mutants *Pax3GFP/GFP : Pax7LacZ/LacZ*.

Le phénotype musculaire est bien plus grave que celui des embryons simple mutants : alors que l'apoptose des mutants *Pax3^{-/-}* n'est plus détectable

au stade E11.5, les double mutants pour *Pax3* et *Pax7* continuent à subir une importante mort cellulaire. Parmi les cellules GFP+ qui restent chez ces double mutants, aucune cellule s'engageant vers la myogenèse n'est observable après E10.5. Autrement dit, le peu de fibres

différenciées présentes chez les double mutants sont des fibres formées à partir du myotome primaire précoce indépendamment de *Pax3* et *Pax7*.

Par ailleurs, en l'absence de *Pax3* et de *Pax7*, les cellules progénitrices musculaires ne sont pas spécifiées vers un destin musculaire squelettique. En revanche, ces cellules adoptent d'autres destins chez les doubles mutants. Ainsi, nous avons pu observer la présence de cellules GFP+ au sein de masses osseuses co-exprimant des marqueurs du cartilage (*collagen 2a*).

Cette étude a permis l'identification d'un *pool* de cellules progénitrices musculaires résidentes exprimant les facteurs *Pax3/Pax7* tout au long du développement embryonnaire et à l'origine des cellules satellites adultes. Cette population de cellules souches musculaires embryonnaires est potentiellement exploitable dans le cadre de thérapies cellulaires pour les maladies musculaires [4].

Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells

RÉFÉRENCES

1. Pourquie O. Vertebrate somitogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001 ; 17 : 311-50.
2. Tajbakhsh S, Buckingham M. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr Top Dev Biol* 2000 ; 48 : 225-68.
3. Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002 ; 18 : 747-83.
4. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham MA. Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 2005 ; 435 : 948-53.
5. Chi N, Epstein JA. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* 2002 ; 18 : 41-7.
6. Gros J, Manceau M, Thome V, Marcelle C. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* 2005 ; 435 : 954-8.
7. Mansouri A, Stoykova A, Torres M, Gruss P. Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in *Pax7^{-/-}* mutant mice. *Development* 1996 ; 122 : 831-8.
8. Borycki AG, Li J, Jin F, et al. Pax3 functions in cell survival and in *pax7* regulation. *Development* 1999 ; 126 : 1665-74.
9. Tremblay P, Dietrich S, Mericskay M, et al. A crucial role for Pax3 in the development of the hypaxial musculature and the long-range migration of muscle precursors. *Dev Biol* 1998 ; 203 : 49-61.
10. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev* 2004 ; 18 : 1088-105.

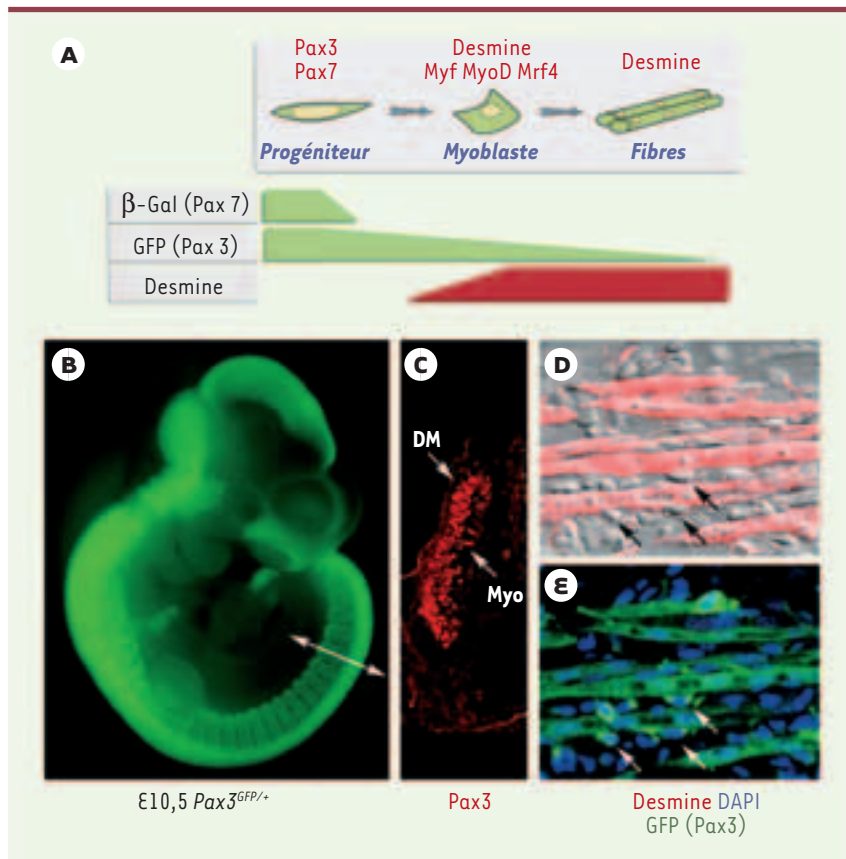


Figure 2. Les cellules progénitrices Pax3/Pax7 contribuent à la fois à la croissance musculaire et au maintien d'un réservoir de cellules progénitrices/souches en prolifération. **A.** Représentation schématique de la voie de différenciation myogénique, et des marqueurs associés aux différents stades (*Pax3/Pax7* dans les progéniteurs musculaires résidents ; *Myf5/MyoD/Mrf4* dans les myoblastes engagés ; *desmine* dans les myoblastes et les fibres différenciées). Cette expression est ici comparée à l'expression des gènes rapporteurs *GFP* et *LacZ* engendrés respectivement à partir des lignées *Pax3GFP/+* et *Pax7LacZ/+*. **B.** Vue latérale d'un embryon *Pax3GFP/+* au stade E10.5 de développement embryonnaire. La coupe indiquée passe à travers un somite. L'expression de la GFP est également détectée au niveau du tube neural dorsal, du procès fronto-nasal, de la crête neurale et de leurs dérivés. **C.** Analyse en immunofluorescence d'une coupe transversale au niveau d'un somite en région thoracique d'un embryon de stade E10.5, comme indiqué en **B**, à l'aide d'un anticorps anti-*Pax3* (en rouge) indiquant une expression dans le dermomyotome épithélial (DM) et dans le myotome (Myo). **D-E.** Co-marquage en immunofluorescence d'une coupe transversale d'un muscle abdominal d'un fœtus *Pax3GFP/+* de stade E15.5 en utilisant la GFP endogène (en vert), un anticorps anti-*desmine* (en rouge), et le DAPI qui marque l'ADN. Les cellules progénitrices non différenciées (GFP+, *Desmine*-) associées aux fibres sont indiquées par des flèches. La GFP, qui est très stable, est également détectable dans les fibres différenciées, démontrant que les progéniteurs *Pax3/Pax7* participent à la croissance musculaire.