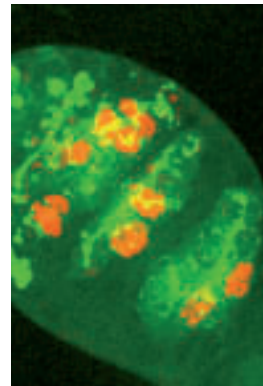


> L'intérêt médical des cellules souches provient de leur capacité à se diviser de manière asymétrique donnant naissance à une nouvelle cellule souche, et à une cellule capable de se différencier. Cette division est contrôlée à la fois par une identité spécifique des cellules souches et un microenvironnement complexe, appelé une niche, qui reste souvent inaccessible chez les mammifères. Au contraire, les outils génétiques disponibles chez la drosophile ont permis récemment d'identifier *in vivo* non seulement les cellules constituant la niche des cellules souches de la lignée germinale, mais également les signaux émis par celles-ci ainsi que les gènes cibles dans les cellules souches elles-mêmes. La conservation de ces mécanismes chez les mammifères, pour les cellules souches hématopoïétiques ou épithéliales, laisse envisager des applications thérapeutiques potentielles. <

Régulation des cellules souches de la lignée germinale

La niche s'agrandit chez la drosophile

Marlène Jagut, Jean-René Huynh



Institut Jacques-Monod, CNRS,
 Universités Paris 6 et 7,
 2, place Jussieu,
 F-75251 Paris Cedex 05, France.
huynh@ijm.jussieu.fr

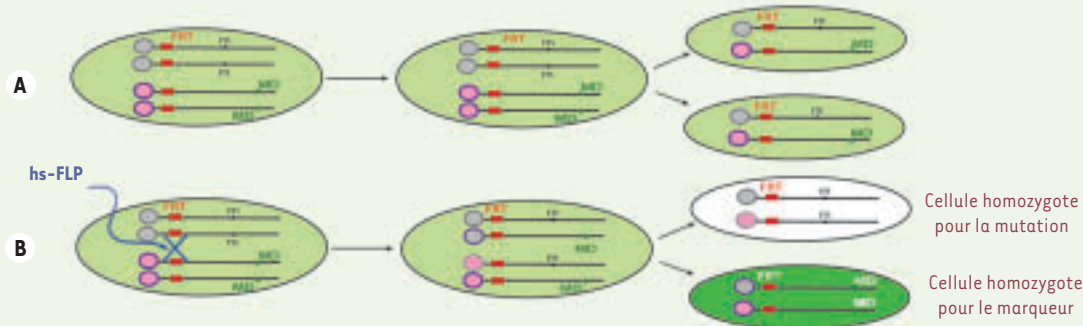
Les cellules souches fascinent les chercheurs par leur double capacité à produire des cellules spécialisées qui forment les différents organes, tout en s'autorenouvelant afin de maintenir un groupe de cellules souches [1]. Dans l'embryon précoce, les cellules souches sont dites pluripotentes, car chacune est capable de produire des cellules appartenant aux trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme). Au cours du développement, leurs potentialités et leur nombre se restreignent progressivement, de sorte que chez l'adulte, elles sont peu nombreuses, dispersées dans l'organisme et ne peuvent produire que quelques types de cellules au sein d'un tissu spécifique. Cependant, tout comme les cellules souches embryonnaires, les cellules souches adultes ont la capacité de s'autorenouveler. Elles jouent alors un rôle clé dans l'homéostasie tissulaire en remplaçant des cellules perdues par mort naturelle (apoptose) ou lésion au long de la vie de l'individu. La maîtrise du comportement de ces cellules souches offrirait ainsi la possibilité d'une source infinie de cellules capables de régénérer des tissus malformés, endommagés ou tout

simplement âgés [2]. L'étude des cellules souches adultes est donc d'un intérêt médical majeur. Dans ce but, les chercheurs tentent de répondre principalement à deux types de questions : (1) comment identifier les cellules souches adultes ? Quelles sont les caractéristiques moléculaires, cellulaires et génétiques qui confèrent aux cellules souches leurs extraordinaires propriétés ? et (2) comment sont-elles régulées ? Quels sont les mécanismes qui gouvernent l'équilibre entre renouvellement et différenciation ?

Chez les mammifères, les cellules souches adultes sont rares, difficilement identifiables et généralement cachées dans un environnement cellulaire complexe, ce qui rend leur étude *in vivo* très difficile voire impossible [1]. Au contraire, chez la drosophile, les cellules souches de la lignée germinale (CSG), mâle ou femelle, sont bien caractérisées, leur environnement cellulaire est simple, et elles sont facilement observables et manipulables. Les outils génétiques puissants disponibles chez la drosophile, par exemple le système FLP/FRT (*Encadré*) [3], permettent de modifier génétiquement les CSG et les cellules somatiques environnantes. Il est également possible, à l'aide de lignées transgéniques exprimant des marqueurs cellulaires fluorescents, de filmer *in vivo* le comportement des CSG, ainsi que d'en isoler un nombre suffisant pour réaliser un profil de leur transcriptome à l'aide de

Le système FLP/FRT

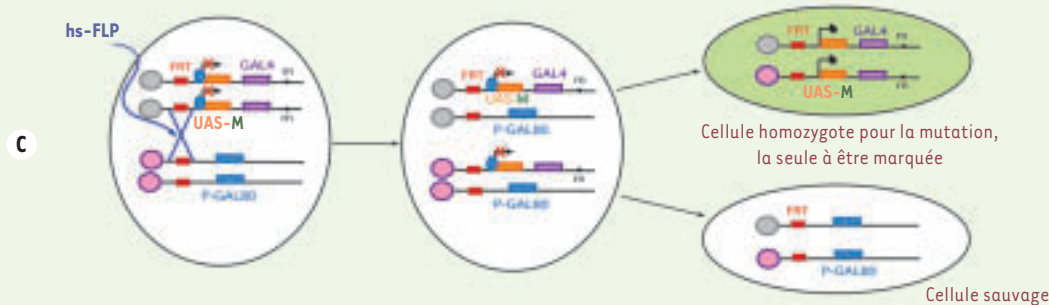
En 1993, Golic et Lindquist [3] ont pu montrer que le système de recombinaison site-spécifique de levure fonctionnait chez la drosophile. Ce système est composé d'une recombinase, la flipase (FLP), et de sa séquence cible appelée FRT. Des séquences FRT de levure ont donc été introduites à proximité des centromères sur chacun des bras de l'ensemble des chromosomes de la drosophile. En plus de ces séquences FRT, un marqueur dominant a été ajouté à chaque construction permettant ainsi de suivre les événements de recombinaison. L'expression de la flipase est induite par choc thermique. Cette enzyme permet la recombinaison entre deux chromosomes homologues spécifiquement au niveau de séquences FRT.



A : En l'absence d'induction de la FLP, il n'y a pas recombinaison entre les chromosomes homologues. Les cellules filles sont donc identiques à la cellule mère. Elles possèdent un bras de chacun des deux chromosomes homologues : l'un porteur de la mutation d'intérêt et l'autre porteur d'un marqueur dominant (MD) comme, par exemple, la GFP (*green fluorescent protein*) qui est maintenant couramment utilisée.

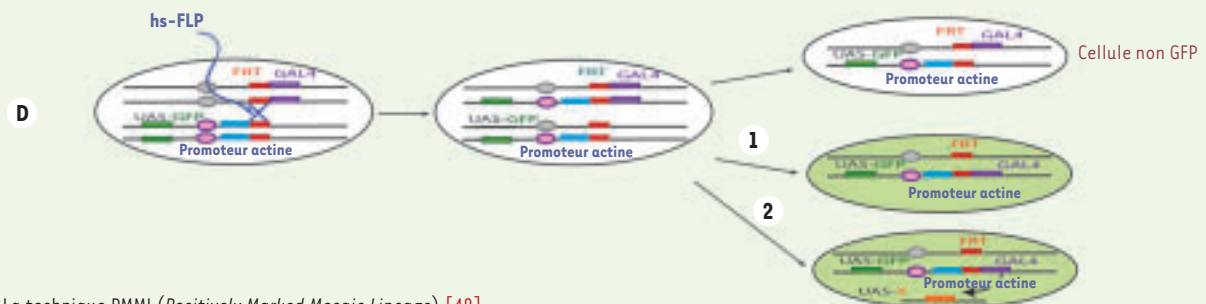
B : Dans le cas d'une induction de la FLP par choc thermique, il y a recombinaison entre les chromosomes homologues au niveau des séquences FRT avant la mitose. Après la division mitotique, la cellule mère a 50 % de chances de donner une cellule fille homozygote pour la mutation d'intérêt et une cellule fille homozygote pour le marqueur. Cette technique permet donc d'étudier *in vivo* un clone de cellules homozygotes pour une mutation (repéré par l'absence du marqueur) au sein d'un environnement hétérozygote pour cette même mutation et donc sauvage.

Il existe différentes variantes à cette technique, en particulier pour marquer positivement les clones :



C : La technique MARCM (*Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker*) [48].

Dans la cellule mère hétérozygote, un des chromosomes homologues porte le gène *gal 4*, le gène codant pour un marqueur sous le contrôle d'un promoteur UAS ainsi que la mutation d'intérêt et l'autre porte le gène *gal 80* sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire. Pour exprimer le marqueur, la protéine Gal 4 doit se fixer au promoteur UAS. Cependant, la protéine Gal80, présente, se fixe également à ce promoteur empêchant la fixation de Gal4 et donc l'expression du marqueur. Lors de l'induction de la FLP, il y a recombinaison avant la mitose entre les chromosomes homologues au niveau des séquences FRT. Après la division mitotique, la cellule mère a 50 % de chances de donner une fille homozygote pour le gène *gal 80* et une autre homozygote pour le gène *gal 4*, le marqueur sous le contrôle du promoteur UAS et la mutation. Dans cette dernière cellule, l'absence de la protéine Gal80 permet la fixation de la protéine Gal4 sur le promoteur UAS et donc l'expression du marqueur : cette cellule, par ailleurs homozygote pour la mutation d'intérêt est bien la seule marquée.



D : La technique PMMI (*Positively Marked Mosaic Lineage*) [49].

Dans la cellule mère hétérozygote, un chromosome homologue porte le gène *gal 4* en aval des séquences FRT et un marqueur (ici la GFP) sous contrôle du promoteur UAS et un chromosome homologue porte un promoteur ubiquitaire tel que le promoteur actine. Lors de l'induction de la FLP, il y a recombinaison avant la mitose entre les chromosomes homologues au niveau des séquences FRT. Après la division mitotique, la cellule mère a 50 % de chances de donner une cellule fille identique à la cellule mère. L'autre cellule fille peut exprimer le gène *gal 4* puisque le promoteur actine est alors présent sur le même chromosome. La protéine Gal4 peut alors se fixer sur le promoteur UAS permettant ainsi l'expression de la GFP. Le cas n° 1 présente l'utilisation de ce système pour faire du lignage cellulaire : seule l'expression d'un marqueur est induite lors de la recombinaison. Le cas n° 2 montre qu'il est possible de surexprimer n'importe quelle construction (X) sous le contrôle d'un promoteur UAS en plus du marqueur.

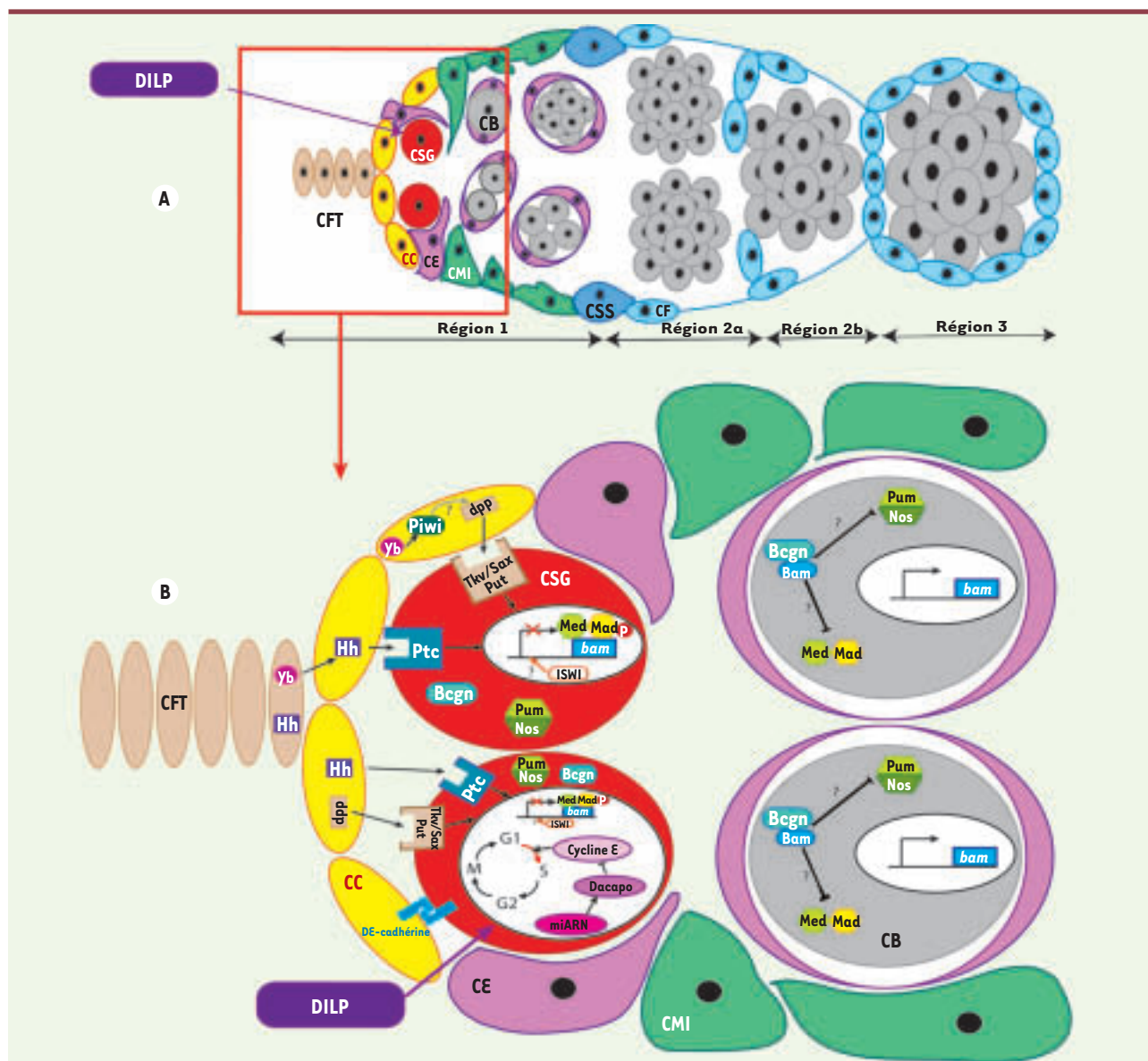


Figure 1. Organisation de la niche des cellules souches germinales de l'ovaire chez *Drosophila melanogaster*. A. Schéma de la partie antérieure d'une ovariole, le germarium.

Les follicules ovariens se mettent en place au sein du germarium qui est organisé en 4 régions : les régions 1, 2a, 2b et 3. A l'apex du germarium, deux à trois cellules souches germinales (CSG, rouge) sont associées à des cellules somatiques : directement en contact se trouvent les cellules de la coiffe (CC, jaune), plus antérieurement les cellules du filament terminal (CFT, marron), plus postérieurement les « cellules escortes » (CE, violet) et les cellules du manteau intérieur (CMI, vert). La CSG se divise asymétriquement en une CSG et un cystoblaste (CB, gris). Le cystoblaste est entouré de deux « cellules escortes ». Il subit quatre divisions synchrones dont la cytokinèse est incomplète, ce qui forme un cyste de 16 cellules germinales. En région 2a, les « cellules escortes » dégèrent. Dans cette même région se trouvent les cellules souches somatiques (CSS, bleu foncé) qui donnent les cellules folliculaires (CF, bleu clair). En région 2b, le cyste est entouré par les cellules folliculaires. Enfin, en région 3, le follicule ovarien de stade 1 est formé, prêt à bourgeonner du germarium.

B. Schéma des voies de signalisation impliquées dans le maintien et la différenciation des cellules souches germinales. La CSG (rouge) exprime des facteurs intrinsèques qui régulent son maintien et sa différenciation. Les gènes *pumilio* (*pum*) et *nanos* (*nos*) sont nécessaires au maintien des CSG alors que les gènes *bag-of-marbles* (*bam*) et *benign gonial cell neoplasm* (*bagn*) favorisent la différenciation des CSG. La voie du microARN joue un rôle sur la division des CSG en régulant le cycle cellulaire de ces dernières. Des facteurs extrinsèques sont exprimés par les cellules du filament terminal (CFT, marron) et de la coiffe (CC, jaune) telles que les protéines Hedgehog (Hh), Decapentaplegic (Dpp) de la famille des BMP (*bone morphogenetic protein*), Piwi et Yb. Ces signaux extrinsèques concourent tous au maintien des CSG. Cependant, l'ensemble des facteurs extrinsèques ainsi que les interactions entre les différentes voies de signalisation ne sont pas tous encore connus. L'expression du gène *bam*, nécessaire à la différenciation en cystoblaste (CB, gris), est réprimée dans les CSG par les complexes Mad et Med. Le facteur de remodelage de la chromatine Iswi est impliqué dans la répression et l'activation de gènes à la suite de la signalisation Dpp. Les CSG sont maintenues proches des cellules somatiques composant la niche grâce à des jonctions cellulaires formées de DÈ-cadhérine, ce qui leur permet de recevoir les signaux émanant de la niche. L'apport nutritif intervient également dans la réponse du tissu ovarien : les peptides *insuline-like* (DILP) ont pu être mis en évidence comme régulant le taux de division des CSG.

puces à ADN [4, 5]. Ces avantages font des CSG de drosophile un modèle d'étude unique des cellules souches adultes, qui a permis de faire récemment de nombreuses avancées au niveau moléculaire, cellulaire et génétique.

Identification morphologique des cellules souches de la lignée germinale et de leur niche

Le contact entre cellules somatiques et cellules germinales est essentiel au maintien de la population souche germinale

Les drosophiles mâles et femelles produisent des gamètes tout au long de leur vie, grâce à la présence de cellules souches de la lignée germinale (CSG) [6]. Ces CSG sont facilement identifiables car elles sont situées à l'apex antérieur de l'ovaire et du testicule. Dans l'ovaire, deux à trois CSG sont intimement associées à des cellules somatiques appelées cellules de la coiffe (CC) ; à l'apex antérieur se trouvent les cellules du filament terminal (CFT) et en position plus postérieure les cellules du manteau intérieur (CMI) (Figure 1A). Dans le testicule, sept à neuf CSG se trouvent au contact direct des cellules du *hub* (CH), équivalentes aux cellules de la coiffe de la femelle (Figure 2A). Les divisions des CSG sont asymétriques car les deux cellules filles adoptent des destins cellulaires différents. La cellule fille qui reste au contact des CC chez la femelle ou des CH chez le mâle, deviendra une CSG, pérennisant ainsi le nombre de cellules souches, alors que la cellule fille la plus postérieure deviendra un cystoblaste chez la femelle (Figure 1A) ou un gonioblaste chez le mâle (Figure 2A). Ces deux précurseurs se différencieront ensuite en cystes et gamètes après plusieurs divisions mitotiques et méiotiques. La double capacité des CSG à se renouveler et à se différencier provient donc de cette aptitude à se diviser de manière asymétrique.

Les cellules somatiques environnantes jouent un rôle fondamental dans cette asymétrie. Il existe en effet des jonctions, adhérentes et communicantes, entre les CSG et les cellules somatiques afin de maintenir une des cellules filles à leur contact qui conservera les caractéristiques de CSG [7, 8]. Pour preuve, l'absence de E-cadhérine, qui est le composant principal des jonctions adhérentes, entraîne le détachement des CSG de la niche, induisant ainsi leur perte par différenciation et donc la stérilité des mouches. Les jonctions adhérentes permettent aussi d'orienter les divisions des CSG selon l'axe antéro-postérieur en ancrant un des centrosomes au cortex antérieur. Une étude récente a montré que le centrosome ancré au cortex antérieur était toujours, chez le mâle, le centrosome présent originellement dans la CSG [9]. L'ancrage cortical s'effectue par le recrutement, au niveau de la jonction dans les CSG, des protéines *adenomatous polyposis coli* (APC) APC1, APC2 et de la centrosomine, ce qui aligne le fuseau mitotique de la CSG avec l'axe antéro-postérieur (Figure 2B), produisant ainsi une cellule fille antérieure qui reste au contact des cellules de la coiffe chez la femelle ou des cellules du *hub* chez le mâle [10]. La cellule postérieure, elle, se différencie au contact d'autres cellules somatiques, appelées chez le mâle cellules progénitrices du cyste (CPC), qui répriment l'identité cellule souche pour induire celle de gonioblaste par l'intermédiaire de la voie EGF (*epidermal growth factor*) [11,

12] (Figure 2B). Récemment, des cellules somatiques localisées de manière similaire ont été trouvées chez la femelle et ont été appelées cellules escortes (CE) [13] (Figure 1A). Leur fonction n'a cependant pas encore été déterminée.

Reprogrammation de cellules différenciées par les constituants de la niche germinale

L'importance de ce microenvironnement entourant les cellules souches a été reconnu dès 1978 par Schofield, qui, à l'époque, étudiait le microenvironnement médullaire des cellules souches hématopoïétiques, et proposa le terme de « niche » pour le décrire [14]. Le terme de niche s'applique aujourd'hui non seulement aux composants cellulaires du microenvironnement mais aussi aux signaux émis par les cellules qui le composent pour contrôler l'équilibre entre renouvellement et différenciation [15, 16]. Chez la drosophile, une des caractéristiques définissant la niche est la capacité de garder intactes ses propriétés de maintien des cellules souches même en leur absence. Ainsi, la preuve formelle de la présence d'une niche est la capacité d'un groupe de cellules à « reprogrammer » une cellule exogène en cellule souche. Une telle preuve a été récemment apportée pour l'ovaire et le testicule de drosophile. Tout d'abord, l'équipe d'Allan Spradling montra par analyse clonale que la demi-vie d'une CSG n'était que de 4 à 5 semaines alors que le nombre de CSG et la fertilité des femelles restent constants pendant toute leur vie [17]. Cette observation indique que les CSG doivent être remplacées naturellement par de nouvelles cellules souches. Quelle est leur origine ? En facilitant la perte partielle des CSG, les auteurs ont remarqué que la CSG voisine de celle qui était perdue se divisait alors perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur. Il en résulte que la cellule normalement en situation postérieure lors d'une mitose classique orientée selon l'axe antéro-postérieur, occupait dans ce cas la place laissée vide par la CSG perdue (voir aussi [18]). Cette équipe a ensuite montré que cette cellule conservait les propriétés d'une CSG plutôt que de se différencier en cystoblaste, expliquant ainsi l'origine de ces nouvelles CSG. Les cellules somatiques à l'apex du germarium sont donc capables de reprogrammer un cystoblaste en CSG [19]. De manière encore plus spectaculaire, la même équipe a induit la différenciation de toutes les CSG en cystoblastes et cystes de 4, 8 ou 16 cellules, en surexprimant la protéine Bam (*voir plus loin*) [20]. Un tel traitement aurait dû provoquer la perte des CSG et une stérilité définitive ; or, 25 jours après l'induction, les femelles étaient redevenues fertiles. Les auteurs ont montré que cette restauration de la fertilité était due à la dé-différenciation de cellules



germinales du cyste en CSG et ce, au contact des cellules somatiques antérieures [20]. Ce groupe de cellules est donc une véritable niche capable de reprogrammer des cellules fortement différenciées en CSG. Au cours de ces mêmes expériences, les auteurs ont remarqué que seules les cellules de la coiffe et du filament terminal restaient actives en l'absence de CSG, indiquant qu'elles sont les composants stables de la niche [21]. Chez le mâle, des expériences similaires ont montré que les cellules du *hub* formaient aussi une niche dans le testicule et que, non seulement elles étaient capables de maintenir des CSG mais aussi de reprogrammer des spermatogonies en CSG [22].

L'importance thérapeutique de ces résultats pourrait être considérable puisqu'ils montrent qu'il est possible de conférer à des cellules différenciées placées dans un environnement favorable, les propriétés de cellules souches. Or, les cellules différenciées représentent une source beaucoup plus importante de précurseurs potentiellement capables de repeupler des niches vidées à la suite de pathologies ou de traitements cytotoxiques. Il reste cependant à démontrer la généralisation de cette plasticité et son extrapolation aux vertébrés. Plus généralement, l'ovaire et le testicule de drosophile offrent la possibilité de comprendre le fonctionnement d'une véritable niche et ainsi d'étudier la régulation des cellules souches *in vivo*.

Régulation des cellules souches : facteurs intrinsèques et extrinsèques

Comme souvent chez la drosophile, l'étude des CSG a été rendue possible grâce à l'obtention de lignées mutantes affectant leur régulation. L'analyse clonale de ces mutations à l'aide du système FLP/FRT (*Encadré*) a ensuite permis de déterminer si la fonction des gènes correspondants était requise dans les CSG (facteurs intrinsèques) ou dans les cellules somatiques de la niche (facteurs extrinsèques).

Facteurs intrinsèques et contrôle de la traduction

Dans les mutants *pumillio* (*pum*) et *nanos* (*nos*), les femelles ne produisent que quelques œufs avant de perdre toutes leurs cellules germinales, indiquant que les CSG présentes chez la jeune femelle se sont toutes différenciées. *Pumillio* et *Nanos* sont donc nécessaires au renouvellement des CSG (*Figure 1B*). De plus, *Pum* et *Nos* ne fonctionnent que dans la lignée germinale en se liant à certains ARNm pour réprimer leur traduction [23-25]. Ces résultats indiquent donc que le renouvellement des CSG est contrôlé au moins en partie au niveau traductionnel par des facteurs intrinsèques.

Une deuxième classe de facteurs intrinsèques est, à l'inverse, nécessaire à la différenciation des CSGs. Les germariums des femelles mutantes pour le gène *bag-of-marbles* (*bam*) ou *benign gonial cell neoplasm* (*bgcn*) peuvent accumuler jusqu'à une centaine de CSG ou pseudo-CSG, qui sont incapables de se différencier en cystoblastes prouvant ainsi que ces gènes sont nécessaires à la différenciation des CSG [26]. La surexpression de *Bam*, chez le mâle ou la femelle, entraîne au contraire une perte des CSG en forçant leur différenciation [27]. *Bam* est donc aussi suffisant pour la différenciation des CSG (*Figures 1B, 2B*). Bien que *Bam* et *Bgcn* possèdent, comme *Pum* et *Nos*, des domaines de liaison aux ARNm, leur fonction moléculaire reste encore incomprise [28, 29].

Plus récemment, un rôle de la voie des microARN (miARN, inhibiteurs de la traduction) sur la division des CSG a pu être mis en évidence [30]. La perte de fonction dans les CSG du gène *dicer-1* (*dcr-1*), qui est l'enzyme clé de la synthèse des miARN, entraîne une forte diminution du nombre de cystes produits. L'analyse des CSG mutantes pour *dcr-1* montre que le nombre et l'identité des CSG ne sont que subtilement affectés [31, 32], mais que leur cycle cellulaire est fortement ralenti à la transition G1/S. De manière cohérente, *dacapo*, un inhibiteur de la cycline E, et donc de la transition G1/S, est une cible potentielle de ces miARN [30] (*Figure 1B*). En réprimant la traduction d'un inhibiteur de la cycline E, les miARN permettraient donc la transition G1/S des CSG, les engageant dans un processus de division conduisant à leur renouvellement et/ou à leur différenciation [30]. De manière intéressante, des souris mutantes pour l'homologue chez les mammifères du gène *dcr-1* meurent très tôt durant l'embryogenèse et cette létalité est associée à une perte de leurs cellules souches.

En conclusion, nous connaissons encore peu de facteurs intrinsèques responsables de la régulation des CSG. Cependant, ceux qui ont été caractérisés ont un rôle essentiel dans la régulation traductionnelle, bien que les ARNm cibles demeurent largement inconnus. Il reste aussi à comprendre comment l'activité de ces facteurs pro- et anti-différenciation est coordonnée afin de maintenir l'équilibre entre renouvellement et différenciation. Des résultats récents révèlent un contrôle direct par les cellules de la niche *via* des facteurs extrinsèques.

Facteurs extrinsèques

Les cellules de la niche émettent des signaux sous forme de molécules diffusant dans l'espace extracellulaire et reçues par les cellules cibles. Jusqu'à présent, seuls des signaux favorisant le maintien des CSG ont été mis en évidence. En effet, la surexpression de ces signaux par la niche induit une prolifération excessive des CSG, alors que l'absence d'expression des récepteurs de ces signaux dans les CSG entraîne leur perte. Trois voies de signalisation ont été impliquées dans le maintien des CSG : (1) la voie des BMP (*bone morphogenetic protein*) ; chez la drosophile, les ligands sont *Decapentaplegic* (*Dpp*) et *Glass bottom boat* (*Gbb*) ; (2) la voie JAK-STAT (*Janus-kinase signal transduction et activator of transcription*) *via* le ligand *Unpaired*, le récepteur *Domeless* ainsi que les protéines cytoplasmiques *Hopscotch* et *STAT92E* chez la drosophile ; (3) la voie *Hedgehog*. Chez la femelle, *Dpp* est exprimé par les cellules de la coiffe et joue le rôle principal dans le maintien des

CSG [33] (Figure 1B). Le rôle de la voie JAK-STAT est plus indirect, car elle contrôle les cellules escortes (nouvellement identifiées), qui à leur

tour régulent les CSG [13]. Au contraire chez le mâle, le ligand Unpaired de la voie JAK-STAT est exprimé par

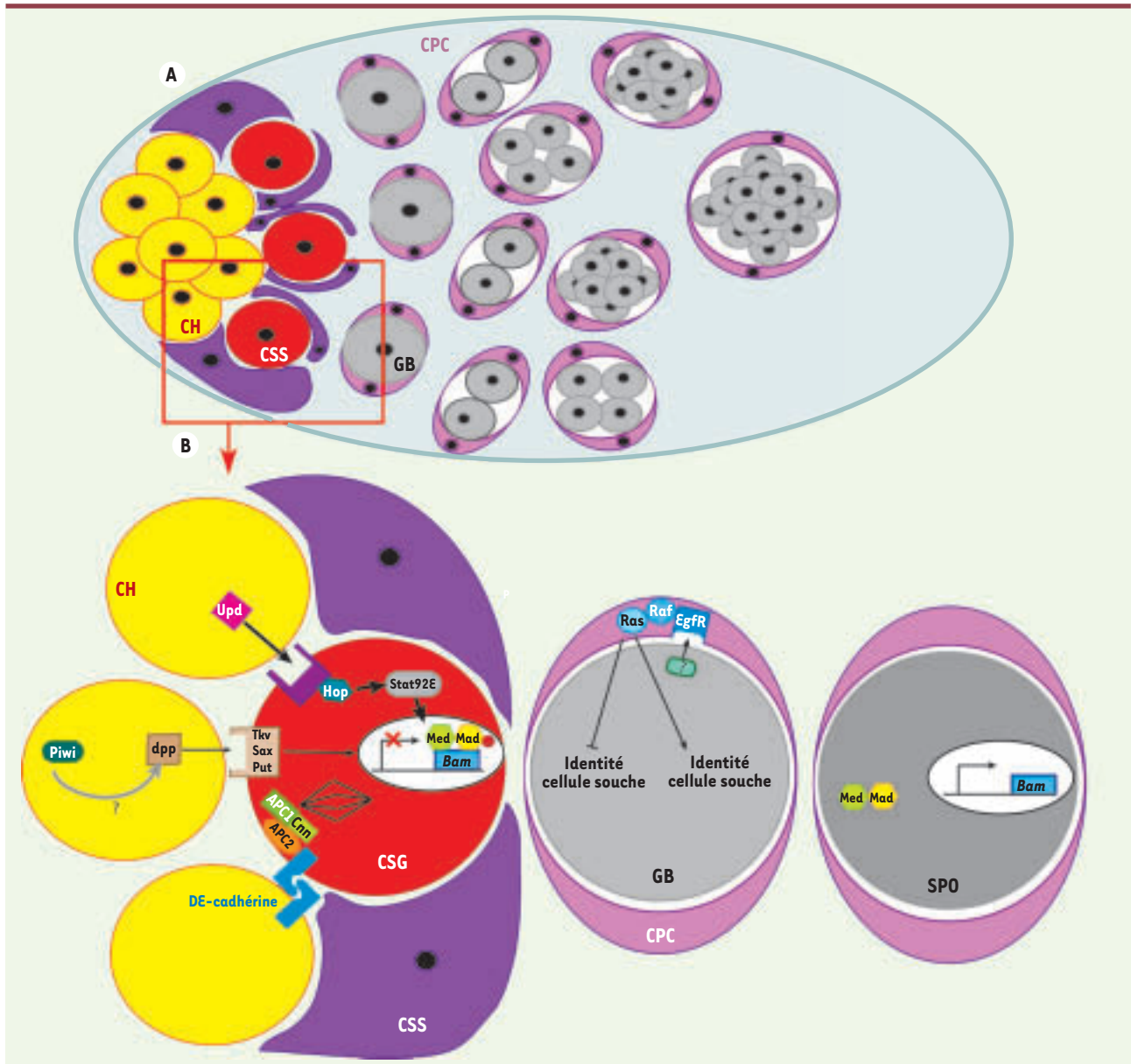


Figure 2. Organisation de la niche des CSG du testicule chez *Drosophila melanogaster*. **A. Schéma de la partie antérieure d'un testicule.** À l'apex du testicule, sept à neuf cellules souches germinales (CSG, rouge) sont associées directement à des cellules somatiques, les cellules du hub (CH, jaune). La CSG se divise de façon asymétrique pour redonner une CSG ainsi qu'un gonioblaste (GB, gris). Ce gonioblaste subit quatre divisions synchrones à cytokinèse incomplète pour donner un cyste composé de 16 cellules germinales. Chaque gonioblaste et l'ensemble de sa descendance sont entourés de deux cellules résultant de la division des cellules souches somatiques (CSS, violet foncé) et appelées cellules progénitrices du cyste (CPC, violet). **B. Schéma des voies de signalisation impliquées dans le maintien et la différenciation des cellules souches germinales chez le mâle.** Les cellules du hub (CH, jaune) produisent les protéines Unpaired (Upd) et Decapentaplegic (Dpp) qui vont activer, dans les CSG (rouge), la voie JAK-STAT et la voie BMP respectivement. La voie des BMP réprime, dans la CSG et le gonioblaste (GB, gris clair), l'expression du gène *bam* via les complexes Mad et Med. Le gène *bam* est exprimé dans la spermatogonie (SPO, gris foncé). Afin de correctement recevoir ces signaux, les CSG sont maintenues proches des cellules somatiques composant la niche grâce à des jonctions cellulaires formées de DE-cadhérine. Dans la CSG, la DE-cadhérine forme un complexe avec les protéines APC1, APC2 et Cnn qui permettent l'orientation du fuseau mitotique assurant ainsi l'asymétrie de la division de la CSG. Les cellules progénitrices du cyste (CPC, violet) répriment l'identité de cellule souche pour induire celle de gonioblaste via la voie EGF.



les cellules du *hub* et joue un rôle prépondérant dans le maintien des CSG [34, 35] (Figure 2B). La voie Dpp a une influence plus mineure sur l'équilibre entre renouvellement et différenciation dans le testicule [28].

Le fonctionnement de la voie Dpp a été bien décrit dans l'ovaire, où l'on a identifié les principaux intermédiaires intervenant de la réception du signal à la régulation transcriptionnelle des gènes cibles. En effet, dans les CSG femelles, Dpp se lie aux récepteurs Punt et Thick vein (*tkv*), qui phosphorylent Mad. Mad ainsi activé se lie à Medea, provoquant la localisation du complexe dans le noyau, où il se fixe sur une séquence spécifique du promoteur de Bam pour inhiber directement sa transcription, maintenant de ce fait la CSG dans un état « souche » [36, 38]. À l'inverse, le cystoblaste, se trouvant loin des cellules de la niche, ne reçoit pas le signal Dpp. En conséquence, Mad n'est pas activé, Bam est transcrit, et la fonction de Pum/Nanos est inhibée, provoquant ainsi la différenciation des CSG en cystoblastes (Figure 1B). La régulation transcriptionnelle des CSG par la niche est aussi plus globale, puisqu'il a été montré récemment que des facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine, dont ISWI, étaient nécessaires au maintien des CSG et que ce processus dépendait en partie de la voie Dpp [39] (Figure 1B).

Le fonctionnement des autres signaux provenant de la niche tels que JAK-STAT, Hedgehog, le facteur nucléaire Piwi et la protéine cytoplasmique Yb, est à l'heure actuelle moins bien caractérisé et obscurci par une certaine redondance de leurs activités [40-43] (Figures 1B, 2B). Un autre niveau de régulation des CSG a de plus été découvert récemment. En effet, il a été montré que l'apport nutritif du milieu contrôle le taux de divisions des CSG, par l'intermédiaire des peptides insuline-like (DILP) reconnus par le récepteur à l'insuline [44] (Figure 1B). Il existe donc une régulation systémique des CSG indépendante de la niche. Il reste cependant à comprendre comment toutes ces voies de signalisation interagissent entre elles pour réguler l'équilibre entre renouvellement et différenciation [38].

Conclusions

L'identification des cellules constituant la niche, et des signaux qu'elles émettent a permis de relier directement l'influence du microenvironnement cellulaire au programme génétique intrinsèque des cellules souches de la lignée germinale. Les principes qui se dégagent de l'étude des CSG chez la drosophile ont de plus été généralisés à d'autres cellules souches, telles que les cellules souches hématopoïétiques ou épithéliales chez les mammifères. En effet, ces cellules souches sont ancrées

à des cellules spécifiques qui émettent des signaux moléculaires identiques à ceux régulant les CSG tels que BMP, JAK-STAT, Hh ; ainsi que Wnt et Notch, qui eux n'ont pas encore été impliqués dans la régulation des CSG [45] (bien que récemment, un rôle de la voie Notch a pu être mis en évidence dans la formation de la niche [46], et en particulier dans une régulation des CSG sur le nombre de cellules composant la niche [47]). Les avantages du modèle drosophile ont donc permis de faire de rapides progrès dans l'identification et la compréhension des mécanismes qui contrôlent le comportement des cellules souches. Ces signaux ne sont cependant pas uniques à la régulation des cellules souches, puisqu'ils sont utilisés de nombreuses fois au cours du développement d'un organisme. Comment une cellule souche répond-elle alors de manière spécifique à ces signaux ? En d'autres termes, quels facteurs intrinsèques donnent à une cellule souche son identité ? Une stratégie possible pour répondre à ces questions est d'analyser le transcriptome (l'ensemble des transcrits) de plusieurs types de cellules souches et de comparer les éléments communs [4, 5]. De telles approches sont en cours de réalisation chez les mammifères et la drosophile, et il est à espérer que l'identité des cellules souches soit enfin révélée. ♦

SUMMARY

Regulation of germline stem cells: the niche expands in *Drosophila*

Our fascination for stem cells originates from their ability to divide asymmetrically in order to self-renew and produce daughter cells which can differentiate and replenish tissues. Stem cells could thus represent an unlimited source of differentiated cells that could be used to repair malformed, damaged or ageing tissues. Understanding how their behaviour is regulated is then of paramount medical interest. Specific microenvironments surrounding the stem cells, termed « niches », were proposed to play a major role in the balance between self-renewal and differentiation. However, it is only recently, in the case of the stem cells producing the germline (GSGs) in *Drosophila*, that the cells and signals creating a niche were identified for the first time. Here, we review how this niche has been defined at the cellular and functional levels *in vivo*, thanks to the powerful genetic tools available in *Drosophila*. Such studies have revealed adhesive interactions, cell-cycle modifications and intercellular signals that control the GSC behavior. Extracellular signals from the niche activate the BMP or JAK-STAT pathways in the GSCs and are necessary for their maintenance. Strikingly, both signaling pathways are also sufficient to convert differentiated germ cells into functional GSCs, demonstrating *in vivo* that a niche has the capacity to regenerate stem cells from differentiated cells. Rapid progresses have further identified direct links between these signaling pathways and the transcriptional regulation of the GSCs, providing a simple paradigm for stem cells regulation. Many of these features and signals are conserved in stem cells niches from *Drosophila* to mammals. We can thus hope that research on the GSCs in *Drosophila* will benefit therapeutic approaches to human degenerative diseases. ♦

REMERCIEMENTS

Nous remercions Jean-Antoine Lepesant et Pierre Fichelson pour leurs commentaires et leur relecture de cet article.

RÉFÉRENCES

1. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000 ; 100 : 143-55.
2. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004 ; 432 : 324-31.
3. Xu T, Rubin G. Analysis of genetic mosaics in developing an adult *Drosophila* tissues. *Development* 1993 ; 117 : 1223-37.
4. Kai T, Williams D, Spradling AC. The expression profile of purified *Drosophila* germline stem cells. *Dev Biol* 2005 ; 283 : 486-502.
5. Terry NA, Tulina N, Matunis E, et al. Novel regulators revealed by profiling *Drosophila* testis stem cells within their niche. *Dev Biol* 2006 ; 294 : 246-57.
6. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005 ; 21 : 605-31.
7. Gilboa L, Forbes A, Tazuke SI, et al. Germ line stem cell differentiation in *Drosophila* requires gap junctions and proceeds via an intermediate state. *Development* 2003 ; 130 : 6625-34.
8. Song X, Zhu CH, Doan C, et al. Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches. *Science* 2002 ; 296 : 1855-7.
9. Yamashita YM, Mahowald AP, Perlin JR, et al. Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science* 2007 ; 315 : 518-21.
10. Yamashita YM, Jones DL, Fuller MT. Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* 2003 ; 301 : 1547-50.
11. Kiger A, White-Cooper H, Fuller M. Somatic support cells restrict germline stem cell self-renewal and promote differentiation. *Nature* 2000 ; 407 : 750-4.
12. Tran J, Brenner T, DiNardo S. Somatic control over the germline stem cell lineage during *Drosophila* spermatogenesis. *Nature* 2000 ; 407 : 754-7.
13. Decotto E, Spradling A. The *Drosophila* ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals. *Dev Cell* 2005 ; 9 : 501-10.
14. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978 ; 4 : 7-25.
15. Ohlstein B, Kai T, Decotto E, et al. The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol* 2004 ; 16 : 693-9.
16. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001 ; 414 : 98-104.
17. Margolis J, Spradling A. Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 1995 ; 121 : 3797-807.
18. Huynh JR. Contrôle somatique des cellules souches : la lignée germinale chez *Drosophila melanogaster*. *Med Sci (Paris)* 2001 ; 17 : 628-32.
19. Xie T, Spradling A. A niche maintaining germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* 2000 ; 290 : 328-30.
20. Kai T, Spradling A. Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature* 2004 ; 428 : 564-9.
21. Kai T, Spradling AS. An empty *Drosophila* stem cell niche reactivates the proliferation of ectopic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 4633-8.
22. Brawley C, Matunis E. Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation *in vivo*. *Science* 2004 ; 304 : 1331-4.
23. Forbes A, Lehmann R. Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development* 1998 ; 125 : 679-90.
24. Lin H, Spradling A. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 1997 ; 124 : 2463-76.
25. Wang Z, Lin H. Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation. *Science* 2004 ; 303 : 2016-9.
26. McKearin D, Spradling A. Bag-of-marbles: a *Drosophila* gene required to initiate both male and female gametogenesis. *Genes Dev* 1990 ; 4 : 2242-51.
27. Ohlstein B, McKearin D. Ectopic expression of the *Drosophila* Bam protein eliminates oogenic germline stem cells. *Development* 1997 ; 124 : 3651-62.
28. Kawase E, Wong MD, Ding BC, et al. Gbb/Bmp signaling is essential for maintaining germline stem cells and for repressing bam transcription in the *Drosophila* testis. *Development* 2004 ; 131 : 1365-75.
29. Ohlstein B, Lavoie CA, Vef O, et al. The *Drosophila* cystoblast differentiation factor, benign gonial cell neoplasm, is related to DExH-box proteins and interacts genetically with bag-of-marbles. *Genetics* 2000 ; 155 : 1809-19.
30. Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, et al. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 2005 ; 435 : 974-8.
31. Jin Z, Xie T. Dcr-1 maintains *Drosophila* ovarian stem cells. *Curr Biol* 2007 ; 17 : 539-44.
32. Park JK, Liu X, Strauss TJ, et al. The miRNA pathway intrinsically controls self-renewal of *Drosophila* germline stem cells. *Curr Biol* 2007 ; 17 : 533-8.
33. Xie T, Spradling AC. Decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell* 1998 ; 94 : 251-60.
34. Kiger AA, Jones DL, Schulz C, et al. Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* 2001 ; 294 : 2542-5.
35. Tulina N, Matunis E. Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science* 2001 ; 294 : 2546-9.
36. Chen D, McKearin D. Gene circuitry controlling a stem cell niche. *Curr Biol* 2005 ; 15 : 179-84.
37. Song X, Wong MD, Kawase E, et al. Bmp signals from niche cells directly repress transcription of a differentiation-promoting gene, bag of marbles, in germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 2004 ; 131 : 1353-64.
38. Szakmary A, Cox DN, Wang Z, et al. Regulatory relationship among piwi, pumilio, and bag-of-marbles in *Drosophila* germline stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Biol* 2005 ; 15 : 171-8.
39. Xi R, Xie T. Stem cell self-renewal controlled by chromatin remodeling factors. *Science* 2005 ; 310 : 1487-9.
40. Cox DN, Chao A, Baker J, et al. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev* 1998 ; 12 : 3715-27.
41. Cox DN, Chao A, Lin H. Piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development* 2000 ; 127 : 503-14.
42. King FJ, Lin H. Somatic signaling mediated by fs(1)Yb is essential for germline stem cell maintenance during *Drosophila* oogenesis. *Development* 1999 ; 126 : 1833-44.
43. King FJ, Szakmary A, Cox DN, et al. Yb modulates the divisions of both germline and somatic stem cells through piwi- and hh-mediated mechanisms in the *Drosophila* ovary. *Mol Cell* 2001 ; 7 : 497-508.
44. LaFever L, Drummond-Barbosa D. Direct control of germline stem cell division and cyst growth by neural insulin in *Drosophila*. *Science* 2005 ; 309 : 1071-3.
45. Wong MD, Jin Z, Xie T. Molecular mechanisms of germline stem cell regulation. *Annu Rev Genet* 2005 ; 39 : 173-95.
46. Song X, Call GB, Kirilly D, et al. Notch signaling controls germline stem cell niche formation in the *Drosophila* ovary. *Development* 2007 ; 134 : 1071-80.
47. Ward EJ, Shcherbata HR, Reynolds SH, et al. Stem cells signal to the niche through the Notch pathway in the *Drosophila* ovary. *Curr Biol* 2006 ; 16 : 2352-8.
48. Lee T, Winter C, Marticke SS, et al. Essential roles of *Drosophila* RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron* 2000 ; 25 : 307-16.
49. Kirilly D, Spana EP, Perrimon N, et al. BMP signaling is required for controlling somatic stem cell self-renewal in the *Drosophila* ovary. *Dev Cell* 2005 ; 9 : 651-62.

TIRÉS À PART

J.R. Huynh