

Ars2 : un nouveau régulateur central de l'identité des cellules souches neurales

Celia Andreu-Agullo, Thomas Maurin

Facteurs de transcription et cellules souches neurales

Les cellules souches adultes ont la double propriété de proliférer à l'infini sans perte de potentiel, c'est-à-dire de s'autorenouveler et de pouvoir se différencier en un ou plusieurs types cellulaires. Ces deux caractères confèrent leur identité aux cellules souches. Un des principaux enjeux de la recherche sur ce type cellulaire singulier est de comprendre les mécanismes moléculaires qui permettent le maintien de leur identité [1].

Les progrès techniques ont permis de mettre un terme au dogme selon lequel les neurones sont exclusivement produits au cours du développement. Dès 1960, des études d'incorporation de thymidine tritiée dans les cerveaux de rats adultes ont permis de démontrer la formation de nouveaux neurones dans différentes régions du cerveau. Plus tard, des cellules souches neurales (CSN) ont été identifiées. La quasi-quiescence de ces cellules permet de les suivre grâce à leur incorporation à long

terme d'analogues nucléotidiques dérivés du BrdU (bromodéoxyuridine). Ainsi, on distingue dans le système nerveux central adulte deux zones neurogènes principales hébergeant ces CSN, l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire (SVZ) [2] (Figure 1).

Les facteurs de transcription jouent un rôle central dans la physiologie des cellules souches. Certains contrôlent leur multiplication quand d'autres orchestrent leur différenciation [3]. Ainsi, plusieurs protagonistes interviennent de façon cruciale pour contrôler ces processus au niveau des CSN. C'est le cas de la voie de signalisation en aval des récepteurs Notch. En effet, les cellules qui expriment fortement CBF1 (ou RBPJk) - un facteur de transcription ubiquitaire médiateur nucléaire de l'action de Notch - ont une plus grande capacité à s'autorenouveler que celles qui l'expriment faiblement et qui, elles, sont déjà engagées dans leur différenciation [4]. Par ailleurs, l'autorenouvellement des CSN issues de souris doublement invalidées

Department of developmental biology,
Sloan-Kettering institute, 1275 York Avenue,
Box 252, New York, NY 10065, États-Unis.
thomas.maurin@gmail.com

pour les gènes *Hes1* (de la famille des *hairly enhancer of split*, gènes cibles de Notch) et *Hes5* est réduit. Le récepteur nucléaire orphelin Tlx est lui aussi nécessaire au maintien de l'état indifférencié des CSN. En effet, chez les souris adultes qui en sont dépourvues, la prolifération cellulaire et l'expression de la nestine dans les zones neurogènes sont diminuées [5]. *Bmi*, *HMG2* (*high mobility group AT-hook 2*), ou encore *Gli* (facteur de transcription à doigts de zinc) interviennent également dans le contrôle de l'autorenouvellement des CSN [3]. Quant aux membres de la famille *SoxB1* (*Sox1*, *Sox2* et *Sox3*), les CSN les expriment tout au long du développement et jusqu'à l'âge adulte. Un défaut d'expression de *Sox2* et ou *Sox3* dans les précurseurs neuronaux entraîne leur sortie prématurée du cycle cellulaire et un début de différenciation [6]. À l'inverse, la surexpression de *Sox2* inhibe la différenciation neuronale et force les CSN à conserver leur caractère indifférencié [7]. Enfin, *Sox2* est essentiel au maintien des CSN dans les zones neurogènes chez l'adulte [8, 9].

Les cellules souches adultes et les progéniteurs qu'elles engendrent sont identifiables non seulement par leur morphologie ou leur localisation, mais aussi grâce à un certain nombre de marqueurs spécifiques (Tableau 1 et Figure 1). Grâce aux techniques d'imagerie, d'ARN interférence et de génétique, nous avons caractérisé le rôle clé de *Ars2* (*arsenite-resistance protein 2*, aussi connue sous le nom de *Srft*) dans le maintien de l'identité souche des CSN [10].

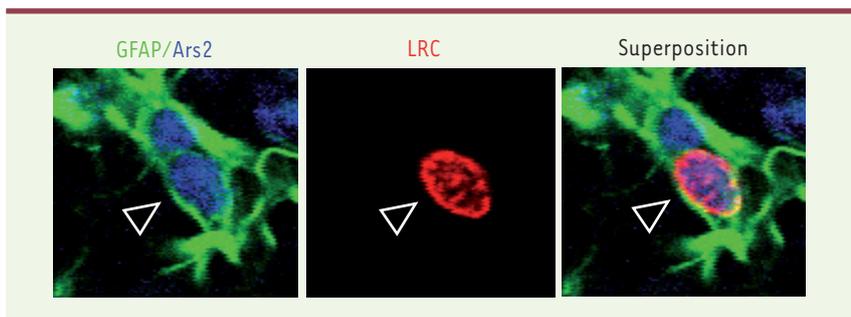


Figure 1. *Ars2* est exprimée par les CSN. Marquage immunohistochimique d'une section coronale du cerveau d'une souris transgénique adulte GFAP-GFP. GFAP (vert), *Ars2* (bleu) et CldU (rouge). LRC : label retaining cell.



Type cellulaire	Nomenclature	Marqueurs endogènes	Marquage à long terme (LRC)	Expression Ars2
Cellules souches neurales	B	GFAP ⁺ Sox2 ⁺ / GFAP ⁺ Lex ⁺ / GFAP ⁺ Prominin ⁺ / GFAP ⁺ Nestine ⁺	oui	oui
<i>Transit amplifying progenitors</i> (TAP)	C	Mash1 ⁺	non	oui
Neuroblastes (NB)	A	DCX ⁺	non	non
Astrocytes matures et parenchymateux		GFAP ⁺ S100β ⁺	non	non
Cellules astrogliales (non pluripotentes)		GFAP ⁺ Sox2 ⁻ / GFAP ⁺ Nestine ⁻	non	non
Cellules de l'épendyme	E	S100β ⁺	non	oui
Interneurones granuleux et pérglomérulaires		Tyrosine hydroxylase (TH), calretinin (CR) ou calbindin (CB)	oui	nd

Tableau 1. Récapitulation des marqueurs endogènes permettant l'identification des différentes cellules filles des CSN. nd : non déterminé.

Ars2 est exprimée par les cellules souches adultes neurales

En réalisant des comarquages en immunohistochimie (Figure 1), nous avons démontré que *Ars2* est exprimée dans les cellules souches neurales (coexprimant GFAP [glial fibrillary acidic protein] et CD133). Ainsi, 90 % des cellules GFAP⁺ incorporant à long terme le CldU (5-chloro-2'-déoxyuridine), et nommées LRC pour *label retaining cells*, coexpriment *Ars2*. En revanche, *Ars2* est quasi absente des populations de cellules ayant engagé leur différenciation. Par exemple, dans les TAP (*transit amplifying progenitors*) exprimant Mash1, l'expression d'*Ars2* est faible (seulement 7 % des TAP expriment *Ars2*), et elle est quasi nulle dans les neuroblastes (exprimant *Dcx*, doublecortine), les cellules astrogliales (GFAP⁺/Nestine⁻/Sox2⁻) et les astrocytes matures (S100b⁺). L'expression d'*Ars2* décroît donc au cours de l'engagement des lignées issues de la SVZ, ce qui suggère que cette molécule peut jouer un rôle dans le maintien du caractère souche des CSN.

Quel rôle pour *Ars2* *in vivo* ?

Nous avons cherché à diminuer l'expression d'*Ars2* dans les CSN grâce à la technique d'ARN interférence tout en suivant le devenir de ces cellules.

Des shARN spécifiques de la version murine d'*Ars2* ont été clonés dans des vecteurs lentiviraux. Ces vecteurs ont été pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe du virus Mokola qui permet de n'infecter que les cellules de la lignée astrogliale. En utilisant un cadre stéréotaxique, nous avons injecté ces virus dans la SVZ, au plus près des CSN (Figure 2). Nous avons ensuite réalisé des marquages en immunohistochimie et étudié le devenir des cellules infectées (exprimant la GFP) chez les souris injectées avec les lentivirus soit

contrôles (shT), soit codant le shARN ciblant *Ars2* (sh*Ars2*). Chez ces dernières, nous avons observé une forte réduction du nombre des cellules souches neurales GFAP⁺/Nestine⁺ et des neuroblastes DCX⁺. En accord avec des travaux antérieurs expliquant la perte des cellules souches par leur engagement dans la différenciation astrocytaire [5, 11], nous avons observé que le nombre d'astrocytes matures - reconnus par l'expression de S100β⁺ - infectés était augmenté de 50 % chez les souris ayant reçu les vecteurs sh*Ars2*.

Enfin, un mois après l'injection des lentivirus, le nombre d'interneurones néoformés dans le bulbe olfactif est fortement diminué chez les souris traitées avec le sh*Ars2*. L'autorenouvellement est une propriété difficile à analyser car il faut démontrer qu'il y a eu division cellulaire tout en s'assurant que les cellules filles conservent leur potentiel de différenciation. On peut cultiver les CSN *in vitro* sous forme de sphères non adhérentes, les « neurosphères ». Ainsi, compter le nombre de nouvelles neurosphères générées à chaque passage en culture

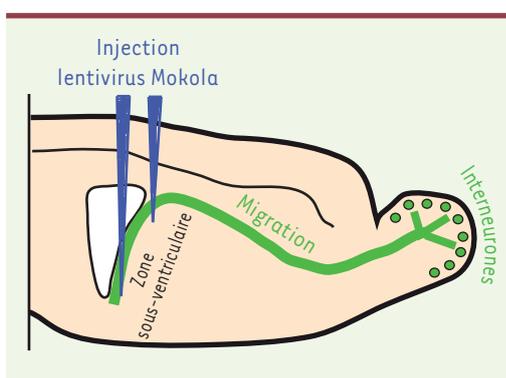


Figure 2. Représentation du protocole expérimental utilisé pour les injections stéréotaxiques de lentivirus. Deux injections de lentivirus pseudotypés avec l'enveloppe Mokola ont été pratiquées au niveau de la SVZ (zone sous-ventriculaire). Les cellules infectées comme les CSN ainsi que leurs cellules filles (TAP, cellules astrogliales, neuroblastes et les interneurones du bulbe olfactif) sont identifiées grâce à l'expression de la GFP.



est une mesure fiable de l'autorenouvellement. Nous avons confirmé nos observations faites *in vivo* en cultivant les CSN issues des souris traitées par les shArs2. Ces cellules n'étaient plus capables de produire de neurosphères, indiquant un défaut d'autorenouvellement en absence d'Ars2. À l'opposé, la surexpression d'Ars2 entraîne une augmentation significative du nombre de neurosphères formées, ce qui suggère que Ars2 est nécessaire et suffisante pour le maintien de l'autorenouvellement des CSN chez l'adulte.

Nous avons cherché à approfondir nos résultats en invalidant de façon conditionnelle le gène *Ars2* (*Ars2 cKO*). Pour cela, nous avons croisé des souris *Ars2^{fl/fl}* avec des souris *hGFAP-cre*. Le promoteur *hGFAP* permet l'expression de *cre* à partir du jour embryonnaire E13,5, ce qui entraîne donc la suppression de l'expression d'Ars2 dans

les cellules de la lignée astrogliale. Les souris *Ars2 cKO* sont nées avec la distribution mendélienne attendue et sans aucun phénotype notable à la naissance. Cependant les mutants développent progressivement un retard de croissance, une ataxie et une hydrocéphalie et meurent environ 20 jours après leur naissance. Les coupes histologiques des cerveaux des souris *Ars2 cKO* réalisées 15 jours après leur naissance montrent un élargissement des ventricules et une diminution de la taille des bulbes olfactifs. Dans la SVZ, le nombre de CSN (de phénotype Nestine⁺/Sox2⁺/LeX⁺/GFAP⁺) est effondré (< 20 % du nombre observé chez les contrôles), et celui des cellules de la lignée astrogliale (GFAP⁺S100b⁺) fortement augmenté. Ces observations confirment donc le rôle d'Ars2 dans le maintien des CSN et dans le contrôle de la neurogenèse postnatale.

Quels sont les facteurs de transcription responsables des effets d'Ars2 ?

Étant donné le rôle majeur de Hes1, Hes5 et Sox2 dans le maintien des CSN, nous avons analysé leurs niveaux d'expression dans les cellules transduites avec les lentivirus shArs2 et shT. Les niveaux de Sox2 sont drastiquement diminués lorsque l'expression d'Ars2 est altérée. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine nous ont permis de montrer que Ars2 se lie à une région spécifique du promoteur de *Sox2*. Ars2 active la transcription de *Sox2* dans les CSN, mais cette fonction pourrait être spécifique du contexte cellulaire. En effet, *Sox2* n'est pas activé dans les cellules non neuronales 3T3 qui, pourtant, expriment de forts niveaux d'Ars2.

Afin de valider ce rôle d'effecteur clé d'Ars2, nous avons transfecté *in utero* un vecteur permettant la surexpression de *Sox2* dans le cerveau des embryons *Ars2 cKO*. Comme attendu, toutes les capacités d'autorenouvellement et de pluripotence des CSN issues de ces souris ont été restaurées. Ce faisceau d'observations, ajouté aux résultats de nos expériences *in vivo*, établit Ars2 comme un nouveau régulateur central de l'expression de *Sox2*.

Ars2 avait été précédemment décrite pour son rôle dans la résistance à l'arsenic, puis plus tard dans la biogenèse des microARN et plus généralement dans les mécanismes moléculaires de l'ARN interférence [12, 13]. Dans le cadre de notre étude, nous avons découvert un nouveau rôle pour Ars2, totalement indépendant de ces autres fonctions décrites précédemment. En effet, nous démontrons que Ars2 est exprimée dans les cellules souches neurales et que sa présence décroît au cours de leur différenciation. Nous montrons que Ars2 est une protéine qui lie spécifiquement l'ADN et qu'elle est un régulateur majeur de l'expression de *Sox2*. Ainsi, Ars2 est un nouveau partenaire moléculaire essentiel au maintien de l'identité des cellules souches neurales (Figure 3).

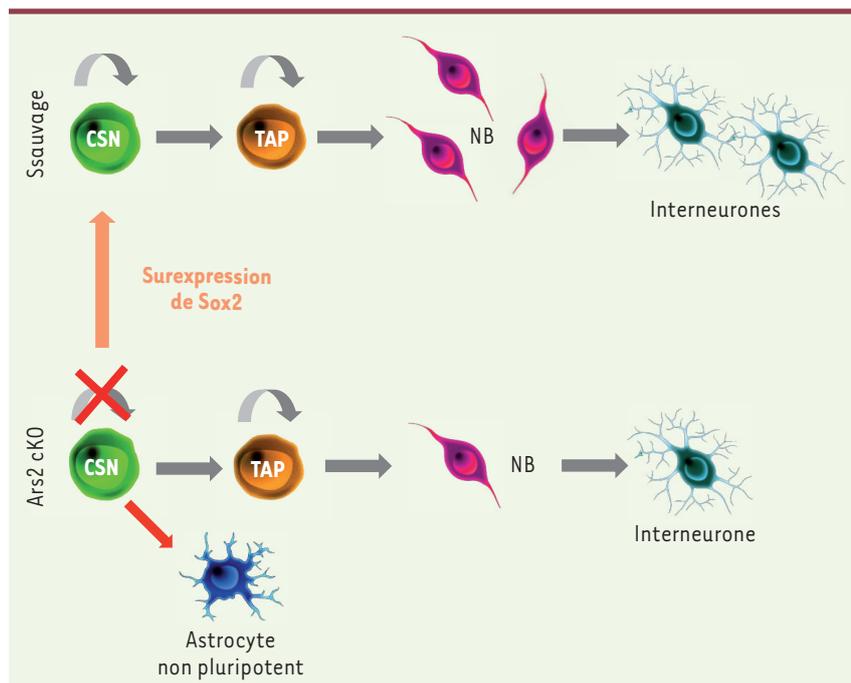


Figure 3. *Ars2* est un régulateur central de l'identité des CSN. Chez les souris sauvages, les CSN (qui expriment *Ars2*) sont capables de s'autorenouveler et de générer des neuroblastes (NB) qui migrent vers le bulbe olfactif où ils se différencient en interneurones. En l'absence d'*Ars2*, les CSN sont dans l'incapacité d'assurer la neurogenèse et se différencient en astrocytes. Cette diminution du compartiment des CSN explique que les souris invalidées pour *Ars2* génèrent moins de nouveaux interneurones. La surexpression de *Sox2* compense ce phénotype en restaurant la pluripotence et l'autorenouvellement des CSN chez les souris *Ars2 cKO*.

Perspectives

Notre étude soulève de nouvelles interrogations dont certaines sont actuellement au centre des recherches menées dans le laboratoire d'Eric Lai. Par exemple, quel est le rôle d'Ars2 dans l'autorenouveau des cellules souches embryonnaires ? En effet, le développement embryonnaire des souris invalidées pour *Ars2* est bloqué à un stade précoce qui rappelle fortement le phénotype des souris invalidées pour *Sox2*. Par ailleurs, il y a une ressemblance frappante entre les cerveaux des souris ayant une invalidation conditionnelle d'*Ars2* et ceux des souris porteuses d'un mutant *Sox* hypomorphe [8]. Cependant, les cerveaux des souris mutantes hypomorphes *Sox2* ne présentent pas d'astroglie majeure comme ceux des souris *Ars2*. Il se pourrait donc que *Ars2* contrôle la différenciation vers la lignée astrogliale de manière spécifique, en contrôlant simultanément des gènes autres que *Sox2*. Des travaux d'immunoprécipitation de la chromatine couplée à du séquençage à haut débit sont en cours afin de caractériser de nouveaux gènes cibles d'*Ars2*.

Identifier ces gènes pourrait s'avérer très utile pour décrypter la fonction de cette molécule, compléter notre compréhension du phénotype des souris *Ars2* *cKO* et, à plus long terme, imaginer de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, peut-être l'activation de l'expression d'*Ars2* dans certaines tumeurs cérébrales comme les astrogliomes pourrait-elle permettre de réprimer la prolifération des cellules cancéreuses. ♦ **Ars2, an essential player in neural stem cell identity**

LIENS D'INTÉRÊT

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

REMERCIEMENTS

Nous remercions D. Pisani, L. Boyer et B. Mari pour leur relecture critique de ce manuscrit. Nous remercions tout spécialement Eric C. Lai pour son soutien et pour nous avoir donné tous les moyens nécessaires pour réaliser cette étude.

RÉFÉRENCES

1. Shi Y, Sun G, Zhao C, Stewart R. Neural stem cell self-renewal. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008 ; 65 : 43-53.
2. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* 2003 ; 6 : 1127-34.
3. Ahmed S, Gan HT, Lam CS, et al. Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation. *Cell Adh Migr* 2009 ; 3 : 412-24.
4. Mizutani K, Yoon K, Dang L, et al. Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature* 2007 ; 449 : 351-5.
5. Shi Y, Chichung Lie D, Taupin P, et al. Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature* 2004 ; 427 : 78-83.
6. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 2003 ; 39 : 749-65.
7. Pevny L, Placzek M. SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol* 2005 ; 15 : 7-13.
8. Ferri AL, Cavallaro M, Braidia D, et al. *Sox2* deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 2004 ; 131 : 3805-19.
9. Suh H, Consiglio A, Ray J, et al. *In vivo* fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of *Sox2*⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 2007 ; 1 : 515-28.
10. Andreu-Agullo C, Maurin T, Thompson CB, Lai E. C. *Ars2* maintains neural stem-cell identity through direct transcriptional activation of *Sox2*. *Nature* 2012 ; 481 : 195-8.
11. Raponi E, Agenes F, Delphin C, et al. *S100B* expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 2007 ; 55 : 165-77.
12. Sabin LR, Zhou R, Gruber JJ, et al. *Ars2* regulates both miRNA- and siRNA-dependent silencing and suppresses RNA virus infection in *Drosophila*. *Cell* 2009 ; 138 : 340-51.
13. Yang L, Liu Z, Lu F, et al. *Serrate* is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *Plant J* 2006 ; 47 : 841-50.

NOUVELLE

Le paludisme : quelle place pour l'axe hepcidine-fer ?

Sophie Vulont¹, Laurent Rénia², Dominique Labie¹

¹ Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France ;

² Singapore immunology network (SiGN), 8A biomedical grove, immunos building, level 4, Singapore.

sophie.vulont@inserm.fr

Le fer fait partie des nutriments les plus convoités par les pathogènes pour se multiplier. Ces derniers ont de fait développé des systèmes sophistiqués pour récupérer de façon maximale, parfois aux dépens de l'hôte, ce métal si précieux [1]. Au cœur de cette bataille, l'hepcidine joue un rôle important dans la défense de l'hôte. L'hepcidine est une hormone hyposidérémiant, induite lors d'épisodes infectieux, qui agit en limitant l'export du fer des entérocytes (provenant du fer

alimentaire) et des macrophages (provenant du catabolisme de l'hémoglobine) [2]. Les données récentes de la littérature sur le paludisme proposent un bel exemple de la place importante tenue par l'axe hepcidine-fer dans la compétition hôte-pathogène.

Physiopathologie du paludisme

Le paludisme, malaria dans la littérature anglophone, est une des maladies infectieuses les plus fréquentes au monde,

responsable chaque année de plus d'un million de décès, transmise par la piqûre d'un moustique femelle infecté [3]. Cette piqûre introduit dans l'organisme l'agent infectieux, le *Plasmodium*. En Afrique subsaharienne, l'agent infectieux dominant est le *Plasmodium falciparum* et le principal vecteur l'*Anopheles gambiae*. Introduit au niveau de la peau, le sporozoïte gagne la circulation et les sinusoides hépatiques. Il parvient ainsi aux hépatocytes, il y forme une vacuole parasitophore où