

L'administration de geldanamycine réduit le nombre de gonocytes exprimant l'HSP86 chez l'embryon de souris : premiers résultats

Geldanamycin administration reduces the number of HSP86-positive germ cells in the mouse embryo : preliminary results

N. Vanmuylder^{1,2}, H. Larbi¹, M. Choa-Duterte¹, P. Salvia¹, M. Rooze¹ et S. Louryan¹

¹Laboratoire d'Anatomie, Biomécanique et Organogenèse, Faculté de Médecine, U.L.B.,

²UER Biomédicale, Haute Ecole Francisco Ferrer, Pôle Universitaire de Bruxelles-Wallonie

RESUME

5 mg de geldanamycine, un inhibiteur de la protéine de choc thermique HSP86 qui s'exprime dans les cellules germinales, ont été administrés à des souris gestantes de 8 jours. A 17 jours de gestation, les embryons ont été prélevés, et une analyse quantitative du nombre de cellules immunoréactives à la HSP86 dans les gonades a été réalisée, en comparaison à des embryons témoins.

D'abord, on constate que le nombre moyen de cellules germinales est plus bas chez les embryons mâles que chez les embryons femelles, aussi bien chez les embryons témoins que chez les spécimens expérimentaux.

L'examen externe des embryons ne montre aucune différence entre les deux populations. Les embryons soumis à la geldanamycine montrent une diminution significative du nombre de cellules germinales immunoréactives. Chez deux embryons, nous avons observé un amas de cellules immunoréactives dans la région pelvienne.

Il en est conclu que la geldanamycine inhibe vraisemblablement la migration des cellules germinales, et que cette inhibition donne parfois lieu à la formation de groupes ectopiques de cellules évoquant des tératomes.

Rev Med Brux 2009 ; 30 : 23-7

ABSTRACT

5 mg of Geldanamycin, an inhibitor of stress protein HSP86 which express on mammalian germ cells, weres administered to E8 pregnant mice. E17 embryos were removed, and a quantitative analysis of HSP90-immunoreactive cells in the gonad was performed, in comparison to control embryos.

First, we observed that the number of germ cells is lower in male than in female embryos, as well in control and experimental embryos.

External features of experimental and control embryos did not display any difference. Embryos exposed to geldanamycin exhibit a significant decrease of immunoreactive germ cells. In two embryos, we observed a group of ectopic immunoreactive cells in the pelvic area.

We conclude that geldanamycin inhibits germ cells migration, and suggest that this inhibition can lead to ectopic germ cell populations, similar to teratomas.

Rev Med Brux 2009 ; 30 : 23-7

Key words : mouse, embryo, HSP86, germ cells, geldanamycin

INTRODUCTION

Les protéines de choc thermique (*heat shock proteins*, HSP) sont exprimées ou surexprimées en réponse à divers stress, dont l'hyperthermie^{1,2} et permettent aux cellules de survivre dans des conditions d'environnement défavorables, en prévenant la dénaturation des protéines. Ce sont des protéines hautement conservées présentes dans les organismes depuis les bactéries jusqu'à l'homme. Dans des conditions normales, les HSP agissent comme des "chaperones", qui reconnaissent et stabilisent leurs protéines cibles. La famille de protéines de choc thermique HSP90, hautement conservée au cours de l'évolution, constitue le groupe de protéines de choc le plus abondant dans des conditions d'absence de stress. Elle est présente autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Toutefois, les propriétés spécifiques de ces protéines ont surtout été démontrées chez les eucaryotes "avancés"³. En général, les HSP90 sont associées à d'autres protéines, comme des récepteurs aux stéroïdes, l'actine, la tubuline, ou des kinases. Cependant, par rapport aux autres familles de protéines de choc thermique, les HSP90 présentent des fonctions particulières au cours du développement et de la croissance, car leurs cibles habituelles sont des transducteurs de signal, des régulateurs du cycle cellulaire et des régulateurs du développement⁴. Les mammifères expriment de manière ubiquitaire deux isoformes cytoplasmiques d'HSP90 appelées HSP86 et HSP84 chez la souris⁵, et correspondant à HSP90 α (HSP89 α) et HSP90 β (HSP89 β) dans l'espèce humaine⁶.

Les séquences protéiques de HSP84 et de HSP86 sont hautement conservées au cours de l'évolution, et ont probablement divergé il y a 500 millions d'années, au moment de l'apparition des vertébrés⁵. Chez la souris comme dans l'espèce humaine, HSP86 et ses protéines apparentées sont exprimées en permanence dans la lignée germinale, depuis la formation initiale des gonocytes sur la paroi de la vésicule ombilicale⁷⁻⁹. De surcroît, les tumeurs germinales continuent à exprimer cette protéine¹⁰. Il a été suggéré que les membres de la famille HSP90 pourraient exercer une fonction de protection sur les cellules germinales mâles¹¹.

La geldanamycine est un antibiotique apparenté aux benzoquinones produit par *Saccharomyces hygroscopicus*. Elle agit comme un inhibiteur de la HSP86 par fixation sur l'extrémité N-terminale de la protéine. Elle inhibe la fixation et l'activité de HSP86. Dans son usage thérapeutique expérimental, elle potentialise la réponse de certaines tumeurs à l'irradiation en inactivant l'HSP90¹². L'inactivation par la geldanamycine de l'HSP83 de la drosophile, équivalente de l'HSP86, a permis de révéler de multiples mutations demeurées silencieuses. Il en a été conclu qu'HSP83 préserve la drosophile de mutations pouvant déboucher sur des sauts évolutifs⁴.

L'objet du présent travail est d'analyser les

conséquences de l'administration de geldanamycine à des embryons de souris pendant la migration des cellules germinales.

MATERIEL ET METHODES

Préparation des coupes

Des souris femelles NMRI ont été mises en présence d'un mâle pendant la nuit. Le jour de la constatation de la présence du bouchon vaginal matinal a été considéré comme le jour 0 de la gestation. Les souris gravides ont été sacrifiées au jour 17 par élongation cervicale. Les embryons ont été extraits de l'utérus, observés, dessinés et mesurés à la *camera lucida*. 5 embryons témoins et 5 embryons traités ont été sélectionnés pour une coloration squelettique *in toto* au bleu alcian-sulfate d'alizarine.

Les embryons destinés à l'immunohistochimie ont été fixés pendant 2 heures dans le liquide de Serra (6 volumes d'éthanol, 2 d'acide acétique, 1 de formaldéhyde). Ils ont été déshydratés à l'aide d'éthanol de concentration croissante, puis enrobés dans la paraffine. Les coupes en paraffine de 5 μ m ont été collées sur lame de verre. 18 embryons traités à la geldanamycine (8 mâles et 10 femelles, provenant de 3 portées) et 6 embryons témoins (2 mâles et 4 femelles, provenant de 5 portées) ont été examinés.

Administration de la geldanamycine

Nous basant sur des modèles animaux antérieurs¹², une dose unique de 5 mg a été choisie, après l'observation que le choix initial de 1 mg n'avait aucun effet significatif. 17 femelles gestantes ont reçu au 8^{ème} jour une dose unique de 5 mg de geldanamycine en suspension dans l'huile de sésame. 81 embryons issus de mères traitées ont été prélevés, tandis que 41 embryons témoins ont été prélevés. Le stade de 8 jours a été choisi car il correspond à la migration des cellules germinales.

Immunohistochimie

L'étude immunohistochimique reposait sur la méthode avidine-biotine-peroxydase (*Vectastain Elite ABC kit*, Vector Laboratories, CA, USA). Les coupes en paraffine ont été réhydratées à l'aide de concentrations descendantes d'éthanol préalablement à la coloration.

L'activité peroxydase endogène a été bloquée par incubation dans du méthanol contenant 0,3 % d'H₂O₂ pendant 30 minutes. Après lavage dans du PBS 0.01 M, les coupes ont été incubées dans du sérum de chèvre à 10 % en vue de bloquer les sites de fixation non spécifiques. Cette étape a été suivie par l'incubation à l'aide d'un anticorps spécifique polyclonal de lapin anti-HSP86 (*Affinity BioReagent, Inc.*, CO, USA) dilué à 1/100 dans le sérum normal de chèvre.

L'incubation a duré toute la nuit à température de laboratoire.

Les coupes ont ensuite été lavées au PBS et incubées pendant 30 minutes avec un anticorps de chèvre anti-lapin (IgG *IHS select*, Chemicon, Temecula, Ca, USA) biotinylé. Après rinçage au PBS, les coupes ont été incubées avec le complexe ABC durant 30 minutes. Après un nouveau lavage, les coupes ont été incubées en présence du substrat peroxydase (*DAB substrate kit*, Vector Laboratories, CA, USA). Finalement, les coupes ont été rincées à l'eau, déshydratées et montées en DPX®.

Les coupes contrôles ont été traitées sans l'anticorps primaire ; certains contrôles ont été effectués en remplaçant l'anticorps primaire par du sérum de lapin. Les contrôles positifs ont été considérés comme satisfaisants dès lors que les fixations tissulaires spécifiques connues de l'HSP86 furent observées, en l'absence de tout marquage non spécifique. De surcroît, les anticorps utilisés ont déjà été validés dans des publications antérieures^{8,13}. Des coupes alternées ont été consacrées à l'histochimie "classique" (pyronine-vert de méthyle selon Unna-Brachet⁸, Giemsa).

Quantification de la fixation

La quantification des cellules germinales HSP86 positives s'est réalisée dans les gonades des embryons traités et des témoins. Trois coupes adjacentes de 5 µm ont été utilisées. Les quantifications ont été réalisées sur les gonades gauches et droites. Le stade choisi était le jour 17. Chaque coupe a été placée sous une caméra CCD (Higekami). Un boîtier (Data Translation 2871) a envoyé l'image digitalisée vers un moniteur, pour le contrôle visuel, et à l'ordinateur pour le traitement des données. Les données ont été analysées grâce au programme *image color-Windows/DT*. Pour chaque mesure, la moyenne et la déviation standard à la moyenne ont été établies. Le nombre de "taches", appelés objets, et la surface totale marquée au sein du champ ont été déterminés par le programme. Les statistiques ont été réalisées grâce au test de Mann Whitney.

RESULTATS

L'examen externe des embryons, l'analyse de leur squelette, ainsi que les mensurations ne permettent pas d'observer la moindre différence significative entre les embryons témoins et les traités.

L'immunoréactivité des gonocytes apparaît très homogène et siège dans le cytoplasme, ainsi qu'il avait été observé dans des travaux antérieurs⁸.

La comparaison entre le nombre d'objets marqués dans les gonades gauche et droite chez les mêmes embryons ne montre pas de différence significative. Les embryons femelles des populations témoins et expérimentales montrent davantage de gonocytes positifs que les mâles ($p = 0.0047$ pour la surface marquée) (figure 1). Chez les embryons expérimentaux, les gonocytes marqués apparaissent nettement moins nombreux que chez les témoins

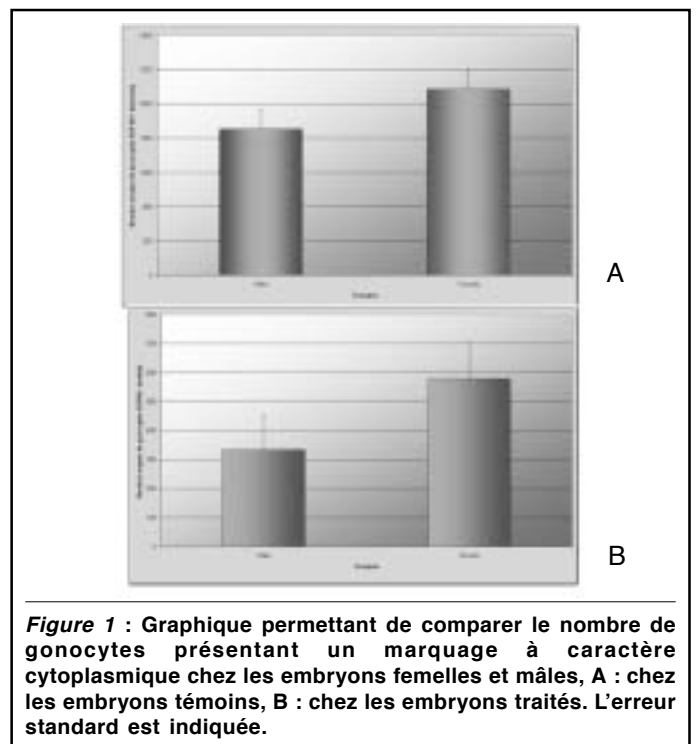


Figure 1 : Graphique permettant de comparer le nombre de gonocytes présentant un marquage à caractère cytoplasmique chez les embryons femelles et mâles, A : chez les embryons témoins, B : chez les embryons traités. L'erreur standard est indiquée.

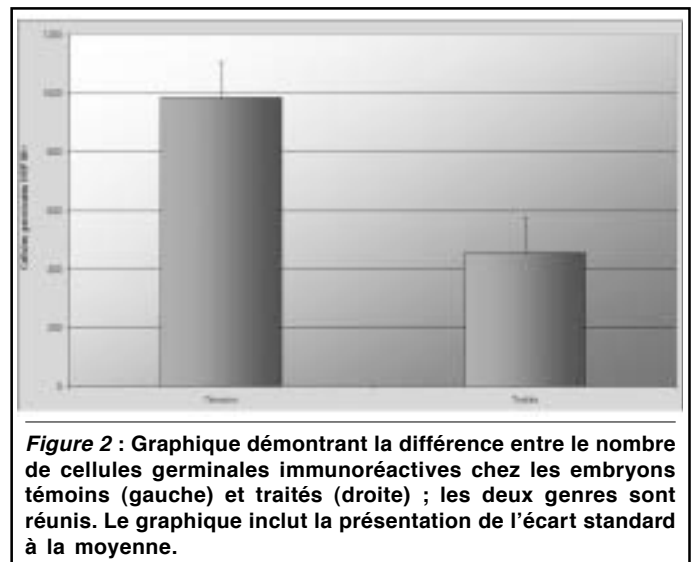


Figure 2 : Graphique démontrant la différence entre le nombre de cellules germinales immunoréactives chez les embryons témoins (gauche) et traités (droite) ; les deux genres sont réunis. Le graphique inclut la présentation de l'écart standard à la moyenne.

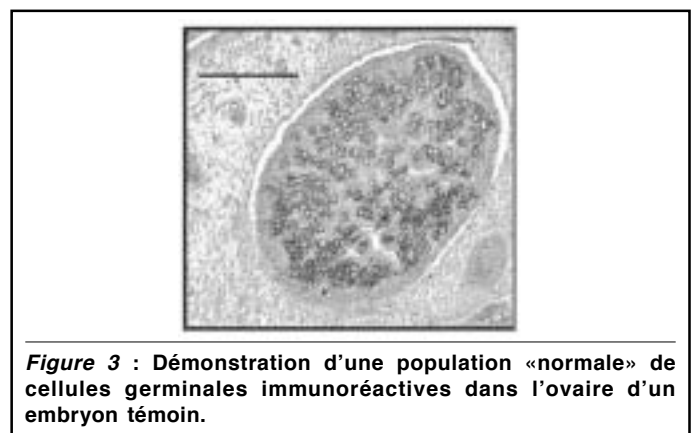


Figure 3 : Démonstration d'une population «normale» de cellules germinales immunoréactives dans l'ovaire d'un embryon témoin.

($p = 0.003$ pour le nombre d'objets marqués, 0.0047 pour la surface totale), et ceci dans les deux sexes (figures 2 à 5). D'un point de vue morphologique, les cellules germinales apparaissent surtout raréfiées dans la partie profonde de la gonade (figures 4 et 5).

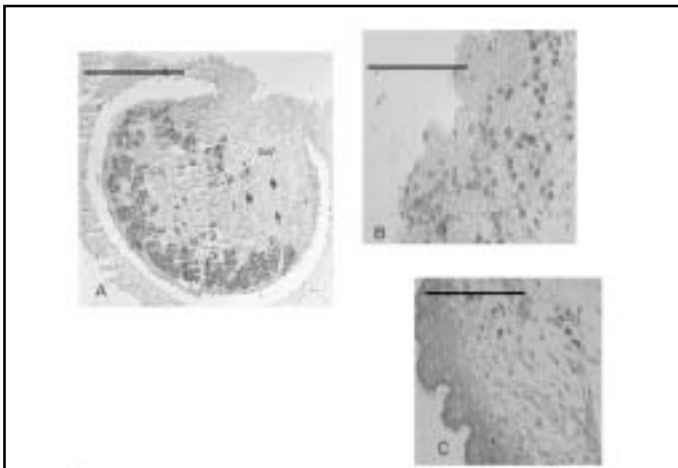


Figure 4 : Embryon femelle expérimental. A : réduction du nombre de cellules immunoréactives dans l'ovaire (se référer à la quantification de la figure 2) ; B : démonstration d'une population de cellules immunoréactives ectopiques dans la région pelvienne ; C : coloration classique à la pyronine-vert de méthyle de la même région.

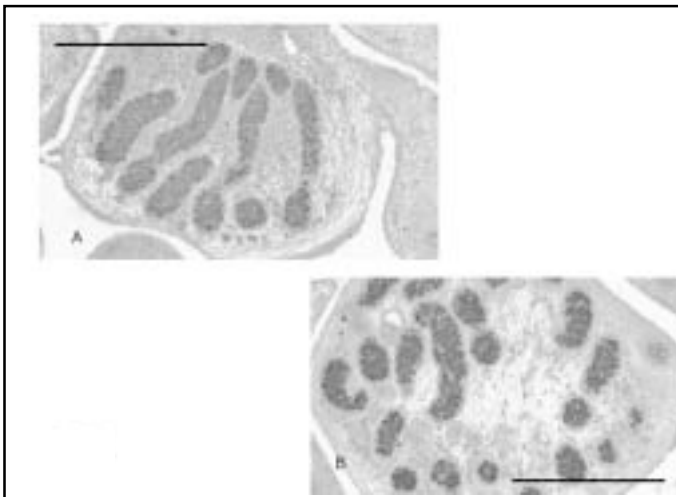


Figure 5 : A : testicule d'un embryon témoin ; B : testicule d'un embryon témoin démontrant la présence d'une zone de raréfaction cellulaire centrale dans la médullaire de la glande, et s'accompagnant d'une réduction quantitative de cellules lors du comptage électronique. Echelle : 100 µm.

Les coupes y révèlent la présence d'une sorte de tissu conjonctif non spécifique, assez lâche. Chez deux embryons expérimentaux (un mâle et une femelle), un groupe de cellules intensément marquées était visible sous l'ectoderme de la région pelvienne (figure 4). Ces cellules présentaient des caractéristiques morphologiques qui les rapprochaient des gonocytes.

DISCUSSION

Des travaux convergents postulent que l'HSP90 peut protéger les espèces contre l'expression de mutations "silencieuses"^{4,14,15}. Chez les mammifères, la protéine s'exprime de manière permanente dans la lignée germinale⁷⁻⁹. Chez la drosophile, l'inactivation de l'HSP90 mène à l'expression phénotypique de mutations cachées⁴. A l'aide de geldanamycine, un inhibiteur de l'expression et de l'activation de l'HSP90, on observe une réduction significative du nombre de gonocytes HSP86 immunoréactifs dans les gonades

des embryons de souris, et, dans quelques cas, la présence de cellules positives ectopiques dans la région pelvienne, évoquant les tératomes connus en pathologie humaine, qui peuvent se développer dans la même région. Ce type de lésions est classiquement considéré comme produit par des cellules germinales indifférenciées et/ou égarées. Elles peuvent résulter expérimentalement d'une injection de cellules-souches chez l'adulte¹⁶. Ces cellules-souches peuvent être obtenues à partir de la lignée germinale¹⁷. De surcroît, HSP90 s'exprime dans les tumeurs germinales humaines¹⁰.

Il a été supposé que HSP90 a la capacité d'assurer la stabilité de la lignée germinale⁸. Les présentes données sont en faveur de l'hypothèse qu'elle pourrait également jouer un rôle dans leur migration et leur différenciation. Il appartiendra à d'autres travaux de vérifier cette hypothèse.

Des investigations complémentaires devraient être menées, et comporter une analyse quantitative et séquentielle de la migration des cellules germinales, après administration de geldanamycine à différents stades, en comparant les résultats obtenus.

BIBLIOGRAPHIE

1. Welch WJ : How cells respond to stress. *Sci Am* 1993 ; 268 : 34-41
2. Alexandrov VY : Function : aspects of cell response to heat shock. *Int Rev Cytol* 1994 ; 148 : 171-227
3. Buchner J : Supervising the fold : functional principles of molecular chaperones. *FASEB J* 1996 ; 10 : 10-9
4. Rutherford S, Linquist S : HSP90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 1998 ; 396 : 336-42
5. Moore SK, Kozak C, Robinson EA, Ullrich SJ, Appela E : Murine 86- and 84-kDa heat shock proteins, cDNA sequences, chromosome assignments, and evolutionary origins. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 5343-51
6. Rebbe NF, Hickman WS, Ley TJ, Stafford DW, Hickman S : Nucleotide sequence and regulation of a human 90-kDa heat shock protein gene. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 15006-11
7. Ohsako S, Bunick D, Hayashi Y : Immunohistochemical observation of the 90 KD heat shock protein (HSP90) : high expression in primordial and pre-meiotic germ cells of male and female rat gonads. *J Histochem Cytochem* 1995 ; 43 : 67-76
8. Vanmuylder N, Werry-Huet A, Rooze M, Louryan S : Heat shock protein HSP86 expression during mouse embryo development, especially in the germ line. *Anat Embryo* 2002 ; 205 : 301-6
9. Louryan S, Vanmuylder N, Lambot MA, Rooze M : HSP86 : un rôle dans l'évolution humaine ? *Anthropologia et Praehistorica* 2003 ; 114 : 1-5
10. Vanmuylder N, Lambot MA, Rooze M, Noël JC, Louryan S : HSP86, cellules germinales et yolk sac tumor. *Ann Pathol* 2004 ; 24 : 473-5
11. Biggiogera M, Tanguay RM, Marin R, Wu Y, Martin TE, Fakan S : Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells : an immunoelectron microscopical study. *Exp Cell Res* 1996 ; 229 : 77-85

12. Bisht KS, Bradbury M, Mattson D *et al.* : Geldanamycin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiate the *in vitro* and *in vivo* radiation response of cervical tumor cells via the heat shock protein 90-mediated intracellular signaling and cytotoxicity. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 8984-5
13. Perdrew GH, Hord N, Hollenback CE, Welch M : Localization and characterization of the 86-and 84-kDa heat shock proteins in Hepa 1c1c7 cells. *Exp Cell Res* 1993 ; 209 : 350-6
14. Rutherford SL : Between genotype and phenotype : protein chaperones and evolvability. *Nat Rev Genet* 2003 ; 4 : 263-74
15. Rutherford S, Knapp JR, Csermely P : HSP90 and developmental networks. *Adv Exp Med Biol* 2007 ; 594 : 190-7
16. Wakitani S, Takaoka K, Taori T *et al.* : Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint forms teratomas and subsequently destroys the joint. *Rheumatology* 2003 ; 42 : 162-5
17. Durcova-Hills G, Ainscough JFX, McLaren A : Pluripotential stem cells derived from migrating primordial germ cells. *Differentiation* 2001 ; 68 : 220-6

Correspondance et tirés à part :

S. LOURYAN
Faculté de Médecine U.L.B.
Laboratoire d'Anatomie, Biomécanique et Organogénèse
Route de Lennik 808 CP 619
1070 Bruxelles
E-mail : slouryan@ulb.ac.be

Travail reçu le 28 juillet 2008 ; accepté dans sa version définitive le 10 septembre 2008.