

Histoire d'un morphogène nommé decapentaplegic (dpp)

Les avatars du concept de gradient de morphogène sont très révélateurs des évolutions de la biologie du développement. Les expériences de décapitation et de régénération d'annélides réalisées par T.H. Morgan à la fin du XIX^e siècle lui suggérèrent l'idée « d'une sorte de chose plus ou moins abondante dans les différentes parties de l'organisme [qui] concerne ce qui relève de l'organisation proprement dite du ver ». Voici sans doute la première formulation de la notion de gradient. Mais il fallut attendre surtout Lewis Wolpert en 1969 et son énoncé du concept d'information de position pour que, d'une simple observation, le gradient de morphogène se transforme en principe explicatif global des mécanismes de développement [1]. Wolpert proposa l'existence de substances produites localement et distribuées en gradient continu autour d'une source. Selon cette hypothèse, les cellules perçoivent des seuils de concentration leur indiquant la distance qui les sépare de la source. Un gradient continu d'une molécule donne ainsi naissance à plusieurs domaines chacun caractérisé par une identité cellulaire précise.

De multiples exemples de gradients de morphogènes se sont accumulés depuis, chez le xénope (Activine), le poulet (Sonic-hedgehog) et la drosophile [2]. Parmi les meilleurs figures de la génétique, un orthologue de BMP4 (*bone morphogenetic protein*) chez la drosophile, dont les propriétés organisatrices ont été particulièrement étudiées au cours du développement de l'aile [3-5]. Le précurseur de l'aile adulte, le disque imaginal, forme un épithélium plan séparé en deux entités polyclonales non miscibles, les compartiments antérieur (A) et postérieur (P) de l'aile (figure 1A). À leur

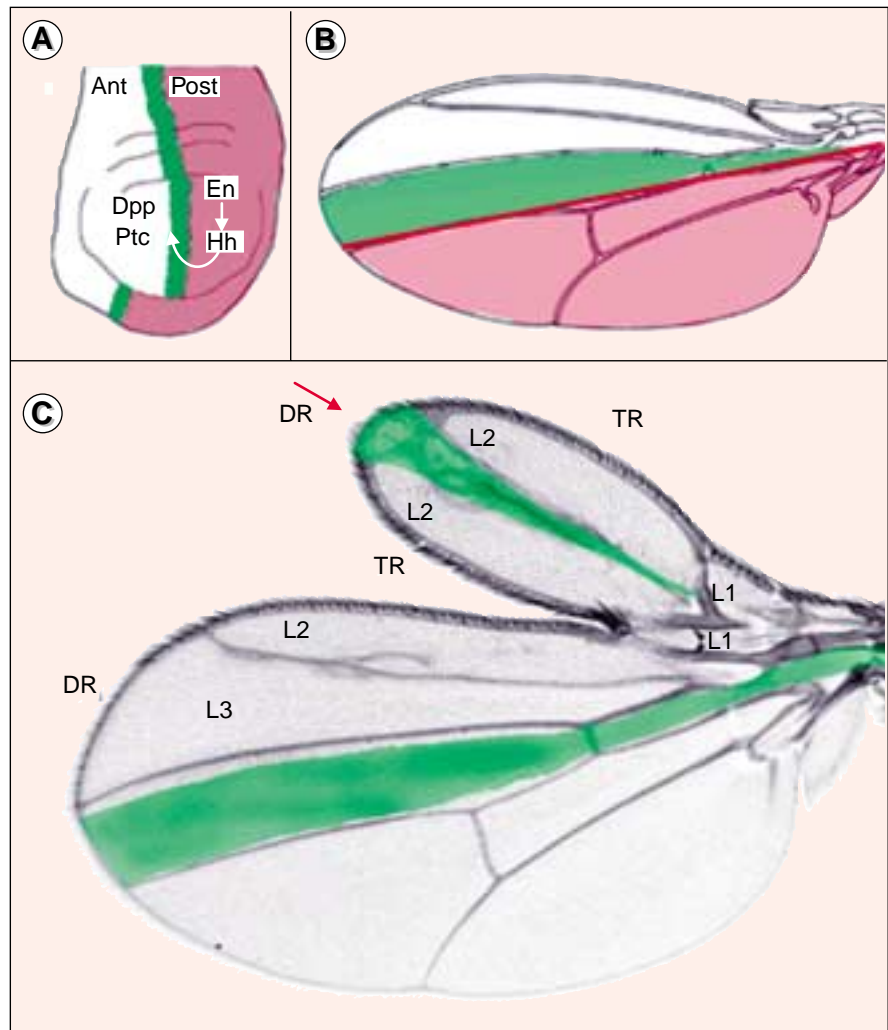


Figure 1. Développement de l'aile de drosophile. **A.** Disque imaginal de l'aile de drosophile illustrant l'existence de deux populations de cellules non miscibles, les compartiments antérieur (Ant) et postérieur (Post, en violet, caractérisé par l'expression de Engrailed -En). À la frontière entre ces deux compartiments, le facteur de croissance Hedgehog (Hh) induit l'expression de Dpp dans une fine rangée de cellules (vertes) par l'intermédiaire de son récepteur Patched (Ptc). **B.** Correspondance de ces différents territoires dans l'aile adulte. La ligne rouge montre la frontière entre les deux compartiments. Dpp (vert) est exprimé selon une ligne de quasi-symétrie au milieu de l'aile. **C.** Un clone de cellules exprimant Dpp (vert) de façon ectopique (flèche), induit une duplication de l'axe antéro-postérieur de façon non autonome.

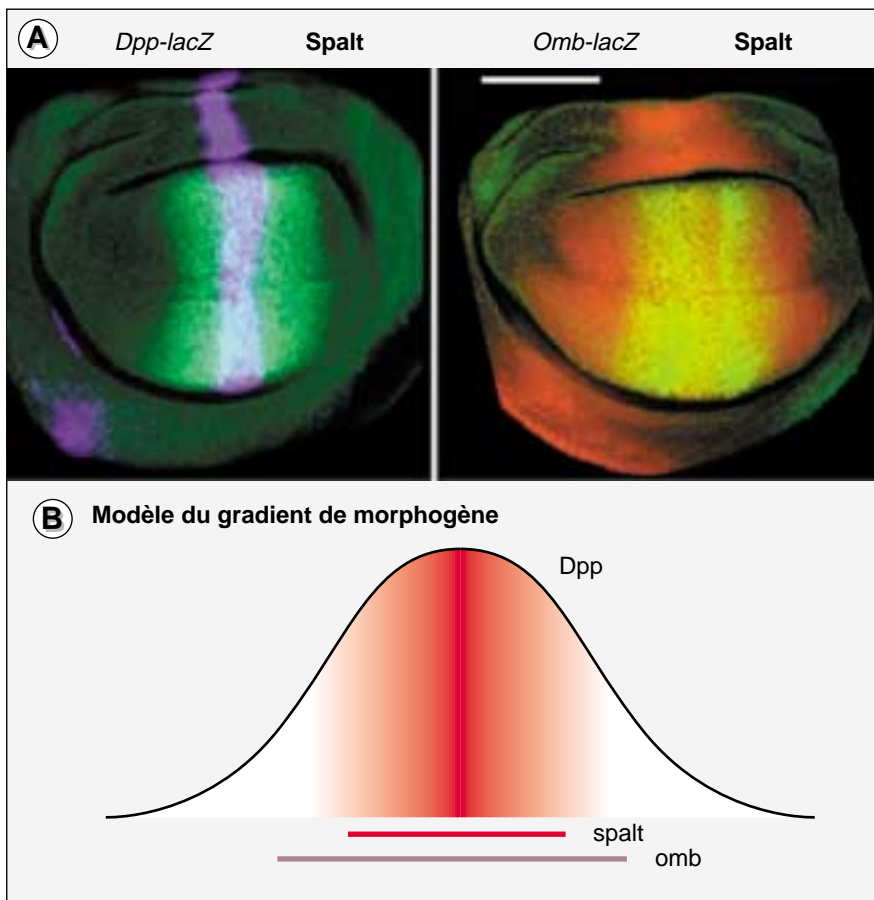


Figure 2. **Expression de *dpp*, *spalt* et *omb* dans un disque imaginal.** **A.** Les domaines d'expression sont indiqués en bleu pour *dpp* et, concernant les gènes cibles, en vert pour *spalt* et en rouge pour *omb*. Noter que *spalt* et *omb* sont exprimés dans des domaines symétriques autour de la source de *Dpp* et qu'*omb* est exprimé à plus grande distance (droite). Échelle: 50 μ m. **B.** Modèle du gradient de morphogène illustrant le mode d'action à distance de *Dpp*. Différentes concentrations de *Dpp* activent *spalt* et *omb* dans des domaines distincts.

interface, les cellules du compartiment P sécrètent le facteur de croissance Hedgehog et induisent localement l'expression de *Dpp* dans les cellules du compartiment A situées à proximité du compartiment P. Cependant *Dpp* contrôle à distance l'identité de presque toutes les cellules du disque imaginal [3]. *Dpp* agit de façon non autonome (figure 1C). Deux expériences ont permis de distinguer entre les alternatives: (1) *Dpp* agit directement à distance par transport ou diffusion et en activant son récepteur et le signal en aval; (2) *Dpp* agit indirectement en activant localement un ou plusieurs signaux relais fonctionnant à distance. La voie de signali-

sation de *Dpp* (voir plus loin), son récepteur *Tkv* (*Thick-veins*), et *Mad* (*Mothers-against-Dpp*), qui relaie le signal en aval vers le noyau, sont activés à distance et nécessaires de façon continue pour maintenir l'identité des cellules de l'aile et leur prolifération [4-6]. *Dpp* induit et maintient à distance par l'intermédiaire de *Tkv* et *Mad* l'expression de deux gènes cibles, *spalt* (*sal*) et *optomotor-blind* (*omb*). Ces deux gènes sont exprimés symétriquement de part et d'autre du domaine d'expression de *dpp*, *omb* étant dans un domaine plus large que *sal* (figure 2A). Par ailleurs, l'expression d'une forme constitutivement active du récepteur *Tkv* (*Tkv**) n'a

d'effet sur l'induction de *sal* et *omb* que dans ces cellules, excluant la possibilité d'un signal relais propageant l'action locale de *Dpp* [4, 5]. L'action organisatrice à distance de *Dpp* est donc directe et continue. De plus, *omb* est induit pour une plus faible concentration de *Dpp* que *sal* [4, 5, 7] (figure 2B). *omb* semble donc exprimé dans un domaine plus large que *sal* parce qu'à grande distance de la source de *Dpp* (40-50 μ m), la concentration de *Dpp* est trop faible pour induire *sal* mais suffisante pour induire *omb*. Plus proche de la source, et donc d'une plus forte concentration de *Dpp*, *omb* et *sal* sont induits. L'existence d'un gradient d'activité à distance de *Dpp* est donc plutôt convaincante (figure 2B).

Notons que nous avons observé qu'une protéine de fusion *DppGFP* peut être détectée à distance dans des cellules exprimant *sal* et *omb*, suggérant encore l'existence matérielle d'un gradient de concentration. Toutefois, l'observation directe de *Dpp* à distance à l'aide d'un anticorps et *a fortiori* celle d'un gradient demeure sans succès.

Si les preuves de l'existence d'un gradient d'activité et/ou de concentration sont fort convaincantes, il demeure important de comprendre comment les cellules y répondent: (1) comment le gradient de concentration est-il transformé en gradient d'activité lequel, ultimement, contrôle l'identité cellulaire? (2) avec quelle précision les cellules perçoivent-elles la concentration locale de *Dpp* et l'activité qui en résulte? (3) comment les seuils d'activation sont-ils définis? (4) comment l'étendue d'action du gradient est-elle enfin contrôlée?

Trois articles récents éclairent ces questions en mettant en évidence, chez la drosophile, un nouveau gène, *brinker* (*brk*), qui contrôle l'activité de *Dpp* à distance et contribue à la formation du gradient d'activité proprement dit [8-10].

brinker* antagonise l'action organisatrice de *dpp

brinker fut tout d'abord mis en évidence par le phénotype embryonnaire du mutant correspondant. Un

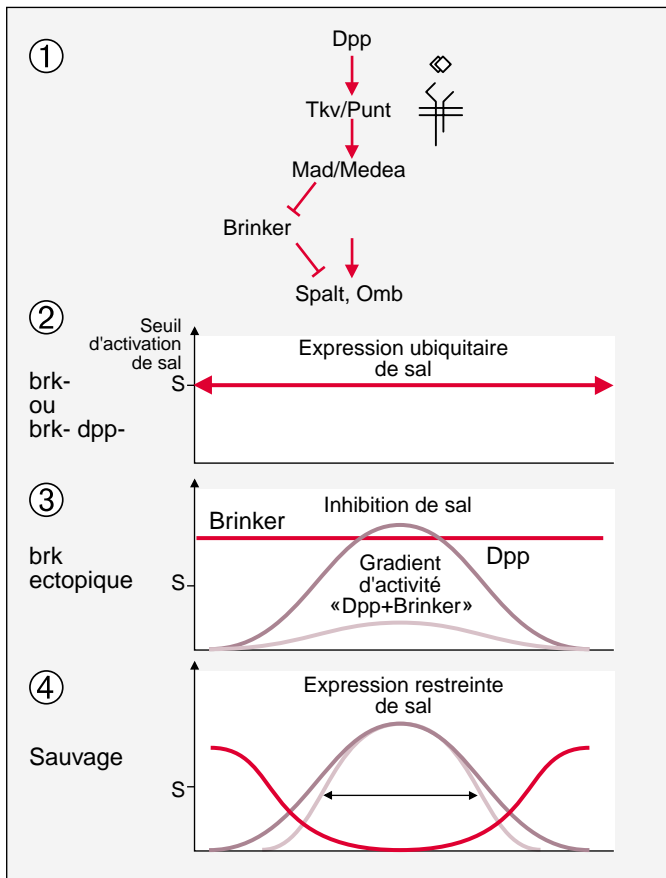


Figure 3. Voie de transduction du signal Dpp (1). Le dimère Dpp se lie à un récepteur hétérodimérique Punt/Thick-veins, activant Mad et Medea qui transfèrent le signal vers le noyau. Dpp inhibe, par l'intermédiaire de Mad, l'expression de brinker au centre du disque imaginal. Brinker réprime l'expression de sal et omb. Le signal Dpp active également directement sal. (2-4) L'action combinée de Dpp et Brinker contrôle l'étendue du domaine

n'expriment pas non plus *dpp* de façon ectopique. *brinker* se comporte donc bien comme un inhibiteur de l'action à distance de *dpp* dans les parties latérales du disque.

Une étude plus détaillée comparant l'effet de *tkv** et de la mutation *brinker* sur les gènes cibles de *dpp*, *spalt* et *omb* confirme et affine cette conclusion. Des clones de cellules mutantes pour *brinker* expriment de façon ectopique *sal* et *omb* lorsqu'ils sont situés au-delà de leurs domaines d'expression naturels, mais il existe un territoire critique dans lequel cela est possible, alors qu'il n'existe aucune restriction en ce qui concerne *tkv**. *brinker* semble donc moduler subtilement l'action de *dpp* à distance. La manifestation la plus remarquable de cet effet est le phénotype causé par une mutation hypomorphe de *brinker* dans lesquels les disques peuvent être observés: ils ressemblent très curieusement à des disques dans lesquels *dpp* est exprimé de façon ubiquitaire, c'est-à-dire dans lesquels il n'existe plus de source locale de Dpp et *a fortiori* de gradient de Dpp [8] (figure 3).

Un gradient de Brinker atténue l'activation constitutive de *sal* et *omb* et contrôle l'étendue de leurs domaines d'expression

Comment *brinker* contrôle-t-il l'étendue du domaine d'action de *dpp* et son action en gradient?

Les auteurs démontrent que *brinker* n'est pas un simple inhibiteur de *thick-veins* ou de *mad* et donc un atténuateur directe de la voie de signalisation de Dpp: il est en effet possible que Brinker antagonise la liaison de Dpp à Tkv ou l'activation de Mad. Une hypothèse alternative serait que *brk* agisse en parallèle et que l'antagonisme se situe directement au niveau de l'activation de *sal* et *omb*. Or des cellules mutantes simultanément pour *brinker* et *mad* ou *brinker* et *thick-veins* sont indistinguables de cellules simplement mutantes pour *brinker*. Plus extraordinairement encore, dans un disque mutant pour *dpp* et *brinker*, *sal* est exprimé de façon quasi ubiquitaire alors qu'un disque simplement mutant pour *dpp* ne prolifère pas et n'exprime ni *sal* ni *omb*. Ce résultat change fondamentalement la façon

d'expression de sal. (2) Situation par défaut, en l'absence de Brk et de Dpp, sal est exprimé de façon ubiquitaire (flèche noire). (3) L'expression ubiquitaire de Brk (rouge) antagonise le gradient de Dpp (bistre foncé) et inhibe sal en tout point car le gradient d'activité combiné de Dpp et Brinker (bistre clair) se situe en dessous du seuil d'activation S de sal. (4) L'action cumulée de Dpp et Brinker crée un gradient d'activité combiné (bistre clair) dont la pente locale plus raide permet de mieux positionner dans l'espace le seuil d'activation de sal. En conséquence, sal est exprimé dans un domaine restreint au centre du disque imaginal.

allèle nul de *brinker* est léthal et dorsalise la cuticule de l'embryon [9]. Ce phénotype est analogue à celui causé par l'expression ectopique de *dpp* dans la partie ventrale de l'embryon. Puisque *dpp* est normalement exprimé dorsalement, *brinker* semble donc nécessaire pour limiter l'activité dorsalisante de *dpp*. L'analyse du développement de l'aile a permis de détailler cet apparent antagonisme entre *dpp* et *brinker*. L'induction de clones de cellules mutantes pour un allèle amorphe de *brk* suggère une conclusion semblable. Des clones induits au centre du disque, à proximité de la source de Dpp, n'entraînent aucune

anomalie dans l'aile. En revanche, s'ils sont situés plus à distance, ces clones provoquent une duplication de l'axe antéro-postérieur, c'est-à-dire: (1) une excroissance et (2) la duplication de certaines veines normalement situées plus près de la source de Dpp. Cet effet est purement autonome, c'est-à-dire qu'il ne concerne que les cellules mutantes pour *brinker* et non les cellules voisines du clone. Cela contraste avec l'effet non autonome de *dpp* [3] (figure 1C) mais ressemble à l'activation constitutive de la voie de signalisation de *dpp* dans un clone exprimant le récepteur *tkv** [4, 5]. Ces cellules mutantes pour *brinker*

d'envisager l'action morphogénétique de *dpp* puisqu'il suggère que l'expression de *sal* et d'*omb* est un état par défaut en l'absence de *dpp* et de *brinker*. En d'autres termes, les domaines d'expression de *sal* et d'*omb* sont contrôlés indirectement par *dpp* par l'intermédiaire de *brinker*.

Tout devient presque limpide lorsque l'on découvre le domaine d'expression de *brinker*. Il est restreint aux parties latérales du disque et est parfaitement complémentaire de celui d'*omb*. Plus finement Brk forme un gradient opposé à Dpp, le niveau d'expression s'atténuant en s'approchant du centre du disque (figure 3). L'inhibition est maximale dans les parties les plus latérales du disque où ni *sal* ni *omb* ne sont exprimés, et est minimale au centre où tous deux sont exprimés. Si le gradient de *brinker* est supprimé en forçant son expression ubiquitaire au centre du disque, *sal* et *omb* sont inhibés comme si Dpp avait disparu [9] (figure 3).

brk code pour une protéine de 704 acides aminés ne montrant d'homologie avec aucune protéine connue. Les auteurs décrivent un site potentiel de localisation nucléaire et Brinker est détecté dans le noyau [8]. De plus, certains algorithmes révèlent des motifs structuraux conservés : un motif hélice-tour-hélice (HTH) comme on en trouve dans tous les facteurs de transcription à homéoboîte est situé ici en position amino-terminale ; l'existence d'un groupe d'acides aminés négativement chargés suggère qu'il pourrait aussi s'agir d'un répresseur de transcription comme son activité cellule-autonome l'indique. Ces caractéristiques indiqueraient aussi que Brk contrôle directement la transcription de *sal* et *omb*.

Établissement de seuils d'activation par l'action antagoniste de *dpp* et *brinker*

La question-clé devient alors la suivante : comment le gradient de *brinker* est-il formé de sorte qu'un gradient d'activité permette l'expression différentielle de *sal* et *omb*? Les auteurs apportent certains éléments très nouveaux sans pouvoir y répondre totalement. Ils s'accordent sur deux points : (1) Dpp réprime

l'expression de *brinker* au centre du disque et repousse son domaine d'expression dans les parties plus latérales du disque. L'expression de *brinker* semble alors en gradient (figure 3); (2) l'action directe de Dpp s'ajoute à celle de *brinker* pour contrôler le niveau d'expression de *sal*. En effet, *sal* est exprimé dans des cellules mutantes pour *brk* et *mad* ou *thick-veins*, mais à un niveau moindre que dans des cellules sauvages au centre du disque où *dpp* est exprimé en l'absence de *brinker*, ou comme dans des cellules exprimant *tkv**. Le modèle proposé par les auteurs est le suivant (figure 3) : (1) *sal* et *omb* sont induits par un activateur ubiquitaire inconnu en l'absence de *brinker* et *dpp*; (2) Dpp crée un gradient opposé à celui de Brinker; (3) à l'action inhibitrice et graduelle de Brinker s'ajoute l'action activatrice de Dpp sur *sal* et peut-être *omb*. Ce modèle explique bien comment cela permet de mieux contrôler la formation d'un seuil d'activation de *sal* à distance car la diminution de la concentration locale de Dpp conjointe à l'augmentation de celle de Brinker « raidit » la courbe d'activité localement. Comment ce seuil est-il positionné de façon stable? Puisque *dpp* réprime l'action inhibitrice de *brinker*, comment y a-t-il équilibre pour que ni Dpp ni Brinker ne l'emporte, excluant ainsi de trop restreindre le gradient de Dpp ou de laisser Dpp inonder son champ d'action? Une question analogue peut formellement être posée en ce qui concerne *dpp* et *tkv* [7, 11], *dpp* réprimant l'action inhibitrice de *tkv* sur la diffusion ou le transport de Dpp. Il est possible qu'un dosage fin de la régulation de ces gènes explique comment ce point d'équilibre s'établit. Cela semble toutefois peu probable étant donné que le système tolère très bien l'hétérozygotie pour *dpp*, *brinker* ou *thick-veins*. On admettra pour l'heure que cette question demeure sans réponse.

***brinker* inhibe l'activité de BMP4 chez le xénope**

Minami *et al.* [10] sont allés plus loin en étudiant la fonction de *brinker* chez le xénope. Bien qu'ils utilisent

pour cela le gène de drosophile, il est remarquable que *brinker* inhibe l'action ventralisante de BMP4 dans ce nouveau contexte biologique. BMP4, l'orthologue de Dpp chez le xénope, contrôle la formation du mésoderme ventral et de l'ectoderme. En effet, l'inhibition de BMP4 au cours de la gastrulation dorsalise le mésoderme et neuralise l'ectoderme. Or l'injection ventrale d'ARNm de *brinker* produit un effet semblable. De plus, alors que l'injection d'ARN messagers de *BMP4* ventralise la gastrula, la co-injection d'ARNm de *brinker* et de *BMP4* n'a qu'un effet très modeste sur le développement du xénope.

La conservation de l'activité de *brinker* chez la drosophile et le xénope suggère que *brinker* est un gène conservé et définit une nouvelle famille d'inhibiteurs de BMP à côté de Noggin, Chordine et Follistatine [12].

Conclusions

Pourquoi la nature fait-elle les choses aussi compliquées, au point d'avoir « dénaturé » la notion simple (ou simpliste) d'un gradient de morphogène capable, à lui seul, de contrôler l'identité des cellules à distance? Les cas de « co-morphogènes » et d'antagonistes sont de plus en plus nombreux. On peut ranger ces derniers en deux grandes catégories. Les inhibiteurs d'activité et les facteurs limitant la diffusion ou le transport à distance. Pour en citer quelques-uns, rappelons Chordine, antagoniste de BMP4 par la formation d'un hétérodimère extracellulaire inactif [13]; Frzb antagoniste de Wnt8 chez le xénope par compétition avec le récepteur membranaire Frz [14, 15]; Patched, récepteur de Hedgehog, inhibiteur constitutif de la voie de signalisation de Hh, ou encore Brinker, comme on l'a vu, antagoniste de Dpp. Notons aussi que les récepteurs de Hedgehog (Patched) et de Dpp (Thick-veins) semblent contrôler l'étendue des domaines d'action de leur ligand : Hedgehog induit son récepteur à fort niveau, ce qui limite son étendue d'action à quelques cellules [16]; mais Dpp réprime *tkv* ce qui permet son action à plus grande distance [7, 11]. Notons que Patched

est à la fois un inhibiteur d'activité et limite l'étendue d'action de Hh. Cette double fonction permet de limiter le domaine d'activité de Hh à une fine rangée de cellules à la frontière des compartiments des disques imaginaires.

À côté de ces antagonistes il existe des agonistes, servant souvent une fonction partiellement redondante avec le morphogène principal. Ils contribuent plus subtilement sans doute à affiner la position des seuils d'activation des cibles : ainsi, 60A contribue à augmenter l'action de Dpp à distance en permettant l'expression de *omb* à plus haut niveau à distance de la source [11]. Dans l'embryon de drosophile, Hunchback et Bicoid ont un action synergique pour l'activation zygotique de *hunchback* [17]. De même, Bicoid et Caudal coopèrent pour l'activation des gènes *gap* postérieurs *giant* et *knirps* [18] et une répression réciproque entre gènes *gap* affine l'action des activateurs (pour revue voir [19]). De futurs travaux renforceront certainement l'idée de collaboration entre morphogènes activateurs et répresseurs. Ces trois articles nous suggèrent que cela permet de définir des seuils d'activation plus précisément quand la distribution trop plate du morphogène rendrait cela difficile. On peut spéculer

sur un autre aspect du problème. La collaboration entre morphogènes ne permet-elle pas aussi une réponse plus fiable à une échelle où l'évolution sélectionne la reproductibilité d'un résultat? ■

RÉFÉRENCES

1. Wolpert L. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theoret Biol* 1969; 25: 1-47.
2. Neumann C, Cohen SM. Morphogens and pattern formation. *Bioessays* 1997; 19: 721-9.
3. Zecca M, Basler K, Struhl G. Sequential organizing activities of *engrailed*, *hedgehog* and *decapentaplegic* in the Drosophila wing. *Development* 1995; 121: 2265-78.
4. Lecuit T, Brook WJ, Ng M, Calleja M, Sun H, Cohen SM. Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the Drosophila wing. *Nature* 1996; 381: 387-93.
5. Nellen D, Burke R, Struhl G, Basler K. Direct and long-range action of a Dpp morphogen gradient. *Cell* 1996; 85: 357-68.
6. Burke R, Basler K. Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing Drosophila wing. *Development* 1996; 122: 2261-9.
7. Lecuit T, Cohen SM. Dpp receptor levels contribute to shaping the Dpp morphogen gradient in the Drosophila wing imaginal disc. *Development* 1998; 125: 4901-7.
8. Campbell G, Tomlinson A. Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of Drosophila: regulation of Dpp targets by *brinker*. *Cell* 1999; 96: 553-62.
9. Jazwinska A, Kirov N, Wieschaus E, Roth S, Rushlow C. The Drosophila gene *brinker* reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. *Cell* 1999; 96: 563-73.

10. Minami M, Kinoshita N, Kamoshida Y, Tanimoto H, Tabata T. *brinker* is a target of Dpp in Drosophila that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature* 1999; 398: 242-6.

11. Haerry TE, Khalsa O, O'Connor MB, Wharton KA. Synergistic signaling by two BMP ligands through the SAX and TKV receptors controls wing growth and patterning in Drosophila. *Development* 1998; 125: 3977-87.

12. Graff JM. Embryonic patterning: to BMP or not to BMP, that is the question. *Cell* 1997; 89: 171-4.

13. Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, De Robertis EM. Regulation of neural induction by the Chd and BMP4 antagonist patterning signals in Xenopus. *Nature* 1995; 377: 757.

14. Leyns L, Bouwmeester T, Kim S-H, Piccolo S, De Robertis EM. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the spemann organizer. *Cell* 1997; 88: 747-56.

15. Wang S, Krinks M, Lin K, Luyten FP, Moos MJ. Frzb, a secreted protein expressed in the spemann organizer, binds and inhibits wnt-8. *Cell* 1997; 88: 757-66.

16. Chen Y, Struhl G. Dual roles for Patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 1996; 87: 553-63.

17. Simpson-Brose M, TJ Desplan C. Synergy between the hunchback and bicoid morphogens is required for anterior patterning in Drosophila. *Cell* 1994; 78: 855-65.

18. Rivera-Pomar R, Lu XG, Perrimon N, Taubert H, Jackle H. Activation of posterior gap gene expression in the Drosophila blastoderm. *Nature* 1995; 376: 253-6.

19. Rivera-Pomar R, Jackle H. From gradients to stripes in Drosophila embryogenesis: filling in the gaps. *Trends Genet* 1996; 12: 478-83.

TIRÉS À PART

T. Lecuit.

Thomas Lecuit

Department of Molecular Biology, Princeton University, Washington Road, Princeton NJ 08544, États-Unis.