



# Signaux extracellulaires et programmes transcriptionnels contrôlant la neurogenèse

**François Guillemot**

F. Guillemot: Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Cnrs/Inserm/Université Louis-Pasteur, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, France.

► La mise en place du système nerveux central requiert la production de neurones présentant des phénotypes précis adaptés aux régions dans lesquelles ils vont opérer. Cette adéquation spatio-fonctionnelle dépend de l'action de nombreux facteurs de signalisation extracellulaire qui, notamment, interviennent dans les choix entre prolifération et différenciation. Des facteurs de transcription à homéodomaine ou à structure hélice-boucle-hélice contrôlent, quant à eux, l'acquisition des phénotypes neuronaux. Si l'on a appris beaucoup sur ces différents facteurs au cours des dernières années, leurs articulations dans les programmes qui conduisent à l'adoption par un neurone précis d'un phénotype adapté à sa localisation dans le système nerveux restent à définir. ◀

## TIRÉS À PART

F. Guillemot.

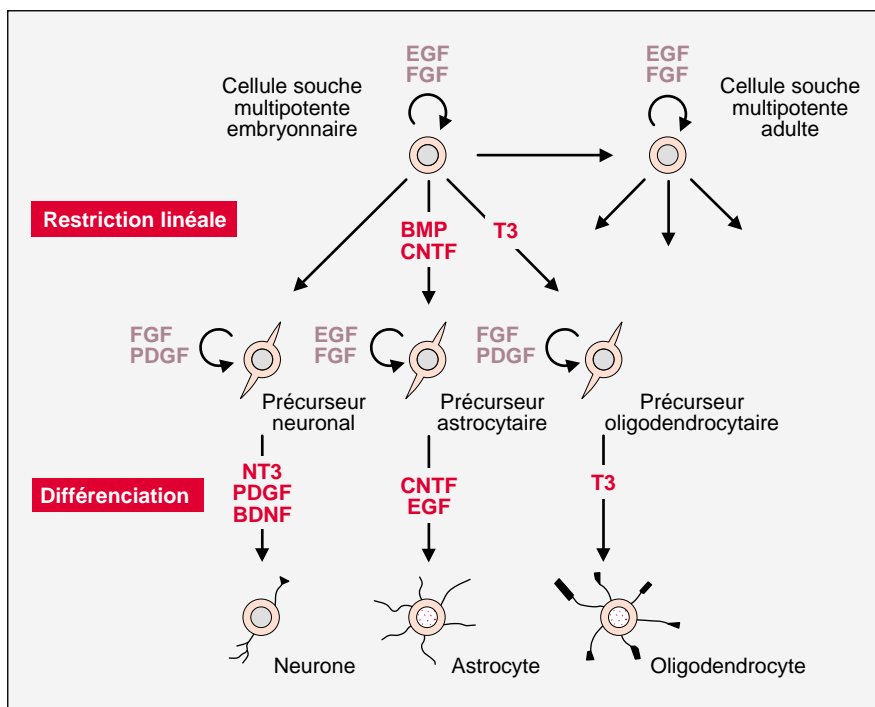
**D**ans le système nerveux en développement, la mise en place des différents types de neurones à leurs positions appropriées représente une étape essentielle dans l'assemblage de circuits neuronaux. De nombreux signaux extracellulaires et facteurs de transcription contrôlant le devenir des cellules progénitrices du système nerveux ont récemment été identifiés. Cependant, la façon dont ces facteurs interagissent pour mettre en place un programme de différenciation approprié à la position du futur neurone reste à découvrir.

### **Des facteurs extracellulaires contrôlent la différenciation des cellules souches du système nerveux**

**Facteurs réglant la prolifération et la différenciation neuronale ou gliale *in vitro***

Les cellules constituant le système nerveux, c'est-à-dire les neurones et

les cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes), sont produites tout au long de la vie fœtale, et leur fabrication se poursuit après la naissance et jusque chez l'adulte dans certaines régions du cerveau (voir *m/s 1998*, n° 12, p. 1453). Neurones, astrocytes et oligodendrocytes dérivent de précurseurs communs, des cellules multipotentes aux capacités de prolifération illimitées, qui sont localisées dans les parois du tube neural. Ces cellules souches produisent d'autres précurseurs mitotiques au potentiel de différenciation plus restreint, limité soit à la production de neurones soit à celle de l'un des types de cellules gliales. Les précurseurs mitotiques génèrent à leur tour des cellules qui vont se différencier ([1] et *figure 1*). Les régions prolifératives du système nerveux sont donc constituées d'un ensemble de cellules ayant atteint des degrés variables de restriction de leur potentiel de développement. L'étude des lignages cellulaires et des mécanismes réglant leur différenciation, est restée difficile jusqu'à aujourd'hui, en raison de l'absence de marqueurs



**Figure 1. Les principaux types de précurseurs du système nerveux.** Schéma des relations existant entre les différents précurseurs et les cellules différenciées. Certains facteurs extracellulaires règlent le devenir des précurseurs *in vitro* (facteurs mitogènes en bistre et facteurs de restriction linéale ou de différenciation en rouge). Au sommet se trouve une cellule souche ayant des propriétés d'autorenouvellement et de multipotentialité. Les cellules souches du système nerveux central ont des propriétés très semblables chez l'embryon et chez l'adulte, alors que les cellules souches de la crête neurale diffèrent à la fois par les facteurs auxquels elles répondent et par les types cellulaires qu'elles produisent (non montré). Les cellules souches se multiplient de façon illimitée en réponse aux facteurs mitogènes FGF et EGF. En l'absence de mitogènes, elles s'engagent « par défaut » dans une voie de différenciation neuronale, alors qu'elles se différencient en cellules gliales en réponse à des signaux instructifs tels que le ciliary neurotrophic factor (CNTF) ou les bone morphogenetic proteins (BMP) pour les astrocytes, et l'hormone thyroïdienne T3 pour les oligodendrocytes [3]. Les cellules souches produisent alors des cellules précurseurs ayant un potentiel de différenciation restreint soit à la production de neurones, soit à celle d'astrocytes ou d'oligodendrocytes. Ces précurseurs prolifèrent de façon limitée en présence de facteurs mitogènes et se différencient en réponse à des facteurs spécifiques de chaque type cellulaire.

moléculaires spécifiques de ces différentes catégories de précurseurs. Cependant, des progrès récents dans la culture de précurseurs neurogliaux ont permis de montrer que des facteurs extracellulaires contrôlent l'engagement vers la voie de prolifération ou de différenciation des cellules souches, puis leur appartenance à un lignage donné et leur différenciation (figure 1).

Les cellules souches prélevées dans différentes régions du système ner-

veux de rongeur, embryonnaire ou adulte, peuvent proliférer indéfiniment en présence de facteurs de croissance tels que le *fibroblast growth factor 2* (FGF2) ou l'*epidermal growth factor* (EGF). En l'absence de ces facteurs mitogènes, les cellules souches se différencient spontanément en neurones, astrocytes et oligodendrocytes, mais leur mode de différenciation peut être fortement influencé par la présence d'autres protéines solubles [2]. La production

de neurones semble être le mode de développement « par défaut » des cellules souches du cerveau, bien que de nombreux facteurs favorisent les étapes de différenciation des précurseurs. A l'inverse, l'engagement des cellules souches dans une voie de différenciation gliale peut être induite de façon instructive, aux dépens de la production de neurones, par d'autres signaux ([3] et figure 1). L'importance de ces différents facteurs dans le développement *in vivo* des lignages neuronaux et gliaux reste le plus souvent à démontrer.

### Facteurs contrôlant l'organisation spatiale des cellules du tube neural

Si des facteurs extrinsèques contrôlent le choix du lignage cellulaire dans lequel s'engagent les cellules souches du système nerveux, comment différents types cellulaires sont-ils produits à leurs positions appropriées? Une étude détaillée du développement de la moelle épinière, dans laquelle un nombre limité de types neuronaux sont simplement distribués le long de l'axe dorso-ventral, a mis en évidence le rôle essentiel de facteurs produits localement et qui diffusent dans le tissu nerveux. Le morphogène Sonic hedgehog (Shh) est sécrété par la notochorde, un tissu axial situé en position ventrale par rapport au tube neural, puis par les cellules de la plaque du plancher dans le tube neural. Shh diffuse dans toute la partie ventrale du tube neural et est capable d'induire à différentes concentrations, donc à différentes distances de sa source, la différenciation de types cellulaires distincts, notamment les cellules de la plaque du plancher, les motoneurones et des interneurones ventraux [4]. Au niveau dorsal, des membres de la famille du *transforming growth factor beta* (TGFβ), produits initialement par l'ectoderme, puis par la région la plus dorsale du tube neural, induisent également divers types cellulaires à différentes positions de l'axe dorso-ventral, les crêtes neurales, et la plaque du toit ainsi que plusieurs populations d'interneurones dorsaux [5]. Ainsi, des molécules diffusibles, sécrétées à partir de sources localisées, définissent la position des principaux types cellulaires dans le tube neural. Il faut cependant noter que

des signaux produits localement par des neurones récemment différenciés, et agissant à courte distance, sont également impliqués dans la spécification de nouveaux neurones [6].

### Facteurs contrôlant la production séquentielle de différents types neuronaux

La neurogenèse se poursuit pendant une longue période au cours de laquelle différents types cellulaires sont produits séquentiellement. Ainsi dans la rétine, les premiers neurones qui apparaissent sont les cellules ganglionnaires, suivis par les photorécepteurs, les interneurons et enfin les cellules gliales. Un processus d'inhibition entre cellules voisines, amorcé par l'interaction du récepteur Notch et de son ligand Delta (voir l'article de François Schweisguth, p. 186 de ce numéro), conduit les neurones en voie de différenciation à empêcher temporairement les précurseurs voisins de suivre la même voie, entraînant de ce fait l'étalement dans le temps de la neurogenèse [7]. Les signaux extracellulaires de différenciation changeant au cours de la neurogenèse [8], la voie de signalisation de Notch joue un rôle important dans la diversification des types cellulaires du système nerveux, en permettant aux précurseurs dont la différenciation est ainsi différée d'être exposés ultérieurement à de nouveaux signaux inducteurs [9].

Les changements de signaux de différenciation ne suffisent cependant pas à expliquer comment divers types cellulaires sont produits à différentes périodes de la neurogenèse. Les précurseurs eux-mêmes évoluent dans leur capacité à répondre aux facteurs de l'environnement [10]. Ainsi, les cellules précurseurs de la rétine de rongeur n'acquièrent la propriété de répondre à des signaux inducteurs de photorécepteurs qu'après la naissance [8]. Les facteurs contrôlant les propriétés intrinsèques de compétence des précurseurs neuronaux sont actuellement inconnus. Cependant, des progrès ont récemment été réalisés concernant l'identification de facteurs de transcription impliqués plus généralement dans la différenciation des précurseurs du système nerveux, et dans la spécification de certains aspects de leur identité.

### Des facteurs de transcription contrôlent la spécification de l'identité et la différenciation des neurones

#### Fonctions de détermination et de différenciation des gènes bHLH

Les facteurs de transcription à domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH) règlent les étapes de détermination et de différenciation cellulaires dans de nombreux tissus, tels que les muscles squelettiques et cardiaques et les tissus hématopoïétiques. L'implication des facteurs de transcription bHLH dans le développement du système nerveux a été initialement mise en évidence chez la drosophile, chez laquelle les gènes *bHLH* proneuraux *achaete-scute* et *atonal* déterminent le choix d'un développement neuro-gliale par les cellules du neuroectoderme [11].

Il existe chez les vertébrés des gènes apparentés à *achaete-scute* – appelés *Mash* – et à *atonal* – *Neurogenin*, *NeuroD* et *Math* – spécifiquement exprimés dans le système nerveux ([12] et figure 2). Leur rôle dans la neurogenèse a été étudié par des

expériences de « gain de fonction » chez l'embryon de xénope et des expériences de « perte de fonction » chez la souris. L'expression imposée de gènes *bHLH* chez l'embryon de xénope entraîne une différenciation massive de neurones ectopiques, démontrant ainsi la capacité de ces gènes à convertir des cellules de l'ectoderme vers un mode de développement neuronal [13]. Réciproquement, la délétion de certains gènes *bHLH* chez la souris (*Mash1*, *Math1* et *Neurogenin1* et 2; voir par exemple [14, 15]) entraîne la disparition de populations de précurseurs dans le système nerveux périphérique et central. La fonction de détermination de lignages neuro-gliaux est donc conservée pour les gènes de cette famille chez les vertébrés.

Les expériences de type « gain de fonction » et « perte de fonction » ont également démontré que les gènes de détermination neuro-gliale règlent les mêmes types de gènes cibles chez les vertébrés et chez la drosophile. C'est le cas notamment pour *Delta*, ainsi que pour des gènes directement impliqués dans la différenciation neuronale, tels que *NeuroD* [13, 14]. *NeuroD* appartient à un groupe de

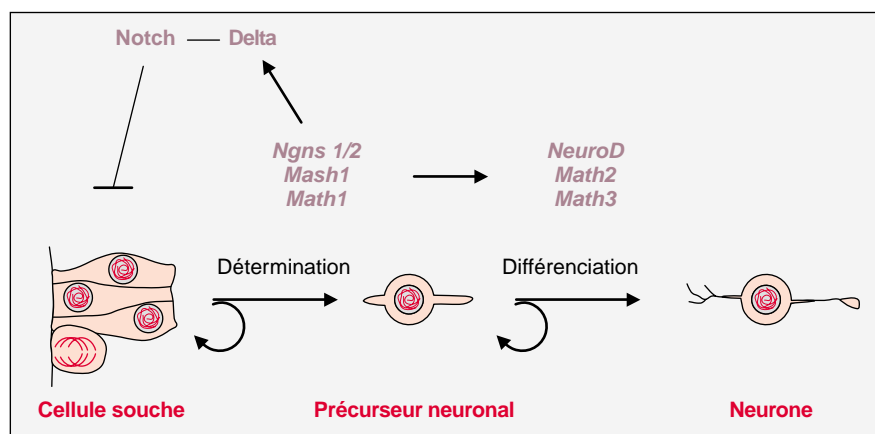
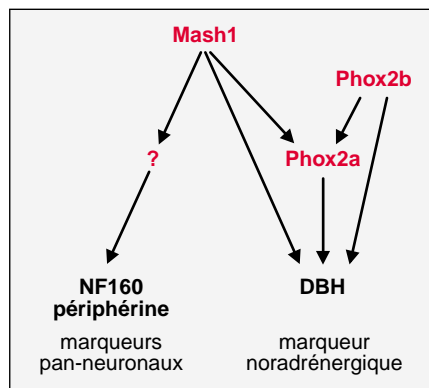


Figure 2. **Gènes bHLH et neurogenèse.** Expression des gènes bHLH et principaux stades de développement neural. Les gènes *Mash1*, *Math1* et *Ngns* («gènes de détermination neuro-gliale») sont exprimés par des précurseurs en division, et les gènes *NeuroD*, *Math2* et *Math3* («gènes de différenciation neuronale») par des cellules postmitotiques. Les gènes de détermination engagent les cellules souches du système nerveux dans une voie de différenciation, et activent la cascade des gènes de différenciation neuronale. Ils activent également l'expression du ligand Delta qui, en interagissant avec le récepteur Notch, déclenche une voie de signalisation aboutissant à l'inhibition de la neurogenèse dans les cellules voisines. L'implication des gènes de détermination dans la restriction des cellules souches au développement neuronal n'est pas encore établie, et les facteurs de transcription impliqués dans la spécification gliale ne sont pas connus.

gènes bHLH dont l'expression est déclenchée dans des précurseurs postmitotiques, alors que l'expression de *Mash1* et des *Neurogenins* débute dès le stade du précurseur mitotique [12] et figure 2). L'implication de *NeuroD* dans la différen-

tion neuronale a été démontrée par l'inactivation du gène chez la souris, qui entraîne la mort de nombreux neurones de la couche des grains du cervelet et de l'hippocampe [16].

**Des gènes *bHLH* et des gènes à homéodomaine déterminent l'identité neuronale**



**Figure 3. Gènes bHLH et gènes à homéodomaine interagissent pour établir un phénotype neuronal.** Dans les précurseurs sympathiques du système nerveux périphérique, le gène bHLH *Mash1* active en parallèle un programme générique de différenciation neuronale, résultant dans l'expression de marqueurs pan-neuronaux comme le gène codant pour la protéine des neurofilaments NF160 et la péripérine, et un programme spécifique des neurones sympathiques, aboutissant en particulier à l'expression de l'enzyme de synthèse de la noradrénaline, DBH. Les gènes à homéodomaine *Phox2a* et *Phox2b* sont les principaux déterminants du phénotype noradrénergique dans l'ensemble du système nerveux, et *Mash1* est un régulateur essentiel de *Phox2a* dans la plupart des précurseurs de neurones noradrénergiques. Les relations entre les gènes *Phox2* et *Mash1*, et le phénotype noradrénergique dans le lignage sympathique sont cependant complexes. *Phox2b* est exprimé indépendamment de *Mash1*; *Mash1* et *Phox2b* sont tous deux nécessaires à l'expression de *Phox2a*; et *Mash1* semble nécessaire à l'expression de *DBH* non seulement par l'intermédiaire de *Phox2a* mais aussi par une voie indépendante des gènes *Phox2* [17]. Les gènes de différenciation neuronale activés par *Mash1* dans les précurseurs sympathiques (marqués ?) sont inconnus, *NeuroD*, *Math2* et *Math3* n'étant pas exprimés dans ce lignage.

Un neurone qui se différencie exprime à la fois des caractères communs à tous les neurones, et d'autres qui sont propres au type neuronal particulier auquel il appartient. Il est maintenant bien établi que l'acquisition de ces différents marqueurs du phénotype neuronal est contrôlée par des programmes génétiques distincts [17]. De nombreuses données ont établi que les gènes *bHLH* confèrent aux neurones leurs propriétés génériques. Néanmoins, des résultats récents indiquent que ces mêmes gènes sont également impliqués dans l'acquisition de caractéristiques spécifiques de différents types neuronaux, chez les vertébrés comme chez la drosophile [18, 19]. Par exemple, *Mash1* est nécessaire à la différenciation de tous les neurones noradrénergiques, centraux et périphériques, puisqu'il contrôle un programme de différenciation spécifique de ce phénotype de neurotransmission. *Mash1* règle en effet l'expression du gène à homéodomaine *Phox2a*, qui est, avec *Phox2b*, le principal déterminant de la différenciation noradrénergique chez la souris, sans doute parce qu'il règle directement les gènes codant pour les enzymes de biosynthèse de la noradrénaline, la tyrosine hydroxylase et la dopamine-β-hydroxylase ([18, 20] et figure 3). *Mash1*, comme sans doute les autres gènes de détermination neuro-gliale, coordonne donc à la fois l'expression de caractéristiques génériques et spécifiques du phénotype neuronal [17, 20]. Il faut noter que *Mash1* est également impliqué dans la différenciation de neurones ayant d'autres phénotypes de neurotransmission, notamment les neurones GABAergiques [15, 21]. Les mécanismes qui assurent cette modulation de la spécificité de *Mash1* en fonction du contexte cellulaire sont encore inconnus.

L'activation en cascade de facteurs de transcription semble jouer un rôle essentiel dans la spécification pro-

gressive du phénotype neuronal. La contribution des différents composants d'une telle cascade a été particulièrement bien étudiée dans le cas des motoneurones de la moelle épinière. Le gène à homéodomaine *MNR2* est exprimé transitoirement par les précurseurs de la moelle épinière ventrale en réponse à *Shh*, et son expression est suffisante pour activer un programme de différenciation spécifique des motoneurones de type somatique. Ce programme inclut l'acquisition d'un phénotype de neurotransmission cholinergique et l'expression des gènes à homéodomaine *islet1* et *Lhx3* [22]. *Lhx3* et le gène apparenté *Lhx4* spécifient à leur tour l'un des aspects de l'identité des motoneurones somatiques, c'est-à-dire la projection de leurs axones vers les racines ventrales de la moelle épinière [23].

L'existence de cascades composées de facteurs de transcription réglant différents aspects du phénotype neuronal pourrait laisser penser qu'une fois mise en route, la différenciation d'un neurone est un processus autonome, indépendant d'influences extérieures. Cela est peu vraisemblable: des informations provenant de l'environnement sont certainement intégrées à différentes étapes des programmes de différenciation, afin que le phénotype d'un neurone reflète sa position, et lui permette ainsi d'être incorporé dans les circuits neuronaux appropriés [24]. Les connaissances concernant les mécanismes de la neurogenèse progressent rapidement, et les voies par lesquelles signaux extracellulaires et programmes transcriptionnels coopèrent au cours de l'établissement du phénotype neuronal devraient donc être largement élucidées dans les prochaines années.

**Perspectives**

Des cellules souches humaines ayant des propriétés voisines de celles des cellules souches de rongeurs ont pu récemment être isolées à partir de tissus fœtaux, et propagées *in vitro* [25]. La possibilité de disposer de grandes quantités de cellules nerveuses humaines en culture ouvre de nombreuses perspectives, telles que la possibilité de tester l'activité de nouvelles molécules de façon plus pertinente que chez des modèles ani-

maux. L'une des propriétés les plus intéressantes de ces cellules est d'ailleurs leur capacité à être transplantées dans le cerveau de rongeurs, où certaines d'entre elles répondent aux signaux présents à leur site d'implantation, et se différencient de façon appropriée [25]. Les progrès rapides réalisés dans les techniques de culture de cellules souches de système nerveux, en particulier dans le contrôle de leur expansion et dans la maîtrise de leur type de différenciation *in vitro*, permettent d'envisager l'utilisation de thérapies cellulaires dans le traitement de maladies neuro-dégénératives et d'autres lésions du système nerveux ■

## RÉFÉRENCES

1. Temple S, Qian X. Vertebrate neural progenitor cells: subtypes and regulation. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 11-7.
2. Gage FH, Ray J, Fisher LJ. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18: 159-92.
3. Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 1996; 10: 3129-40.
4. Ericson J, Briscoe J, Rashbass P, Van Heyningen V, Jessell TM. Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1997; 62: 451-66.
5. Liem KF, Tremml G, Jessell TM. A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 1997; 91: 127-38.
6. Sockanathan S, Jessell TM. Motor neuron-derived retinoid signaling specifies the subtype identity of spinal motor neurons. *Cell* 1998; 94: 503-14.
7. Henrique D, Hirsinger E, Adam J, et al. Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* 1997; 7: 661-70.
8. Cepko CL. The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9: 37-46.
9. Lewis J. Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 3-10.
10. McConnell SK. Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* 1995; 15: 761-8.
11. Jan YN, Jan LY. Genetic control of cell fate specification in *Drosophila* peripheral nervous system. *Annu Rev Genet* 1994; 28: 373-93.
12. Lee JE. Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 13-20.
13. Ma Q, Kintner C, Anderson DJ. Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 1996; 87: 43-52.
14. Fode C, Gradwohl G, Morin X, et al. The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* 1998; 20: 483-94.
15. Casarosa S, Fode C, Guillemot F. *Mash1* regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 1999; 126: 525-34.
16. Miyata T, Maeda T, Lee JE. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev* 1999; 13: 1647-52.
17. Anderson DJ, Jan YN. The determination of the neuronal phenotype. In: Cowan WM, ed. *Molecular and cellular approaches to neural development*. New York: Oxford University Press, 1997: 26-63.
18. Goridis C, Brunet JF. Transcriptional control of neurotransmitter phenotype. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9: 47-53.
19. Jarman AP, Grau Y, Jan LY, Jan YN. Atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell* 1993; 73: 1307-21.
20. Lo L, Tiveron MC, Anderson DJ. *MASH1* activates expression of the paired homeodomain transcription factor Phox2a, and couples pan-neuronal and subtype-specific components of autonomic neuronal identity. *Development* 1998; 125: 609-20.
21. Fode C, Ma QF, Casarosa S, Ang SL, Anderson D, Guillemot F. A role for neural determination genes in specifying the dorso-ventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* 2000; 14: 67-80.
22. Tanabe Y, William C, Jessell TM. Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* 1998; 95: 67-80.
23. Sharma K, Sheng HZ, Lettieri K, Li H, Karavanov A, Potter S, Westphal H, Pfaff SL. LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell* 1998; 95: 817-28.
24. Edlund T, Jessell TM. Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 1999; 96: 211-24.
25. Svendsen CN, Smith AG. New prospects for human stem-cell therapy in the nervous system. *Trends Neurosci* 1999; 22: 357-64.

## MS2000

### Summary

#### Extracellular signals and transcriptional programs controlling neurogenesis

The assembly of neuronal circuits requires the generation of various types of neurons at appropriate positions. Numerous extracellular signals and transcription factors controlling the fate of progenitor cells of the nervous system have recently been identified. Extrinsic factors control a number of critical checkpoints for neural progenitors, such as the commitments towards proliferation *versus* differentiation, between a glial *versus* a neuronal fate, and also the nature of the neurons generated at different dorso-ventral positions and at different times during neurogenesis. Transcription factors of the bHLH and homeodomain classes function in regulatory cascades to control the determination of neural progenitors and the acquisition of generic and specific aspects of the neuronal phenotype. The mechanisms by which extrinsic signals and transcriptional programs get integrated so that a neuron adopts a differentiated phenotype appropriate to its position remain to be established.