



Gènes sélecteurs, identité des membres et latéralité chez les vertébrés

Jacques Drouin

J. Drouin : Chaire Glaxo Wellcome en génétique moléculaire, Institut de recherches cliniques de Montréal, 110, avenue des Pins-Ouest, Montréal, Québec, H2W 1R7 Canada.

► L'étude des gènes homéotiques du complexe *Hox* nous avait révélé comment un plan de développement en segments a été conservé au cours de l'évolution. La découverte de nouveaux facteurs de transcription à homéodomaine apparentés au gène *bicoïde* de la drosophile révèle que certains territoires de l'embryon tiennent leur identité de l'expression de gènes des sous-familles *Otx* et *Pitx* (*Ptx*). *Pitx1* semble donner leur identité aux membres postérieurs par rapport aux membres antérieurs alors que *Pitx2*, pour sa part, dirige le programme de développement propre au côté gauche des dérivés du mésoderme latéral. ◀

Lorsqu'on décrit le corps d'un animal ou de l'homme, ce qui ressort d'abord, c'est la symétrie : les côtés droit et gauche ont les mêmes proportions et sont des images en miroir l'un de l'autre. L'homme dans un cercle de Da Vinci illustre bien ceci (figure 1). En y regardant de plus près toutefois, on constate que la symétrie droite-gauche contraste avec l'asymétrie complète au niveau des deux autres axes : la tête, les pieds, le ventre, le dos ne révèlent pas de plan commun. De plus, l'apparente symétrie droite-gauche cache des viscères largement asymétriques. La détermination des axes représente donc un des événements les plus précoces du développement embryonnaire et, bien que l'on connaisse maintenant des régulateurs (ligands, récepteurs ou facteurs de transcription) associés au développement des structures asymétriques ou symétriques, les signaux originaux qui déterminent ces événements demeurent mal compris. Par exemple, on a récemment suggéré, à la suite de l'inactivation d'un complexe moteur à kinésine, qu'un mouvement ciliaire orienté vers la gauche

au niveau du nœud lors de la gastrulation puisse établir l'asymétrie droite-gauche par une distribution asymétrique de ligand [1]. Quoi qu'il en soit, plusieurs signaux constitués de ligands et de leurs récepteurs ont été associés à la mise en place des axes antéro-postérieur, dorso-ventral et plus récemment droit-gauche. De plus, une fois les axes établis, leur identité doit être maintenue tout au long du développement embryonnaire pour assurer la spécificité des événements morphogénétiques propres à chacun des territoires embryonnaires. On a récemment identifié des facteurs de transcription dont l'un des rôles semble être de définir, au niveau moléculaire, l'identité de grands territoires embryonnaires. Plusieurs d'entre eux appartiennent à la famille *paired* des gènes à homéodomaine (HD) et plus particulièrement aux sous-familles *Otx* et *Pitx* (*Ptx*) dont la spécificité de reconnaissance de l'ADN est semblable à celle du gène *bicoïde* de la drosophile. Ces familles de gènes et leurs propriétés transcriptionnelles ont été décrites récemment dans *médecine/sciences* [2].

TIRÉS À PART

J. Drouin.

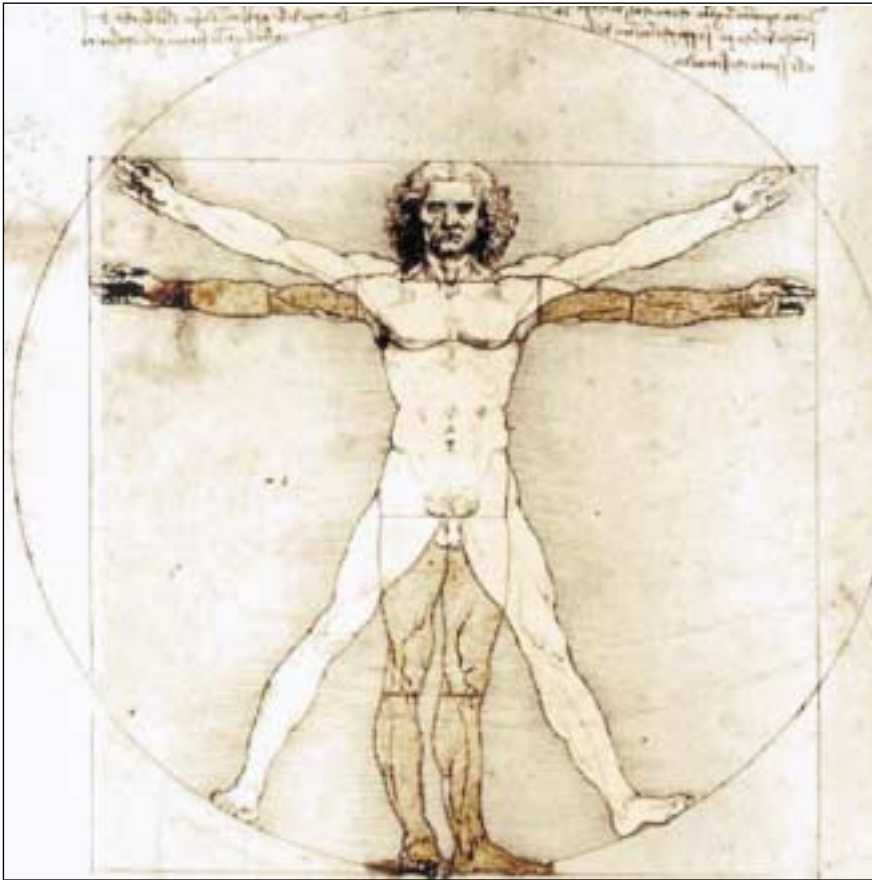


Figure 1. **Symétrie et asymétrie.** Le dessin de l'homme de Léonard de Vinci révèle bien les proportions simples et la symétrie du corps des vertébrés. La symétrie apparente des côtés droit et gauche dissimule toutefois des visières asymétriques et le développement le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral est complètement asymétrique.

Gènes sélecteurs et domaines dans l'axe antéro-postérieur (A/P)

Alors que l'on connaît depuis longtemps le rôle de *bicoïde* dans la détermination de l'extrémité antérieure de l'embryon de drosophile, ce n'est qu'il y a quelques années qu'un premier gène apparenté, *Otx2*, a été impliqué dans un rôle semblable chez les mammifères [3, 4]. En effet, *Otx2* est l'un des deux gènes (l'autre est *Lim1-Lhx1*) dont le rôle est associé à la fonction « d'organisateur de la tête » [3, 4]. C'est Spemann lui-même qui avait postulé l'existence d'un tel organisateur, à l'image de celui qui porte son nom et qui préside à la détermination du mésoderme lors de la gastrulation [5]. Autant l'expression restreinte d'*Otx2* au niveau des structures préchordales que son rôle essentiel pour le déve-

loppement du télencéphale et du mésencéphale indiquent que ce gène définit le domaine rostral de l'embryon. Ce domaine est antérieur à ceux qui, à partir du rhombencéphale, sont marqués par l'expression successive des gènes du complexe *Hox* au niveau moléculaire, par des structures en segments (rhombomères et somites) au niveau morphologique [6]. On a d'abord cru que l'expression des gènes *Hox* pourrait suffire à définir l'identité de toutes les structures associées aux segments définis par les somites. Toutefois, ces gènes ne semblent pas suffire pour marquer l'identité de tous les domaines de l'embryon et d'autres gènes, dits sélecteurs, semblent déterminer certains grands domaines embryonnaires.

A l'image d'*Otx2* pour la tête, un autre gène de la classe *bicoïde*, *Pitx1* (*Ptx1*) semble essentiel pour conférer

une identité au domaine postérieur de l'embryon [7, 8]. Ainsi, au cours du développement embryonnaire, l'expression de *Pitx1* est restreinte au mésoderme de la lame latérale (mll) de la moitié caudale de l'embryon [7] et, dans les membres, il en résulte une expression restreinte aux membres postérieurs. Ainsi, ce gène sélecteur de la moitié postérieure du mll pourrait conférer au moins une part de leur identité aux membres postérieurs [8-10].

L'inactivation du gène *Pitx1* chez la souris a montré que cette spécificité d'expression reflète un rôle de *Pitx1* dans la spécification de l'identité des membres [8]. En effet, les pattes arrière de ces souris ont des os dont l'apparence est semblable dans une certaine mesure à celle des os des pattes avant (figure 2, A, B). La perte de la fonction *Pitx1* empêche donc le développement de structures caractéristiques des membres postérieurs : ne s'agit-il que de cela ou d'une transformation en membres antérieurs ? Cette question demeure sans réponse puisqu'il est possible que le plan de développement des membres antérieurs reflète en partie une fonction par défaut. Cette notion ne peut certainement pas à elle seule expliquer l'identité des membres car deux gènes apparentés à *Brachyury*, les gènes *Tbx4* et *Tbx5*, dont l'expression est restreinte respectivement aux membres postérieurs et antérieurs [11], peuvent changer le caractère des membres lorsque leur expression est forcée dans les membres qui ne les expriment pas normalement [12]. Des études de gain-de-fonction ont placé *Tbx4* en aval de *Pitx1* dans la hiérarchie des gènes qui donnent leur identité aux membres postérieurs [13]. Bien que nous ne sachions pas si un autre gène se situe en amont de *Tbx5* dans les membres avant, et peut-être dans le mll rostral, il semble que l'expression de *Pitx1* dans le mll caudal donne à ce gène son rôle de sélecteur de l'identité propre à ce domaine embryonnaire et, en particulier, aux membres postérieurs.

Latéralisation et asymétrie gauche/droite

Un autre gène de la famille *Pitx*, *Pitx2*, est exprimé de façon asymétrique dans

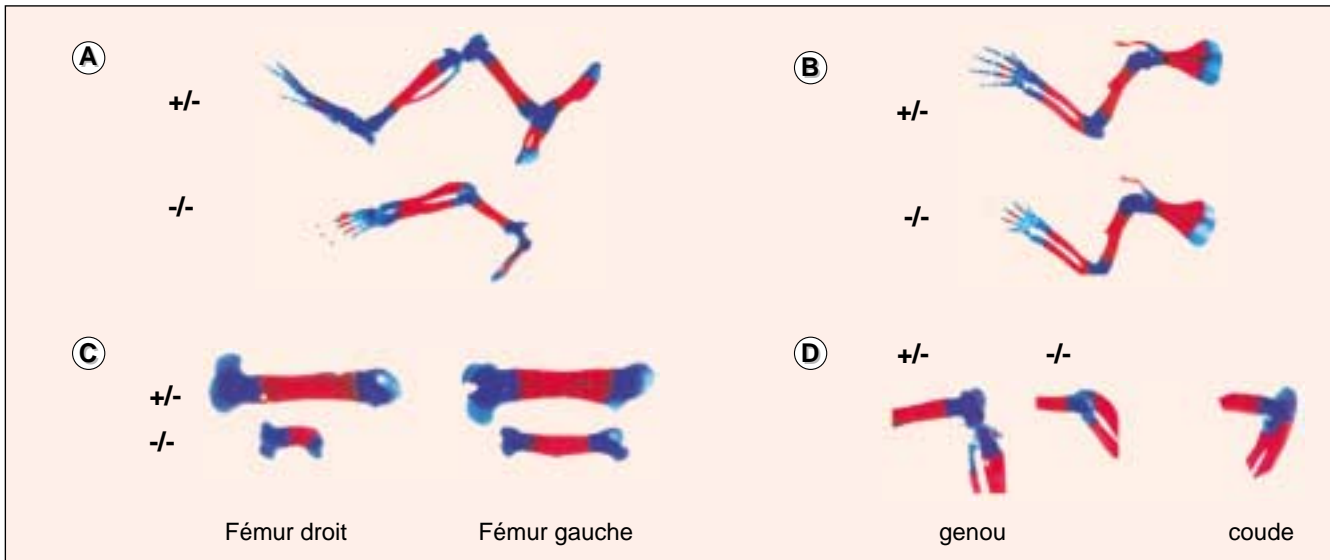


Figure 2. **Transformation squelettique des pattes arrières chez la souris déficiente en Pitx1.** L'inactivation du gène *Pitx1* modifie le développement du squelette des pattes arrières de telle sorte qu'elles ressemblent superficiellement aux pattes avant. **A.** Préparation squelettique des pattes de souris hétérozygotes (+/-) et homozygotes (-/-) porteuses de la mutation d'inactivation du gène *Pitx1*. Ces préparations squelettiques sont colorées au bleu d'alcan (cartilage) et au rouge d'alizarine (os). Au niveau des os pelviens, on note l'absence d'ilion dans les pattes des mutants. **B.** De plus, tibias et péronés sont de diamètre semblable chez les mutants, ce qui les fait ressembler à des radius et à des cubitus des membres antérieurs. **C.** Le développement du fémur est perturbé chez les mutants et cet effet est plus marqué du côté droit. **D.** La plupart des cartilages du genou sont absents chez les souris mutantes, ce qui donne à cette articulation une allure semblable à celle des pattes avant (coude).

le mll [14]. Bien qu'il soit exprimé de façon bilatérale dans le neuroépithélium et les myotomes, *Pitx2* n'est en effet exprimé que dans le mll du côté gauche. *Pitx2* marque donc par cette expression un domaine du mll dans lequel il semble jouer un rôle de sélecteur. Cette expression asymétrique est corrélée avec le développement à gauche du cœur et d'autres organes internes puisqu'elle est inversée chez des souris porteuses de la mutation *inv*, qui résulte en un *situs inversus*, et qu'elle est aléatoire chez les souris porteuses de la mutation *iv* [14]. L'inactivation du gène *Pitx2* chez la souris, qui provoque un isomérisme droit des poumons [15-17], n'a toutefois pas d'effet aussi important sur la position du cœur, bien que la rotation de l'embryon et le développement cardiaque soient affectés. Chez le poulet, l'infection du mll droit à l'aide d'un rétrovirus surexprimant *Pitx2* provoque le développement d'un cœur symétrique [18], semblable à celui induit par l'expression bilatérale de *nodal* [19]. La surexpression à droite de *Pitx2* peut également inverser les recourbements de l'intestin. En somme, la mise en place de *Pitx2* dans

le mll gauche détermine la morphogenèse des structures qui en dérivent. Il est intéressant de noter que l'expression restreinte de *Pitx1* et *Pitx2*, respectivement dans le mll postérieur et gauche, crée deux quadrants différents au niveau postérieur. Cette observation pourrait fort bien expliquer pourquoi les membres postérieurs droit des embryons déficients en *Pitx1* sont fréquemment beaucoup plus affectés que les membres postérieurs gauche (figure 2C) dans lesquels l'expression de *Pitx2* pourrait jouer un rôle compensateur partiel [8]. L'expression des gènes *Pitx* dans des sous-domaines du mll, la moitié postérieure pour *Pitx1* et la moitié gauche pour *Pitx2*, influence donc de façon déterminante le développement et la morphogenèse des structures qui dérivent plus tard de ce mésoderme.

Quels sont les signaux qui déclenchent l'expression des gènes *Pitx* eux-mêmes dans le mll ? Nous n'en connaissons aucun pour *Pitx1* mais une cascade de signaux ont été identifiés pour la mise en place de *Pitx2*. Comme cela a été mentionné dans l'introduction, il se pourrait qu'un mouvement ciliaire orienté vers la

gauche dans le nœud (lors de la gastrulation) produise l'asymétrie initiale, chez la souris au moins. Ce mouvement du liquide nodal entraînerait un ou des ligand(s) qui met(tent) en route une cascade de signaux dont l'aboutissement serait l'expression de *nodal*, une molécule sécrétée de la famille TGF β , dans le mll gauche. Par la suite, *nodal* induit *Pitx2* dans toute la lame latérale gauche dans laquelle ce facteur de transcription assume le rôle d'effecteur de la latéralisation. *Nodal* et *Pitx2* sont les deux régulateurs de la latéralisation gauche-droite dont l'expression et le rôle ont été montrés et sont conservés chez plusieurs espèces [14]. Nous connaissons plusieurs signaux responsables de l'induction de *nodal* chez le poulet mais il ne semble pas que ces signaux soient nécessairement conservés chez la souris. La figure 3 représente l'essentiel des signaux identifiés dans l'embryon de poulet. Ainsi, initialement, ce serait la restriction de l'expression de *sonic hedgehog* (*Shh*) du côté gauche du nœud qui amorcerait la cascade des signaux de ce côté dans le mésoderme adjacent [14]. Cette restriction serait due à la pré-

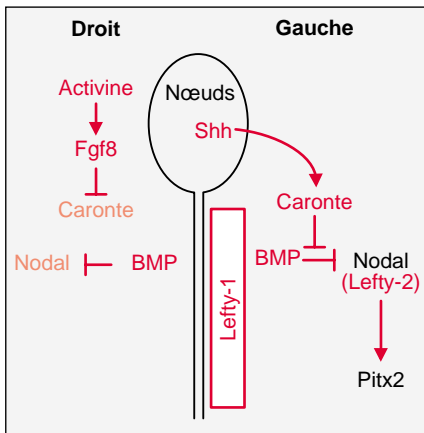


Figure 3. Voie de signalisation contrôlant la latéralisation du mésoderme de la lame latérale chez le poulet. Au niveau du nœud de Hensen, la présence de sonic hedgehog (Shh) du côté gauche serait responsable de l'induction de Caronte, une molécule apparentée à Cerberus, dans le mésoderme paraxial gauche. Cette molécule servirait de relais pour l'induction de nodal dans le mésoderme de la lame latérale gauche. L'induction de nodal semble se faire par répression de l'action des répresseurs que sont les molécules de la famille BMP. Nodal, un membre de la famille TGF β , induit l'expression du facteur de transcription Pitx2 dans tout le mésoderme latéral gauche et celui-ci semble responsable de l'exécution du programme de développement spécifique au côté gauche. Du côté droit, la présence d'activine active la production de Fgf8 qui lui, bloque la cascade de signalisation gauche par répression de Caronte. Nodal et Pitx2 sont les seules molécules spécifiques au côté gauche dont l'expression a été montrée chez plusieurs espèces. Une autre molécule apparentée à nodal, lefty-2, semble jouer un rôle semblable chez la souris mais ce gène n'est pas présent chez le poulet. Quant à lefty-1, il joue un rôle de barrière au niveau de la ligne médiane, autant chez le poulet que chez la souris, pour assurer que les signaux spécifiques au côté gauche n'affectent pas le mésoderme du côté droit.

sence d'activine du côté droit du nœud de Hensen qui inhibe la production Shh de ce côté et qui active la production de Fgf8 à droite. Le Fgf8 empêcherait l'expression du gène Caronte (Car), un membre de la famille Cerberus [20, 21], alors que

Shh en induirait la production dans le mésoderme paraxial à gauche du nœud. Caronte serait alors l'initiateur du programme de développement gauche puisque, en inhibant l'action des facteurs BMP (*bone morphogenetic proteins*) sécrétés de ce côté, il permet l'expression de nodal dans le mll et l'induction subséquente de Pitx2 [14]. Chez le poulet, une cascade assez clairement définie relaie donc le signal du nœud (Shh) vers le mésoderme paraxial (Caronte) et le mll (nodal) où Pitx2 prendra alors charge de l'exécution du programme « gauche-spécifique » de morphogénèse (figure 3). Certains éléments de ce programme sont toutefois uniques au poulet [14] : en effet, Shh ne semble pas impliqué dans la latéralisation du nœud chez la souris [22], alors qu'une autre molécule de la famille TGF β , lefty-2, semble jouer un rôle redondant à celui de nodal dans le mll gauche. Toutefois, dans les deux espèces, l'expression du gène lefty-1 au niveau de la ligne médiane (sillon primitif) semble isoler les programmes génétiques gauche et droit du mll en empêchant la propagation à droite des signaux propres au mll gauche [20, 21]. Deux questions clés demeurent : quels sont les mécanismes/signaux initiateurs de la cascade de signaux de latéralisation et comment le facteur de transcription Pitx2 accomplit-il son rôle d'effecteur morphogénétique ?

Perspectives

L'identification des gènes Pitx1 et Pitx2, et celle de leur fonction dans l'identité de différents territoires du mll, soulève des questions nouvelles à propos du plan de développement des vertébrés et de son évolution [9]. Il y a certainement d'autres gènes, parmi lesquels peut-être Pitx3 [23], dont la fonction nous est encore inconnue mais dont l'étude offre des perspectives excitantes de découverte à tous ceux que la beauté du développement séduit ■

RÉFÉRENCES

1. Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, et al. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 1998; 95: 829-37.

2. Drouin J, Lanctôt C, Tremblay JJ. La famille Ptx des facteurs de transcription à homéodomaine. *Med Sci* 1998; 14: 335-9.
3. Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, et al. Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 1995; 121: 3279-90.
4. Matsuo I, Kuratani S, Kimura C, Takeda N, Aizawa S. Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev* 1995; 9: 2646-58.
5. Spemann H, Mangold H. Über induktion von embryonalen Organen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Roux's Arch Entw Mech* 1924; 100: 599.
6. Krumlauf R. *Hox* genes in vertebrate development. *Cell* 1994; 78: 191-201.
7. Lanctôt C, Lamolet B, Drouin J. The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* 1997; 124: 2807-17.
8. Lanctôt C, Moreau A, Chamberland M, Tremblay ML, Drouin J. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* 1999; 126: 1805-10.
9. Weatherbee SD, Carroll SB. Selector genes and limb identity in arthropods and vertebrates. *Cell* 1999; 97: 283-6.
10. Graham A, McGonnell I. Limb development: farewell to arms. *Curr Biol* 1999; 9: R368-70.
11. Gibson-Brown JJ, Agulnik SI, Chapman DL, et al. Evidence of a role for *T-box* genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech Dev* 1996; 56: 93-101.
12. Takeuchi JK, Koshida-Takeuchi K, Matsumoto K, et al. *Tbx5* and *Tbx4* genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature* 1999; 398: 810-4.
13. Logan M, Tabin CJ. Role of *Pitx1* upstream of *Tbx4* in specification of hindlimb identity. *Science* 1999; 283: 1736-9.
14. Harvey RP. Links in the left/right axial pathway. *Cell* 1998; 94: 273-6.
15. Lin CR, Kloussi C, O'Connell S, et al. *Pitx2* regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 1999; 401: 279-82.
16. Lu MF, Pressman C, Dyer R, Johnson RL, Martin JF. Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* 1999; 401: 276-8.
17. Gage PJ, Suh HY, Camper SA. Dosage requirement of *Pitx2* for development of multiple organs. *Development* 1999; 126: 4643-51.
18. Logan M, Pagán-Westphal SM, Smith DM, Paganessi L, Tabin CJ. The transcription factor *Pitx2* mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* 1998; 94: 307-17.

RÉFÉRENCES

19. Levin M, Johnson RL, Stern CD, Kuehn M, Tabin C. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 1995; 82: 803-14.
20. Yokouchi Y, Vogan KJ, Pearse II RV, Tabin CJ. Antagonistic signaling by *Caronte*, a novel *cerberus*-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression. *Cell* 1999; 98: 573-83.
21. Rodriguez-Esteban C, Capdevilla J, Economides AN, Pascual J, Ortiz A, Izpisua-Belmonte JC. The novel Cer-like protein *Caronte* mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Nature* 1999; 401: 243-51.
22. Pagán-Westphal SM, Tabin CJ. The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis. *Cell* 1998; 93: 25-35.
23. Smidt M, van Schaick HSA, Lanctôt C, et al. A homeodomain gene *PTX3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13305-10.

MS2000

Summary

Selector genes, limb identity and laterality in vertebrates

Early in the development of the embryo, the primary axes are defined morphologically and at the molecular level. The recent discovery of vertebrate homeodomain-containing transcription factors related to *Drosophila bicoid* has revealed that many of these factors play a role in specification of identity for large embryonic fields. Whereas *Otx2* was previously shown to confer identity to the most rostral neuroepithelium and has been postulated to play a role in the head organizer function, the recently identified genes *Pitx1* and *Pitx2* behave as determinants of posterior and left lateral plate mesoderm, respectively. *Pitx1* thus appears to be at the head of a regulatory cascade for specification

of hindlimb identity. This cascade includes *Tbx4*, a *brachyury*-related gene, expressed only in hindlimbs in contrast to the related *Tbx5* gene which appears to play a similar role in forelimbs. *Pitx2* is uniquely expressed in the left lateral plate mesoderm and appears to be the transcriptional effector for development of asymmetric internal organs such as the heart, stomach, intestine and lungs. Its expression in the left lateral plate mesoderm is under stringent control of a regulatory cascade that has been best defined in chicken. The discovery of the *Pitx* genes has provided the first molecular insight into the mechanisms for the development of non-symmetrical structures in vertebrates.

Cours de Biologie Moléculaire de la Cellule

Enseignement pratique

13 mars - 14 avril 2000

Ce cours, conjointement organisé par l'Institut Pasteur et l'Institut Curie, se déroulera du 13 mars au 14 avril 2000 à plein temps, à l'Institut Pasteur à Paris. Il est destiné à des chercheurs du secteur public et privé, ayant une formation des facultés de sciences, de médecine, de pharmacie ou des écoles vétérinaires. Les candidats doivent avoir une bonne connaissance, niveau maîtrise, en biologie moléculaire. Les techniques de base de biologie moléculaire ne seront pas enseignées (exemple : clonage, séquençage de gènes, etc.). Ce cours donne lieu à un diplôme de l'Institut Pasteur suite à un examen qui se déroulera à la fin du mois d'avril.

Le thème central de ce cours concerne l'étude de la cellule eucaryote. Cet enseignement est très orienté vers l'initiation expérimentale, et fera une large place aux nouvelles techniques ainsi qu'à la démarche scientifique actuelle pour l'étude des fonctions cellulaires. Les travaux pratiques seront accompagnés de conférences théoriques sur les thèmes suivants :

- Organisation fonctionnelle de la cellule : compartiments membranaires, cytosquelette, polarité cellulaire
- Les routages intracellulaires : transport des protéines membranaires et sécrétées, endocytose des macromolécules
- Les contacts et la communication entre cellules
- La différenciation cellulaire
- La signalisation et la transduction des messagers cellulaires
- Le cycle cellulaire.

Les techniques mises en œuvre seront celles de l'analyse génétique, la transfection et l'expression de gènes clonés, la culture cellulaire, la reconstitution *in vitro* des fonctions cellulaires, la visualisation des constituants cellulaires y compris par les techniques les plus récentes de microscopie confocale et d'imagerie.

Avec la participation de : Ch. Babinet, M. Bornens, P. Bregestovski, R. Bruzzone, P. Cossart, A. Dautry-Varsat, F. Dautry, M. Dubois-Dalcq, S. Dufour, E. Fabre, B. Goud, B. Hoflack, C. Hopkins, L. Johannes, E. Karsenti, D. Louvard, P. Mangeat, U. Nehrbass, J.-C. Olivo, J. Pouyssegur, J.-P. Thiéry et M. Weiss. Les cours théoriques seront assurés par des enseignants français et européens.

Responsables du cours : A. Dautry-Varsat et D. Louvard.

Renseignements et Inscriptions

Mme Banisso, Secrétariat des Enseignements et des Stages
Institut Pasteur, 28, rue du Dr-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.
Tél. : 01 45 68 81 41 ou 01 40 61 33 62 - Fax : 01 40 61 30 46
E-mail : rbanisso@pasteur.fr