

L'induction neurale chez les vertébrés : le cerveau par défaut

Éric Honoré
Ali Hemmati-Brivanlou

Classiquement, le système nerveux de l'embryon d'amphibien naît, au cours de la gastrulation, d'interactions inductrices entre le mésoderme dorsal et l'ectoderme qui le recouvre ; elles mettent en jeu trois facteurs diffusibles, Noggin, Follistatin et Chordin, sécrétés par l'organisateur de Spemann. Les études actuelles montrent que l'induction neurale semble, en outre, liée à la levée d'une inhibition des cellules à devenir neurales : c'est le modèle dit du cerveau par défaut. On a montré que la protéine BMP4 (*bone morphogenetic protein*), un autre membre de la superfamille TGF β , induit la différenciation épidermique et inhibe la spécification neurale ; à l'inverse, toute interférence avec la voie de transmission du signal BMP4, en particulier par Noggin, Follistatin et Chordin, provoque l'induction neurale. Ces mécanismes moléculaires sont conservés au cours de l'évolution et leur étude pourrait conduire à des développements thérapeutiques intéressants dans les maladies neurodégénératives.

Deux phases distinctes interviennent dans la formation d'un neurone : (1) l'induction de l'ectoderme en neuroectoderme durant la gastrulation ; (2) la spécification des précurseurs neuronaux durant la neurulation et les stades plus tardifs du développement embryonnaire. Nous allons décrire la phase initiale d'induction qui a pour conséquence d'engager les cellules de l'ectoderme du côté dorsal vers la différenciation neuronale. En particulier, nous allons présenter un modèle suggérant l'existence d'un inducteur de l'épiderme qui jouerait le rôle d'inhibiteur neural et un mécanisme molé-

culaire dépendant de l'inactivation de cet inhibiteur. Ce modèle par défaut propose que l'inhibition de l'inducteur de l'épiderme dévoilerait la destinée neurale. Nous allons discuter, du point de vue évolutif, la signification de ce modèle.

Les leçons de l'embryologie classique

Le système nerveux des vertébrés est induit lors de la gastrulation. Chez les amphibiens et en particulier chez le xénope (*Xenopus laevis*), la gastrulation intervient environ neuf heures après la fécondation. Durant cette étape

ADRESSES

E. Honoré : chargé de recherche au Cnrs. UPR411, Sophia Antipolis, 660, route des lucioles, 06560 Valbonne, France. A. Hemmati-Brivanlou : assistant professor. The Rockefeller University, 1230 York Avenue, Box 32, New York, NY 10021-6399, États-Unis.

RÉFÉRENCES

- Keller R. Early embryonic development of *Xenopus laevis*. In: Kay BK, Peng HB, eds. *Methods in cell biology*, vol. 36. San Diego: Academic Press Inc, 1991.
- Slack JMW. *From egg to embryo: regional specification in early development*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.
- Kessler DS, Melton DA. Vertebrate embryonic induction: mesodermal and neural patterning. *Science* 1994; 266: 596-604.
- Eagleson G, Ferreiro B, Harris WA. Fate of the anterior neural ridge and the morphogenesis of the *Xenopus* forebrain. *J Neurobiol* 1995; 28: 146-58.
- Spemann H, Mangold H. Über Induktion von Embryonanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch Mikr Anat Entwmech* 1924; 100: 599-638.
- Spemann H. *Embryonic development and induction*. New York: Yale University Press, 1938.
- Smith JC, Slack JMW. Dorsalization and neural induction: properties of the organizer in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* 1983; 78: 299-317.
- Harland RM. Neural induction in *Xenopus*. *Curr Op Genet Dev* 1994; 4: 543-9.
- Servetnick M, Grainger RM. Changes in neural and lens competence in *Xenopus* ectoderm: evidence for an autonomous developmental timer. *Development* 1991; 112: 177-88.
- Godsave SF, Slack JMW. Clonal analysis of mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1989; 134: 486-90.
- Grunz H, Tacke L. Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer. *Cell Diff Dev* 1989; 28: 211-8.
- Sato SM, Sargent TD. Development of neural inducing capacity in dissociated *xenopus* embryos. *Dev Biol* 1989; 134: 263-6.
- Kintner CR, Melton DA. Expression of *Xenopus* N-CAM RNA in ectoderm is an early response to neural induction. *Development* 1987; 99: 311-25.
- Jamrich M, Sargent TD, Dawid I. Cell-type-specific expression of epidermal cyto-keratin genes during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 1987; 1: 124-32.
- Hemmati-Brivanlou A, Melton DA. A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in *Xenopus* embryos. *Nature* 1992; 359: 609-14.
- Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, De Robertis EM. Regulation of neural induction by the *Chd* and *Bmp-4* antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 1995; 376: 333-6.
- Smith WB, Harland RM. Expression cloning of *noggin*, a new dorsalizing factor localized to the spemann organizer in *xenopus* embryos. *Cell* 1992; 70: 829-40.

majeure de l'embryogenèse, l'ectoderme situé sur le côté dorsal de l'embryon se transforme en neuroectoderme (figure 1A) [1-3]. La partie ventrale de l'ectoderme se différencie en tissu épidermique. Le neuroectoderme

va, en quelques heures, devenir la plaque neurale. A ce stade primaire de la différenciation, la plaque neurale possède déjà un axe antéro-postérieur et un axe médio-latéral (figure 1B). La partie antérieure de la plaque neurale

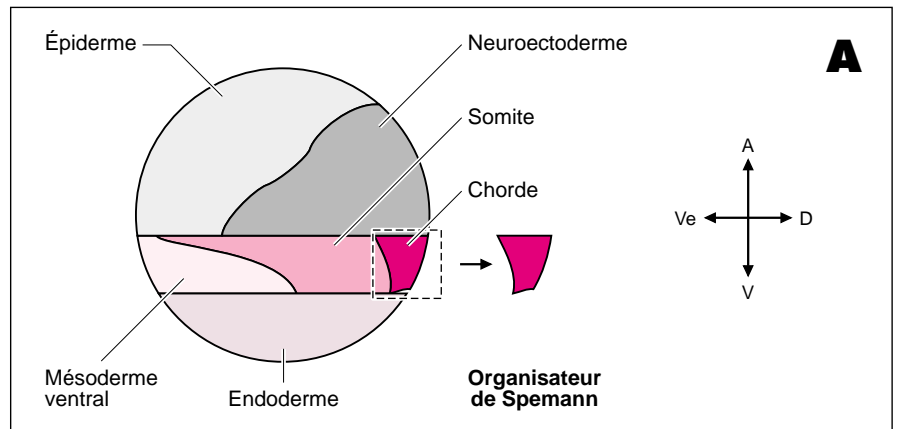


Figure 1. (A) **Topographie tissulaire de la gastrula du xénope.** L'épiderme situé sur la partie ventrale du pôle animal de la gastrula (11 heures après-fécondation) est indiqué en gris clair et le tissu neural, sur la partie dorsale du pôle animal, en gris foncé. Le mésoderme est indiqué en rose clair et rose foncé. L'organisateur de Spemann (mésoderme axial) sur le côté dorsal de l'embryon est représenté en rouge. L'organisateur de Spemann va donner naissance à la chorde. L'endoderme (pôle végétatif) est indiqué en bistre. Les axes dorsal (D), ventral (Ve) ainsi que les axes animal (A) et végétatif (V) sont représentés par une croix.

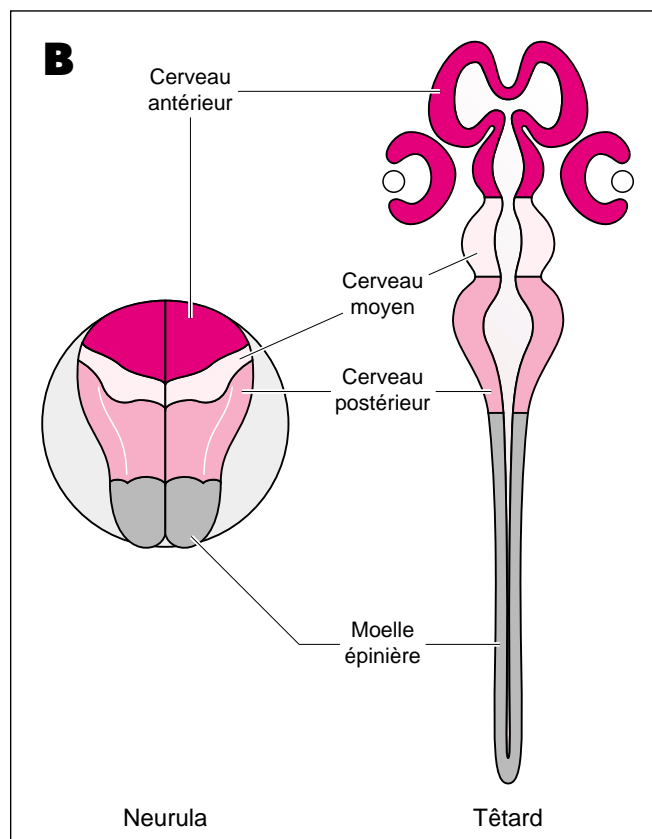


Figure 1. (B). **Topographie tissulaire de la neurula du xénope.** Vue dorsale de la plaque neurale (15 heures après-fécondation). L'axe antéro-postérieur est vertical. Le système nerveux du têtard (30 heures après fécondation) est illustré sur la partie droite du schéma.

donne naissance au cerveau et la partie postérieure forme la moelle épinière (figure 1B) [4]. Les bordures latérales de la plaque neurale fusionnent ensuite au cours du développement embryonnaire pour former le tube neural. La fusion de la plaque neurale crée alors un axe dorso-ventral. Les bordures latérales forment la partie dorsale et l'axe médian forme la partie ventrale du tube neural.

Au début du siècle, Spemann et Mangold [5] ont montré, chez la salamandre, que la transplantation de la zone marginale dorsale (l'organisateur de Spemann) d'une jeune gastrula donneuse dans la zone marginale ventrale d'une jeune gastrula receveuse, aboutit à la formation d'un axe embryonnaire surnuméraire et complet (figure 2). En particulier, un second système nerveux est formé dans l'embryon receveur. Lorsque l'organisateur de Spemann est isolé puis cultivé *in vitro*, du mésoderme à caractère axial (chorde et somites) est produit et cela sans formation de tissu neural. En outre, les expériences de marquage cellulaire montrent que l'axe nerveux surnuméraire dérive de l'embryon receveur [6]. Ces expériences suggèrent que l'ectoderme ventral, prédestiné à devenir de l'épiderme, deviendrait de type neural sous l'effet d'un signal inducteur provenant de l'implant (l'organisateur de Spemann).

L'existence de ce signal a été confirmée par des expériences de recombinaisons d'explants [7]. Lorsque la calotte animale d'une jeune blastula est isolée puis cultivée en conditions salines, seul de l'épiderme est formé (figure 3). En revanche, lorsque la zone marginale dorsale d'une jeune gastrula est combinée avec la calotte animale (ectoderme) d'une blastula, du neuroectoderme est alors induit (figure 3). Cette expérience montre que la zone marginale dorsale est la source des molécules responsables de l'induction neurale. Finalement, il a été proposé que l'épiderme correspondrait à une destinée par défaut de l'ectoderme, ne nécessitant pas de signal inducteur, alors que la formation du tissu neural serait sous le contrôle d'un signal inducteur provenant du mésoderme dorsal (pour une revue, voir [8]).

L'induction neurale dépend, d'une part, de la présence d'un inducteur

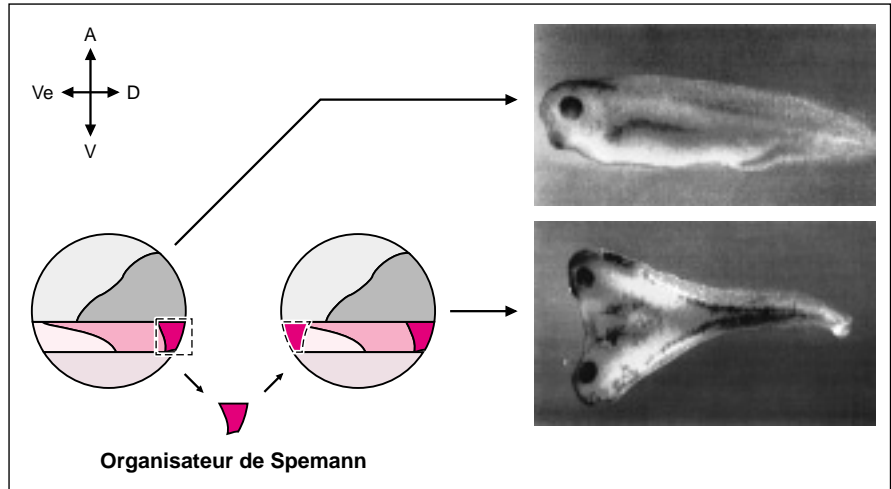


Figure 2. **L'expérience de Spemann et Mangold (1924).** L'organisateur de Spemann (mésoderme dorsal) est prélevé à partir d'une jeune gastrula donneuse (11 heures après-fécondation) et implanté dans la partie ventrale d'une gastrula receveuse. Un axe surnuméraire complet comportant un second système nerveux est formé dans l'embryon receveur.

et, d'autre part, de la compétence de l'ectoderme vis-à-vis de cet inducteur. La compétence de l'ectoderme à l'induction neurale se termine à la fin de la gastrulation [9]. La notion d'induction neurale est difficile à réconcilier avec les don-

nées obtenues plus récemment par plusieurs groupes, montrant que la dissociation cellulaire d'un explant ectodermique déclenche la formation de tissu neural [10-12]. En effet, au stade blastula, lorsqu'une calotte animale, qui est prédestinée à deve-

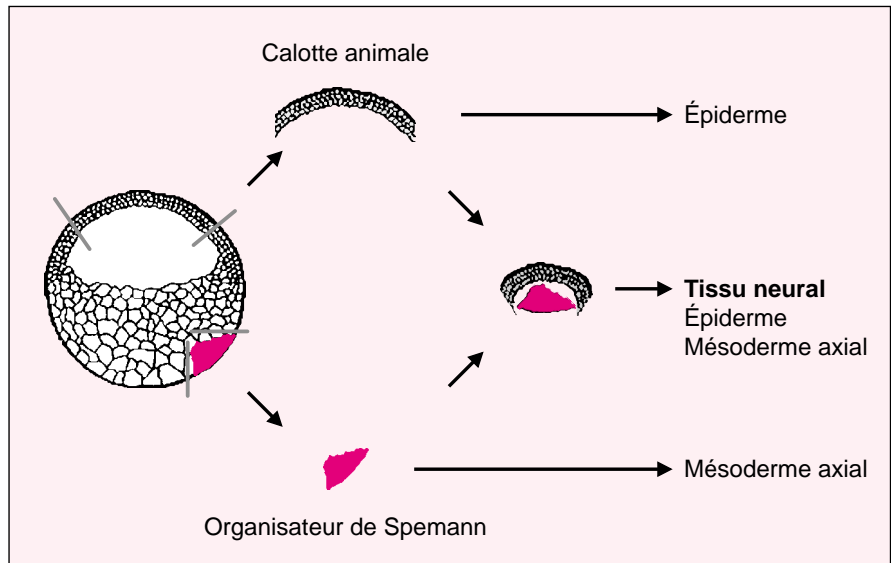


Figure 3. **L'effet « neuralisant » de l'organisateur de Spemann.** Lorsque la zone marginale dorsale d'une jeune gastrula (11 heures après-fécondation) est prélevée puis cultivée jusqu'au stade neurula (18 heures après-fécondation), seul du tissu mésodermique est formé. La calotte animale (explant ectodermique) d'une blastula (8 heures après-fécondation) se différencie *in vitro* uniquement en tissu épidermique. Lorsque la zone marginale dorsale est combinée avec la calotte animale, du tissu neural est alors induit montrant le pouvoir inducteur de l'organisateur de Spemann.

RÉFÉRENCES

18. Hemmati-Brivanlou A, Kelly OG, Melton DA. Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 1994; 77: 283-95.

19. Smith WC, Knecht AK, Wu M, Harland RM. Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing *Xenopus* mesoderm. *Nature* 1993; 361: 547-9.

20. Hemmati-Brivanlou A, Melton DA. Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in *Xenopus*. *Cell* 1994; 77: 273-81.

21. Kessler DS, Melton DA. Induction of dorsal mesoderm by soluble, mature Vg1 protein. *Development* 1995; 121: 2155-64.

22. Schulte-Merker S, Smith JC, Dale L. Effects of truncated activin and FGF receptors and of follistatin on the inducing activity of BVg1 and activin: does activin play a role on mesoderm induction. *EMBO J* 1994; 13: 3533-41.

23. Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* 1995; 376: 331-3.

24. Xu RH, Kim J, Taira M, Zhan S, Sredni D, Kung HF. A dominant negative bone morphogenetic protein 4 receptor causes neuralization in *Xenopus* ectoderm. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212: 212-9.

25. Hawley SH, Wunnenberg-Stapleton K, Hashimoto C, Laurent MN, Watabe T, et al. Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction. *Genes Dev* 1995; 9: 2923-35.

26. Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995; 9: 2105-16.

27. Hemmati-Brivanlou A, Thomsen GH. Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. *Dev Genet* 1995; 17: 78-89.

28. Nieuwkoop PD, Boterenbrood EC, Krenner A, Bloesma FFSN, Hoessels ELMJ, Meyer G, Verheyen FJ. Activation and organization of the central nervous system in amphibians. *J Exp Zool* 1952; 120: 1-108.

29. Cox WG, Hemmati-Brivanlou A. Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development* 1995; 121: 4349-58.

30. Kengaku M, Okamoto H. bFGF as a possible morphogen for the anteroposterior axis of the central nervous system in *Xenopus*. *Development* 1995; 121: 3121-30.

31. Lamb TM, Harland RM. Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, which combined with noggin generates anterior-posterior neural pattern. *Development* 1995; 121: 3627-36.

nir de l'épiderme, est dissociée pendant plusieurs heures en absence de calcium et de magnésium, du tissu neural se forme (figure 4). Ces résultats sont en apparente contradiction avec les données de l'embryologie classique puisque, lors de la dissociation cellulaire, l'induction neurale intervient en dépit de l'absence de mésoderme dorsal. De plus, ces données suggèrent l'existence d'un signal(s) inhibiteur au sein de l'ectoderme, réprimant l'induction neurale et imposant la destinée épidermique (état neural par défaut).

Caractérisation moléculaire des inducteurs du tissu neural

Depuis les expériences originelles de Spemann et Mangold [5], de nom-

breux groupes ont tenté en vain d'identifier les molécules impliquées dans l'induction neurale. Ces échecs ont été liés au choix du modèle biologique ainsi qu'aux techniques utilisées. Des explants ectodermiques (calotte animale) de salamandre étaient cultivés *in vitro* en présence de différents facteurs et le tissu neural était ensuite identifié histologiquement. Ces approches se sont avérées infructueuses car l'ectoderme de ces embryons est « neuralisé » par un grand nombre de molécules, mais cela de façon non spécifique [8].

Depuis les vingt dernières années, le xénope est devenu le modèle de choix pour l'identification des molécules impliquées au niveau embryonnaire dans les mécanismes inducteurs. La calotte animale (ectoderme) du xénope est plus robuste à l'induction neurale que ses homologues

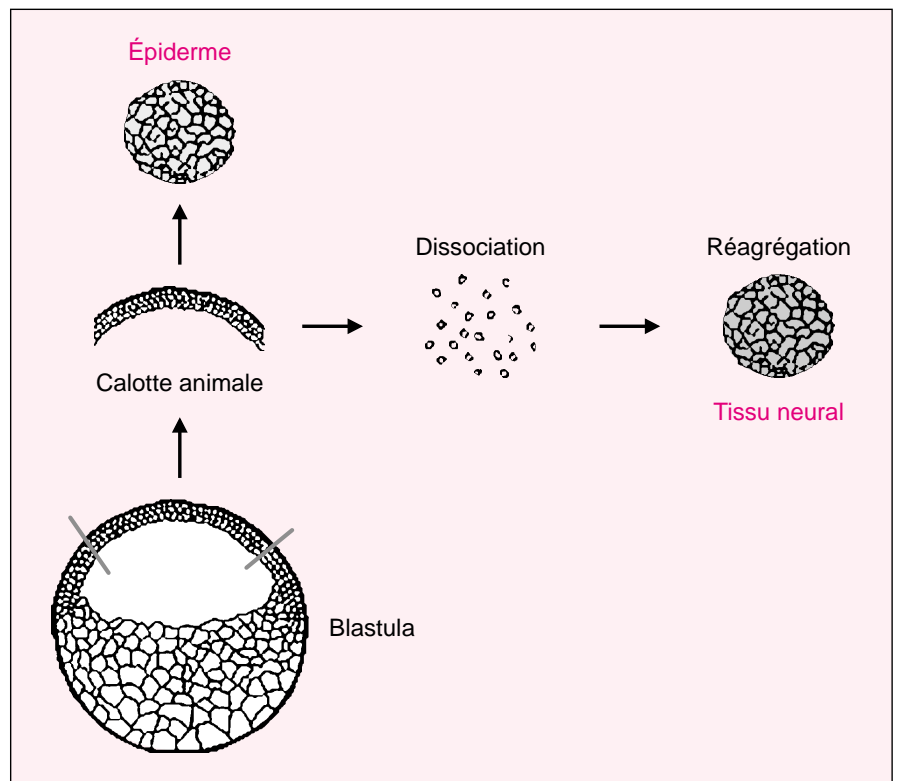


Figure 4. L'effet « neuralisant » de la dissociation cellulaire de la calotte animale. La calotte animale (cellules ectodermiques) d'une blastula (8 heures après-fécondation) est prélevée puis dissociée pendant quatre heures en absence de calcium et de magnésium. Les cellules sont ensuite agrégées à nouveau en présence de calcium et de magnésium, puis cultivées *in vitro* jusqu'au stage neurula (20 heures après-fécondation). La calotte animale intacte cultivée en présence de calcium et de magnésium donne naissance uniquement à du tissu épidermique. Lorsque les cellules sont dissociées puis agrégées à nouveau, du tissu neural est formé en absence de mésoderme.

chez les autres amphibiens. Une fois explantée, en absence de stimulation, la calotte animale se différencie invariablement en épiderme.

Les travaux les plus récents utilisent des marqueurs moléculaires, se substituant à l'examen morphologique. Ainsi, l'induction d'un type cellulaire est désormais décelée par la présence d'un marqueur moléculaire spécifique. En particulier, l'ARN messager (ARNm) codant pour la molécule d'adhérence neurale (NCAM) qui est synthétisée par toutes les cellules nerveuses de l'embryon de xénope, est un marqueur spécifique du tissu neural [13]. De même, l'ARNm codant pour la cytokératine est spécifique de l'épiderme [14]. L'introduction des techniques de biologie moléculaire (RT-PCR, protection à la RNase, etc.) permet désormais l'identification très rapide et précise de ces ARNm dans des explants tissulaires et révèle de façon fiable la présence des différents types cellulaires.

Quels sont les critères permettant de définir un inducteur neural? L'induction du tissu neural doit être directe. En effet, de nombreux facteurs, comme par exemple l'activine (un membre de la famille des facteurs TGF β), induisent du tissu neural dans des explants ectodermiques de xénope mais cela de façon indirecte [8, 15]. L'activine induit du mésoderme dorsal dans les explants ectodermiques qui induit ensuite, de façon secondaire, du tissu neural. Ces facteurs sont des inducteurs du mésoderme et non pas du tissu neural [3]. Une molécule sera donc considérée comme un inducteur neural uniquement lorsque sa synthèse dans un explant ectodermique permet d'induire du tissu neural en absence de formation de mésoderme. De plus, la molécule candidate doit être capable d'induire directement du tissu nerveux à partir d'un explant ectodermique durant la période de la gastrulation (critère temporel). Enfin, le facteur identifié doit être synthétisé dans l'organisateur de Spemann (mésoderme axial) durant la gastrulation (critère spatial). Lorsque l'ensemble de ces critères sont remplis, la molécule identifiée est alors considérée comme un inducteur neural direct [8]. Il faut cependant toujours garder à l'esprit que l'identification des facteurs can-

didats, sur la base des critères décrits ci-dessus, montre uniquement ce qu'un facteur «peut faire» dans le contexte cellulaire de la calotte animale et non ce qu'un facteur «fait» réellement dans l'embryon. Ainsi, les facteurs candidats doivent être ensuite testés dans l'embryon avec des approches qui incluent le «gain de fonction» aussi bien que la «perte de fonction».

Noggin, Follistatin et Chordin sont des protéines sécrétées qui sont synthétisées dans l'organisateur de Spemann [16-18]. Lorsque l'ARNm codant pour Noggin, Follistatin ou Chordin est exprimé dans une calotte animale, NCAM est induit en absence de formation de mésoderme [16-19]. Cela remplit l'ensemble des conditions requises pour classifier Noggin, Chordin et Follistatin comme inducteurs du tissu neural (*voir ci-dessus*). Cependant, jusqu'à très récemment le mécanisme d'action de ces protéines demeurait obscur.

L'induction neurale : suppression de l'induction épidermique

En 1994, Hemmati-Brivanlou et Melton [20] ont fait une découverte inattendue qui a révolutionné les concepts de l'induction neurale définis originellement par l'embryologie classique. Afin d'étudier le rôle de l'activine dans le processus de l'induction du mésoderme *in vivo*, ces auteurs ont fabriqué un récepteur de l'activine de type II (XAR1) dont le domaine intracellulaire correspondant à l'activité sérine/thréonine kinase est tronqué (Δ XAR1, *figure 5A*). Le récepteur Δ XAR1 se comporte alors comme un dominant négatif [15] car les récepteurs appartenant à la famille des TGF β fonctionnent par dimérisation. Ainsi, en produisant de façon hétérologue dans l'embryon de xénope le récepteur Δ XAR1, il est possible de bloquer totalement l'activité du récepteur endogène. La synthèse du récepteur Δ XAR1 supprime la formation du mésoderme axial, montrant donc que les signaux déclenchés par l'activation de ce récepteur sont requis pour l'induction du mésoderme. De façon surprenante, la synthèse de Δ XAR1 dans un blas-

tomère, qu'il soit d'origine ectodermique, mésodermique ou endodermique, conduit à la formation de tissu nerveux [20]. En particulier, les blastomères de l'hémisphère végétatif, qui normalement donnent exclusivement naissance à de l'endoderme, changent de destinée en devenant du tissu neural. Encore plus inattendu, lorsque Δ XAR1 est injecté dans un blastomère d'un embryon ventralisé par le traitement aux rayons UV (absence d'axe dorsal et de système nerveux), le blastomère injecté ainsi que ses descendants cellulaires forment du tissu nerveux qui s'organise en tube neural [20].

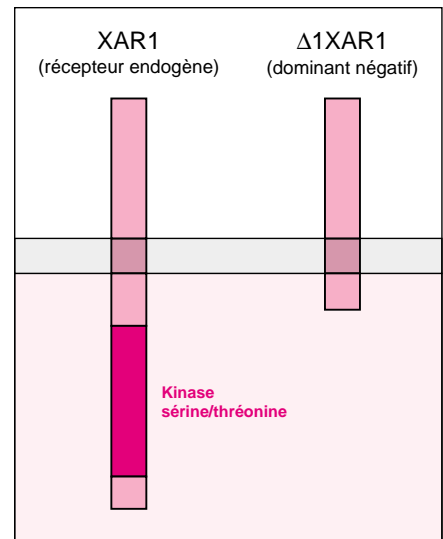


Figure 5. (A) L'induction du tissu neural par un dominant négatif du récepteur de l'activine. Les molécules d'activine (le ligand) sont dimérisées dans l'embryon, puis clivées, libérant ainsi la partie active. Lorsque l'activine (dimérisée) se fixe à son récepteur, une autophosphorylation de la partie cytoplasmique du récepteur (dimérisé) intervient, formant alors un complexe ligand-récepteur actif. Le récepteur de l'activine dont la partie cytoplasmique correspond à la kinase sérine/thréonine est tronquée, se comporte comme un dominant négatif en se dimérisant avec les récepteurs endogènes de l'activine. Lorsque le récepteur tronqué de l'activine est exprimé dans une calotte animale, les récepteurs endogènes de l'activine et de BMP-4 sont inhibés, et du tissu neural est alors formé.

RÉFÉRENCES

32. Doniach T. Basic FGF as an inducer of anteroposterior neural pattern. *Cell* 1995; 83: 1067-70.
33. Launay C, Fromentoux V, De-Li S, Boucaut JC. A truncated FGF receptor blocks neural induction by endogenous *Xenopus* inducers. *Development* 1996; 122: 869-80.
34. Ferguson EL, Anderson KV. Dorsal-ventral pattern formation in the *Drosophila* embryo: the role of zygotically active genes. *Curr Top Dev Biol* 1991; 25: 17-43.
35. Francois V, Bier E. *Xenopus* chordin and *Drosophila* short gastrulation genes encode homologous proteins functioning in dorsal-ventral axis formation. *Cell* 1995; 80: 19-20.
36. Francois V, Solloway M, O'Neill JW, Emery J, Bier E. Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene. *Genes Dev* 1994; 8: 2602-16.
37. Holley SA, Jackson PD, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM, et al. A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving *sog* and *chordin*. *Nature* 1995; 376: 249-53.
38. Waddington CH, Schmidt CA. Induction by heteroplastic grafts of the primitive streak in birds. *Wilhelm Roux Arch Entwicklunsgemech* 1933; 128: 522-63.
39. Connolly DJ, Patel K, Seleiro EA, Wilkinson DG, Cooke J. Cloning, sequencing, and expression analysis of the chick homologue of *follistatin*. *Dev Genet* 1995; 17: 65-77.
40. Kintner CR, Dodd J. Hensen's node induces neural tissue in *Xenopus* ectoderm. Implications for the action of the organizer in neural induction. *Development* 1991; 113: 1495-506.
41. Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, Kalnins VI. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol* 1982; 94: 253-62.
42. McBurney MW, Reuhl KR, Ally AI, Nasipuri S, Bell JC, Craig J. Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J Neurosci* 1988; 8: 1063-73.
43. Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against *dpp*, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1995; 139: 1347-58.
44. Graff JM, Bansal A, Melton DA. *Xenopus* Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF β superfamily. *Cell* 1996; 85: 479-87.
45. Massagué. TGF β signaling: receptors, transducers and Mad proteins. *Cell* 1996; 85: 947-50.

Sur la base de ces résultats, Hemmati-Brivanlou et Melton [20] ont proposé pour la première fois un modèle moléculaire qui postule que la spécification neurale de l'ectoderme des vertébrés intervient par défaut. Selon cette hypothèse, les signaux extracellulaires, convertis par les récepteurs de l'activine présents dans l'ectoderme (calotte animale), sont responsables de l'induction de la destinée épidermique et de l'inhibition de la destinée neurale. Le blocage de ces signaux aurait pour conséquence de dévoiler la destinée neurale et d'inhiber la formation de l'épiderme. En l'absence de cette activation tonique (effet du récepteur Δ XAR1), les cellules ectodermiques deviendraient alors par défaut des cellules nerveuses. Le modèle de l'état neural par défaut est provocateur non seulement parce qu'il contredit les conclusions de l'embryologie classique, mais aussi parce qu'il prédit l'existence d'un inducteur de l'épiderme chez les vertébrés.

Ce modèle a l'avantage d'expliquer les données plus anciennes de dissociation cellulaire de la calotte animale [10-12]. La dissociation cellulaire aurait pour effet de diluer le facteur sécrété qui joue le rôle d'inhibiteur neural et d'inducteur de l'épiderme (l'activine ou un homologue) et permettrait aux cellules ectodermiques de se transformer par défaut en neurones.

Le BMP-4 est un inducteur de l'épiderme

Des études récentes ont montré que le récepteur Δ XAR1 inhibe l'activité d'autres ligands de la famille des TGF β , tels que les protéines BMP (*bone morphogenetic proteins*) et Vg1 [21, 22]. Le ligand responsable de l'induction de l'épiderme a été identifié par un test de complémentation de cellules dispersées de la calotte animale. Le modèle de l'état neural par défaut prévoit que l'induction neurale produite par la dissociation cellulaire peut être inhibée par l'ajout de l'inducteur de l'épiderme. Lorsque la dissociation cellulaire est effectuée en présence d'activine, seul le marqueur mésodermique *Brachyury* est détecté. L'activine inhibe

donc l'état neural mais cela en transformant les cellules ectodermiques en mésoderme et non pas en épiderme. L'activine ne semble donc pas être le facteur impliqué dans l'induction de l'épiderme (ou l'inhibition neurale) [23].

Très récemment, Wilson et Hemmati-Brivanlou [23] ont montré que BMP-4 inhibe l'induction neurale par la dissociation cellulaire de la calotte animale (*voir les leçons de l'embryologie classique ci-dessus*). Lorsqu'une dissociation cellulaire de la calotte animale d'une jeune blastula est effectuée en présence de BMP-4, les marqueurs épidermiques *Epi-1* et *Cytokératine* sont détectés, alors que les marqueurs *NCAM* (neural) et *Brachyury* (mésodermique) sont absents. Ce résultat important, en accord avec le modèle de l'état neural par défaut, montre que le BMP-4 est un inducteur de l'épiderme et par conséquent un inhibiteur neural.

Le rôle de BMP-4 comme inducteur de l'épiderme ou comme inhibiteur neural a été récemment confirmé par trois approches différentes, ayant toutes en commun l'élimination de l'activité biologique du ligand BMP-4: (1) mutation du récepteur de BMP-4; (2) mutation du ligand BMP-4; (3) oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm de BMP-4.

Le récepteur Δ BMP-4R (délétion de la kinase sérine-thréonine) se comporte comme un dominant négatif et inhibe l'activité du récepteur endogène de BMP-4 (*voir les expériences avec le récepteur de l'activine décrites ci-dessus*) [24]. L'expression du récepteur Δ BMP-4R dans une calotte animale induit la synthèse du marqueur neural *NCAM*. L'expression du dominant négatif du ligand BMP-4 conduit aussi à la neuralisation de l'ectoderme en l'absence de formation de mésoderme [25]. Ces effets sont spécifiques car une mutation identique dans le gène de l'activine ne permet pas de mimer l'effet du mutant BMP-4. Enfin, ces données ont été confirmées par des expériences d'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre le ligand BMP-4 [16]. Ces résultats montrent que le BMP-4 est l'inducteur de l'épiderme responsable de l'inhibition neurale. Chez les mammifères, la mutation homozygote du locus *BMP-4* conduit à la mort embryonnaire au

stade gastrula montrant le rôle prépondérant de ce facteur durant le développement précoce [26].

Le modèle de l'état neural par défaut prévoit que l'activité de BMP-4 doit être inhibée spécifiquement dans le côté dorsal de l'ectoderme pour donner naissance au tissu neural

(figure 5B). Les facteurs dorsaux possédant une activité « neuralisante » pourraient donc agir : soit au niveau transcriptionnel en réprimant le promoteur du gène *BMP-4*, soit au niveau de la stabilité ou de la traduction de l'ARNm de *BMP-4*, soit au niveau de l'inhibition de l'activité de la protéine

BMP-4, soit encore par l'ensemble de ces mécanismes. L'étude de la distribution tissulaire de l'ARNm de *BMP-4* par hybridation *in situ* montre que l'ARNm disparaît graduellement de l'ectoderme dorsal au début de la gastrulation [27]. Le gène *BMP-4* semble donc être réprimé au niveau transcriptionnel. Aucun candidat moléculaire réglant la synthèse ou la stabilité de l'ARNm de *BMP-4* n'a à ce jour été identifié. L'inhibition de l'activité de la protéine BMP-4 a été récemment montrée. En effet, Noggin et Chordin interagissent directement avec celle-ci et inhibent son activité (R. Harland, communication personnelle, [16]). Le mécanisme d'action de la protéine Follistatin (inhibiteur de l'activine [18]), n'a pas encore été élucidé.

L'état neural par défaut : le prosencéphale

Comme indiqué ci-dessus, dès sa formation initiale, la plaque neurale possède une polarité antéro-postérieure et médio-latérale. Sur la base des observations classiques effectuées par les embryologistes du début du siècle, Nieuwkoop *et al.* [28] ont formulé une hypothèse selon laquelle la genèse du système nerveux central des vertébrés serait sous le contrôle de deux types de signaux inducteurs. Le premier signal induit la destinée neurale dans le côté dorsal de l'ectoderme de la gastrula et lui impose un caractère antérieur (proscencéphale). Le second signal ne possède pas la capacité d'induire du neuroectoderme mais, en revanche, caudalise le caractère antérieur du tissu neural et donne naissance aux structures plus caudales (mésencéphale, rhombencéphale et moelle épinière). Le tissu nerveux induit par la dissociation cellulaire de la calotte animale [10-12] ainsi que par l'ensemble des traitements inhibant l'activité BMP-4 ($\Delta 1XAR1$, Follistatin, Noggin, Chordin, mutant de BMP-4, $\Delta BMP-4R$) est de caractère antérieur (proscencéphale). L'inhibition de BMP-4 correspond donc au premier signal du modèle de Nieuwkoop [28]. La partie antérieure de la plaque neurale (proscencéphale) peut être caudalisée lorsque elle est recombinaée avec du tissu neural de type postérieur pour donner naissance aux structures intermédiaires [29]. Récemment, le

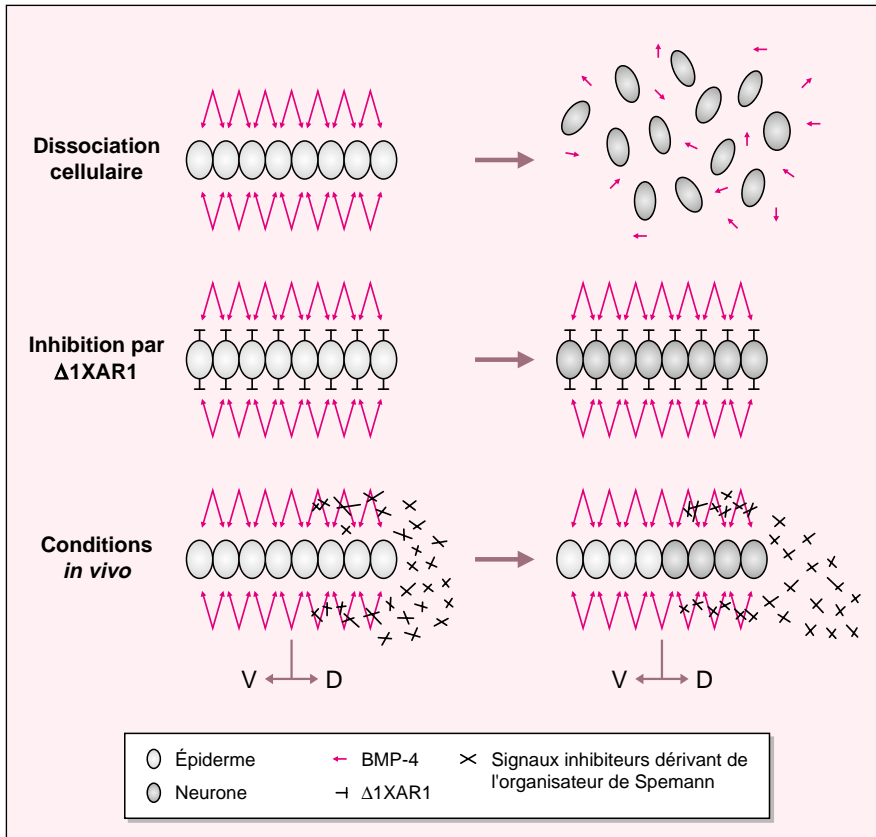


Figure 5. (B) L'induction neurale par défaut. La protéine BMP-4 ainsi que son récepteur sont synthétisés dans les cellules ectodermiques de la calotte animale. BMP-4 est l'inducteur de l'épiderme (ou l'inhibiteur neural). Lorsque une calotte animale est prélevée à partir d'une blastula (8 heures après-fécondation), puis cultivée *in vitro* jusqu'au stade neurula (20 heures après-fécondation), il y a uniquement formation d'épiderme. Lorsque les cellules de la calotte animale sont dissociées en absence de calcium et de magnésium pendant une durée de quatre heures, puis agrégées à nouveau et cultivées jusqu'au stade neurula, il y a uniquement formation de tissu nerveux. La dilution de BMP-4 (inhibiteur neural) permet l'induction neurale par défaut. Lorsque l'ARN codant pour le dominant négatif $\Delta 1XAR1$ est injecté au stade deux cellules (90 minutes après-fécondation) dans le pôle animal des blastomères, le récepteur $\Delta 1XAR1$ est synthétisé dans les cellules ectodermiques de la calotte animale de la blastula. La calotte animale de ces embryons exprimant le gène $\Delta 1XAR1$ est prélevée puis cultivée *in vitro* jusqu'au stade neurula. Les cellules ectodermiques deviennent par défaut des neurones car le dominant négatif $\Delta 1XAR1$ inhibe le récepteur de BMP-4. *In vivo*, l'organisateur de Spemann de la gastrula produit des signaux tels que Noggin et Chordin qui inhibent (directement ou indirectement) l'inducteur de l'épiderme, le BMP-4. Suite à l'inhibition de BMP-4, les cellules ectodermiques sur le côté dorsal du pôle animal forment du tissu neural par défaut. L'axe dorso-ventral est indiqué par une double flèche.

bFGF (*basic fibroblast growth factor*) a été impliqué dans les phénomènes d'induction et de caudalisation du tissu neural antérieur [29-33]. Il reste cependant à montrer la signification fonctionnelle *in vivo* du processus de caudalisation dépendant du bFGF. Ainsi, ces expériences, en accord avec le modèle de Nieuwkoop [28], suggèrent que lors de la formation du système nerveux central, un premier signal (inhibition de BMP-4 par Chordin, Noggin ou Follistatin) induirait du tissu neural de caractère antérieur (prosencephale) et un second signal (bFGF ou un homologue) caudaliserait le cerveau antérieur pour le transformer en structures plus caudales.

Conservation des mécanismes moléculaires de l'induction neurale durant l'évolution

Le modèle de l'état neural par défaut chez les vertébrés est également en accord avec les données génétiques obtenues chez les insectes [34]. En effet, chez la drosophile, Sog, l'homologue de Chordin [35], inhibe l'activité du facteur decapentaplegic (Dpp), l'homologue de BMP-4 chez les insectes [36]. Les gènes *sog* et *dpp* peuvent se substituer aux fonctions de *chordin* et de *BMP-4* chez le xénope [37]. De plus, en dehors du fait que le système nerveux de la drosophile est formé du côté ventral de l'embryon (côté dorsal chez le xénope), la localisation tissulaire de ces facteurs est conservée. En effet Sog/Chordin sont présents dans la région donnant naissance au système nerveux et Dpp/BMP-4 sont présents dans la région opposée donnant naissance à l'épiderme.

L'existence d'un tissu organisateur similaire à celui des amphibiens a aussi été montrée chez les vertébrés supérieurs. En particulier, chez le poulet, une région correspondant à la zone marginale dorsale des amphibiens a été identifiée (le nœud de Hensen) et possède aussi les propriétés d'inducteur neural *in vivo* et *in vitro* [38]. De même, chez les mammifères tels que la souris et le lapin (pour revue, voir [8]), un tissu organisateur, source des molécules responsables de l'induction neurale a

été mis en évidence. En particulier, la protéine Follistatin a été identifiée chez le poulet et l'ARNm est présent dans le nœud de Hensen (équivalent de l'organisateur de Spemann) [39]. Lorsque le nœud de Hensen des embryons de poulet est combiné avec la calotte animale d'une blastula de xénope, l'ectoderme est converti en tissu neural [40].

Les données moléculaires concernant l'induction neurale ont été obtenues pour la plupart à partir des études effectuées chez les amphibiens tels que le xénope. Néanmoins, des travaux récents effectués sur des cultures cellulaires de souris confirment le modèle de l'état neural par défaut chez les mammifères. Les cellules P19 de carcinome de souris se différencient en cellules neuronales en présence d'acide rétinoïque [41, 42]. Comme chez le xénope, les cellules P19 sont « neuralisées » par l'expression de Δ IXAR1 (Hoodless et Hemmati-Brivanlou, sous presse). De plus, l'induction du tissu neural par l'acide rétinoïque est aussi inhibée par BMP-4 (Hoodless et Hemmati-Brivanlou, sous presse). Enfin, le traitement des cellules P19 par BMP4 induit la synthèse de plusieurs marqueurs épithéliaux. Ces observations suggèrent que l'induction neurale chez les mammifères pourrait, comme chez les amphibiens, être sous le contrôle inhibiteur de BMP-4 (inhibiteur neural ou inducteur de l'épiderme).

Très récemment, les analogues du gène *mad* (*mothers against dpp*) de la drosophile [43] ont été identifiés chez le xénope (*Xmad* ou *DOTs* pour *downstream of TGF β*) [44]. En particulier, *DOT1* est impliqué dans la réponse à BMP4. L'expression de *DOT1* supprime l'induction du tissu neural dans la calotte animale par le récepteur tronqué de BMP-4 ([44, 45] et Thomson, soumis pour publication). Il semble donc que *DOT1* permet la transduction du signal BMP-4 vers le noyau cellulaire. La protéine DOT1 pourrait activer la transcription des gènes impliqués dans l'induction de l'épiderme. Selon le modèle de l'état neural par défaut, ces gènes seraient considérés comme des répresseurs neuraux et pourraient être de façon tonique induits par l'activation des récepteurs de BMP-4 dans les cellules ectodermiques, réprimant ainsi la

transcription des gènes neuraux tels que *NCAM*. En l'absence de BMP-4, ou lorsque ce complexe est inhibé par Noggin ou Chordin, les répresseurs neuraux ne seraient plus synthétisés et, ainsi, la transcription des gènes neuraux interviendrait. L'identification des gènes activés par le BMP-4 permettra, dans le futur, une meilleure compréhension de ces mécanismes.

Ces résultats suggèrent donc que les mécanismes inducteurs impliqués dans la formation du neuroectoderme seraient conservés durant l'évolution, des arthropodes jusqu'aux mammifères.

Conclusions et perspectives

Après plus de soixante-dix années d'efforts intensifs, il a été possible d'identifier chez le xénope trois molécules sécrétées (Noggin, Chordin et Follistatin) qui sont synthétisées dans l'organisateur de Spemann (mésoderme dorsal) durant la gastrulation et qui possèdent une activité d'inducteur neural. La dissection moléculaire *in vitro* des processus impliqués durant l'induction neurale a permis de proposer un modèle par défaut suggérant l'existence d'un inhibiteur neural (ou inducteur de l'épiderme), le BMP-4 (*figure 5B*). Les travaux récents décrits dans cet article montrent que ces mécanismes sont conservés durant l'évolution. Au niveau cellulaire et moléculaire, de nombreuses questions demeurent sans réponse. En particulier, l'identification des signaux impliqués dans la transduction de BMP-4, l'identification des gènes précoces induits par BMP-4, la détermination de l'établissement des frontières entre l'épiderme et le tissu neural, la régulation de la compétence de l'ectoderme durant l'induction neurale seront sans aucun doute le sujet de recherches intenses dans le futur. Cette recherche au niveau cellulaire et moléculaire aura de multiples applications: d'une part, au niveau fondamental pour élucider la cascade moléculaire impliquée dans l'établissement de la destinée neurale et épidermique et, d'autre part, pour permettre à plus long terme de concevoir des traitements rationnels dans le cadre des maladies humaines du système nerveux central et de la peau ■

Remerciements

Nous remercions Richard Harland, Jon Graff, Gerry Thomsen et Pamela Hoodless pour la communication de résultats non publiés ainsi que Georges Romey pour ses conseils lors de la rédaction de ce manuscrit. Éric Honoré remercie la Fondation Philippe et la Fondation del Duca. Ali Hemmati-Brivanlou remercie The Rockefeller University et la Fondation Searle.

TIRÉS À PART

A. Hemmati-Brivanlou.

CERLIB

3^{es} Conférences
de Recherche Hivernales

9-14 mars 1997

Les Arcs 1800

Latitudes/l'Hôtel du Golf
Les Arcs 1800

73700 Bourg-St-Maurice – France

Tél. : (33) 04 79 41 43 34

Fax : (33) 04 79 07 34 28

9-10 mars

*Proteins and free radicals, from radical
enzymes to damages*

Marc Fontecave – Jean-Louis Pierre

11-12 mars

*Oxidative effects of radiations on
biomolecules and cells*

Jean Cadet – Jean-Claude Beani

13-14 mars

Oxidative Stress and apoptosis

Alain Favier – Jacques Mathieu

Pour tout renseignement
sur le CERLIB, contacter :

Arlette Alcaraz

Laboratoire de Biochimie C

CHU Grenoble BP 217

38043 Grenoble Cedex 9

Tél. : (33) 04 76 76 57 54

Fax : (33) 04 76 76 56 64

CERLIB@ujf-grenoble.fr

Summary

The « default model » of vertebrate neural specification

Classical experiments performed in the amphibian embryo established that the vertebrate nervous system arises, during gastrulation, from inductive interactions between the dorsal mesoderm and the overlying ectoderm. Transplantation of the gastrula dorsal lip in the ventral side of a host embryo results in a twin embryo with a complete ectopic dorsal axis in the ventral side [5]. Lineage tracing experiments have shown that while the axial mesoderm in the ectopic axis is derived from the explant itself, the nervous system is derived from the ventral ectoderm of the host embryo which otherwise would have formed epidermis [6]. While these experiments demonstrated that gastrula dorsal mesoderm, termed the « organizer », can change the fate of ectodermal cells from epidermal to neural, only recently has the molecular nature of these organizer signals begun to be elucidated. Experiments performed in amphibians have led to the characterization of three diffusible factors, noggin, follistatin and chordin, all localized in the organizer, the embryonic source of neural inducing signals [16, 18, 19]. These factors can change the fate of ectodermal cells from epidermal to neural directly without concomitant mesoderm induction. Based on studies with TGF- β antagonists, such as the truncated activin receptor (Δ IXAR1) and follistatin, we proposed that the formation of the nervous system in vertebrates is under negative control and requires the inhibition of an inhibitor, activin or a related factor, which can be antagonized with Δ IXAR1 and follistatin [18, 20]. We called this the « default model » of vertebrate neural specification. This model provides the molecular link between the observation made by classical experimental embryologists and more recent experiments involving dissociated animal caps. Several groups have shown that animal caps, which give rise to epidermis if kept intact, will form neural tissue if the cells of the explants are disso-

ciated for several hours [10-12]. These results suggest that dilution of a diffusible « neural inhibitor » from the explants provides another way to eliminate a neural inhibitor. Later experiments demonstrated that BMP4, another member of TGF- β superfamily, can inhibit neural specification and induce epidermis in dissociated *Xenopus* embryonic ectodermal cells, pointing to the involvement of BMP4 in cell fate decisions in the context of the ectoderm [23]. Recent experiments with chordin, noggin and dominant negative forms of BMP4 ligands and receptors support this hypothesis [16, 24, 25], thus providing additional evidence for the default model and for neuralization being under inhibitory control. Interference with TGF- β signaling in a mammalian embryonic cell line also leads to the specification of neural cells, and BMP4 inhibits the retinoic acid induced neural differentiation suggesting that the molecular strategy behind neural determination has been conserved throughout vertebrate evolution. Thus, the model emerging from these results proposes that the default state of *Xenopus* ectoderm is neural, that BMP4, and possibly other members of the TGF- β family inhibit neuralization, and that BMP4 induces cells to become epidermal. The isolation and characterization of proteins involved in neural and epidermal induction has immediate health related consequences. Factors which induce neural differentiation in ectodermal and mesodermal cells may provide insights into regeneration of neural tissue in adults and, in the long term, may provide therapy for diseases involving loss of neuronal cells, including stroke and neurodegenerative diseases. In addition, the characterization of an epidermal inducer may lead to treatments for skin injuries and diseases. The collection of this type of knowledge will provide the basis for development of rational treatments.