

## Biologie du développement

### Développement : naissance et contrôle de l'asymétrie

*L'asymétrie est une caractéristique essentielle du développement des organismes : une cellule mère donne naissance à deux cellules filles de destins différents, les embryons se développent selon des axes rostro-caudal et dorso-ventral, les organes sont asymétriquement répartis par rapport à un plan sagittal... Comment différencier le devenir des cellules adjacentes d'un même lignage ? Comment reconnaître le côté gauche du côté droit ? De premières réponses à ces énigmes ont été apportées à la fin de l'année 1995, dont celles développées dans l'article de François Schweisguth et Alain Israël (voir p. 155 de ce numéro). Nous verrons ici les mécanismes supplémentaires créateurs de diversité des cellules filles, chez les eucaryotes et les procaryotes. L'une des conséquences de la diversification des phénotypes des cellules filles peut être la création de l'asymétrie gauche-droite dont les manifestations et signaux précoces ont été détectés.*

## Comment engendrer la diversité cellulaire au cours du développement ?

Un des aspects les plus intrigants des divers systèmes de développement est la création de deux cellules différentes à partir d'une cellule souche unique. Cette différence se manifeste par l'expression de gènes spécifiques dans chacune des deux cellules [1]. Un exemple simple est celui de la formation d'une spore multirésistante par les bactéries du genre *Bacillus* lorsqu'elles sont soumises à des conditions défavorables à la croissance [2]. Il a été récemment rapporté que de telles spores, vieilles de plus de 25 millions d'années, avaient pu être « ressuscitées » à partir du tube digestif d'une abeille emprisonnée par une coulée de résine à l'époque oligocène (*m/s n° 11, vol. 11, p. 1615*) [3] ! L'élaboration d'une forme dormante aussi perfectionnée exige la mise en œuvre d'environ 200 gènes qui sont exprimés de façon coordonnée au cours des 7 à 8 heures que prend le processus dans les conditions du laboratoire [4]. Tout commence par une division en position polaire qui conduit à la formation de deux cellules de tailles inégales, contenant chacune une copie du chromosome bactérien. La plus petite (la préspore) est destinée à devenir la spore et va survivre. La plus grande (la cellule mère) va ingérer la préspore par endocytose, puis participer à la maturation de celle-ci, pour finalement la libérer dans le milieu extérieur par un processus d'autolyse [5]. L'expression différentielle des gènes dans la préspore et dans la cellule mère est la conséquence de la présence de facteurs de transcription spécifiques, les facteurs sigma, qui ne sont actifs que dans l'une des deux cellules. Si les diverses régulations coordonnant l'activation des gènes

dans la préspore et dans la cellule mère lors de la phase tardive du processus sont maintenant assez bien comprises, il restait une « boîte noire » majeure, celle des mécanismes assurant l'établissement de la différenciation, c'est-à-dire l'apparition de facteurs sigma spécifiques aussitôt après la division polaire [2]. Des résultats récents ont permis d'apporter des éléments de réponse à cette question.

### L'activation du premier facteur de transcription dans la préspore

La synthèse d'un septum en position polaire s'accompagne rapidement de l'activation du facteur  $\sigma^F$  dans la préspore [6]. Celui-ci est synthétisé avant division en même temps que deux protéines régulatrices, SpoIIAA (117 acides aminés) et SpoIIAB (146 acides aminés). Les données génétiques indiquaient que SpoIIAB est un antagoniste de  $\sigma^F$  (l'inactivation du gène *spoIIAB* conduit à une suractivité de  $\sigma^F$ ), tandis que SpoIIAA est un antagoniste de SpoIIAB (l'inactivation du gène *spoIIAA* élimine l'activité  $\sigma^F$ , sauf si *spoIIAB* est lui aussi inactivé) [7]. Des approches biochimiques menées en parallèle par les groupes de M. Yudkin (Oxford, Grande-Bretagne) et R. Losick (Cambridge, MA, USA) ont ensuite démontré que SpoIIAB est capable de se lier *in vitro*, soit à  $\sigma^F$  (l'empêchant ainsi d'interagir avec l'ARN polymérase), soit à SpoIIAA (perdant ainsi la capacité de séquestrer  $\sigma^F$ ). L'activation de  $\sigma^F$  dans la préspore semblait donc découler de l'interaction alternative de SpoIIAB avec  $\sigma^F$  ou SpoIIAA [8-11]. Il restait à comprendre la nature du signal induisant ce changement de partenaire.

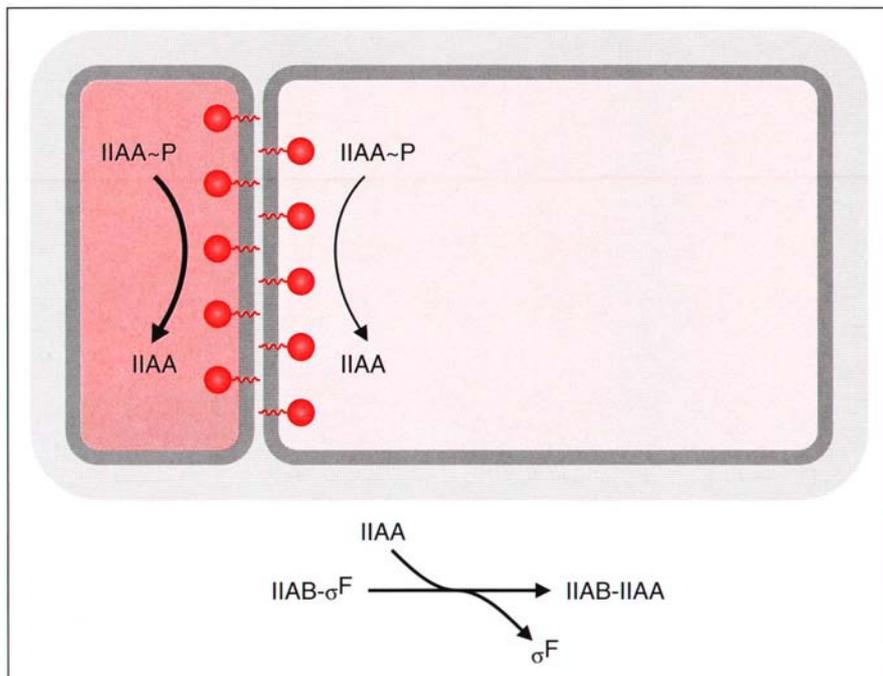


Figure 1. **Activation de  $\sigma^F$  dans la préspore.** La formation d'un septum en position polaire divise la bactérie en deux cellules de taille inégale (cette différence est encore plus accentuée que sur la figure). La protéine SpoIIIE est ancrée dans la membrane (région en gris), sur les deux faces du septum, sa partie soluble (symbolisée par les globules rouges) étant orientée vers le cytoplasme. La déphosphorylation de SpoIIAA~P par SpoIIIE se fait efficacement dans la préspore (partie gauche de la figure), mais peu ou pas dans la cellule mère (partie droite de la figure). Les molécules de SpoIIAA non phosphorylées sont capables de déplacer SpoIIAB de son complexe avec  $\sigma^F$  et de libérer ce facteur de transcription spécifiquement dans la préspore.

Il a en outre été observé que SpoIIAB possède une activité de protéine kinase qui lui permet, *in vitro*, de phosphoryler SpoIIAA sur le résidu Sérine 58 [9]. La forme phosphorylée de SpoIIAA n'est pas capable d'interagir avec SpoIIAB [10, 11]. Cela a conduit à deux types de modèles: soit il existe un *pool* de molécules SpoIIAA non phosphorylées, capables de libérer  $\sigma^F$  de SpoIIAB dans la préspore, soit un mécanisme encore inconnu permet de régénérer des molécules SpoIIAA non phosphorylées dans la préspore, par néosynthèse ou par déphosphorylation [11].

La recherche de la nature du signal impliqué dans la levée de l'inhibition de  $\sigma^F$  a mis en évidence le rôle du produit du *locus spoIIIE*. Des mutations nulles dans ce *locus* empêchent l'activation de  $\sigma^F$ , sauf dans le cas des mutants du gène *spoIIAB* qui présentent une activité  $\sigma^F$  constitutive (ce qui entrave la formation du septum polaire et bloque ainsi la sporulation) [6]. Le gène *spoIIIE* est exprimé après l'entrée en phase stationnaire et avant la division polaire. Il code pour une protéine de 827 acides ami-

nés, contenant une dizaine de segments transmembranaires. Le rôle de SpoIIIE dans l'activation de  $\sigma^F$  vient d'être élucidé par une approche *in vitro* qui a été rendue possible, d'une part, par la purification d'une forme tronquée et soluble de SpoIIIE, d'autre part, par la préparation *in vitro* de la forme de SpoIIAA phosphorylée par SpoIIAB [12]. Il est apparu que SpoIIIE est capable de déphosphoryler SpoIIAA~P (c'est-à-dire la forme phosphorylée de SpoIIAA) et de contrebalancer l'effet inhibiteur de SpoIIAB sur la transcription par l'ARN polymérase associée à  $\sigma^F$ . La reconnaissance de SpoIIAA~P par SpoIIIE est très spécifique puisqu'elle est abolie par le remplacement du résidu Ser58 par un résidu Thr (qui reste une cible de la phosphorylation *in vitro* par SpoIIAB). La séquence de SpoIIIE est apparentée à celle d'autres protéines bactériennes aux fonctions mal connues mais elle ne présente pas de similitude flagrante avec d'autres phosphatases.

La découverte de la fonction phosphatase de SpoIIIE ne résout cependant pas la question de l'activation

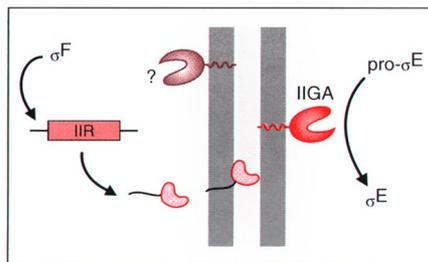
de  $\sigma^F$  seulement dans la préspore. Puisque la protéine SpoIIIE est synthétisée avant septation elle pourrait être ségrégée de façon uniforme dans les deux cellules. Pour analyser ce point la localisation sub-cellulaire de SpoIIIE a été examinée par microscopie de fluorescence en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la partie soluble de SpoIIIE et un anticorps secondaire couplé à un radical fluorescent [13]. Ces travaux ont démontré que la protéine SpoIIIE est ciblée aux deux régions proches des pôles de la cellule qui peuvent devenir le lieu d'assemblage du septum, pour finalement s'accumuler quasiment exclusivement dans le septum naissant. Ces données ont été complétées et confirmées par l'emploi d'une protéine hybride dans laquelle SpoIIIE est greffée à la GFP, une protéine douée d'autofluorescence qui permet de travailler sur des cellules vivantes. Il existe donc dans la protéine SpoIIIE un motif lui permettant de s'incorporer spécifiquement dans la membrane du septum en cours de formation. Une telle localisation a pour conséquence de concentrer les

molécules de SpoIIE sur une surface limitée de la cellule (*figure 1*). Bien que les quantités de SpoIIE soient sans doute les mêmes dans les deux cellules (sauf à imaginer que SpoIIE puisse s'intégrer sur une seule face du septum) il reste que sa concentration par rapport à son substrat (SpoIIAA~P) est beaucoup plus grande dans la préspore (environ 7 fois, en tenant compte des différences de volume des cytoplasmes des deux cellules). Peut-être ce paramètre joue-t-il un rôle crucial, tel que l'association de SpoIIE avec le septum suffise à déclencher l'apparition d'une quantité suffisante de molécules de déphospho-SpoIIAA seulement dans la préspore. Mais on ne peut exclure pour l'instant qu'il existe d'autres niveaux de régulation faisant dépendre l'activité phosphatase de SpoIIE d'un signal (de nature métabolique, par exemple) engendré seulement dans la préspore [10].

### Comment la préspore induit la différenciation de la cellule mère

Le programme de différenciation de la cellule mère est déclenché par le facteur de transcription  $\sigma^E$  [14]. Celui-ci est synthétisé avant septation sous la forme d'un précurseur inactif, pro- $\sigma^E$ , contenant une proséquence de 27 acides aminés. L'enzyme qui catalyse la maturation de pro- $\sigma^E$  est une enzyme membranaire, le produit du gène *spoIIGA* qui est cotranscrit avec le gène codant pour pro- $\sigma^E$  [15]. Puisque  $\sigma^E$  n'est actif que dans la cellule mère, il est admis (bien que non démontré) que sa maturation n'a lieu que dans celle-ci. On savait que toutes les mutations bloquant l'activation de  $\sigma^F$  empêchaient également l'apparition de  $\sigma^E$  sous sa forme mûre, y compris des mutations ponctuelles dans la partie de  $\sigma^F$  impliquée dans la reconnaissance des promoteurs [16]. Il était donc vraisemblable que  $\sigma^F$  activait un (ou des) gène(s) dont le produit, synthétisé dans la préspore, était capable d'activer la maturase SpoIIGA dans la cellule mère. Aucune mutation ne permettait de définir ce gène.

Celui-ci vient d'être cloné simultanément par deux équipes, selon deux approches totalement différentes.



**Figure 2. Activation de  $\sigma^E$  dans la cellule mère en réponse à  $\sigma^F$  dans la préspore.** L'apparition de  $\sigma^F$  sous forme active dans la préspore (partie gauche de la figure) conduit à la transcription du gène *spoIIR*. Son produit, la protéine SpoIIR (en rose) est capable de traverser la membrane (région en gris) grâce à sa séquence signal. La présence de peptidoglycane dans l'espace intraseptal (région en gris clair) n'est pas un obstacle à l'action de SpoIIR sur la protéase SpoIIGA ancrée dans la membrane de la cellule mère. Cette interaction conduit à la maturation de pro- $\sigma^E$  en  $\sigma^E$  spécifiquement dans la cellule mère (partie droite de la figure). L'action éventuelle de SpoIIR sur les molécules de SpoIIGA présentes dans la membrane de la préspore reste matière à spéculation.

Dans un cas, il s'agissait d'identifier, après mutagenèse chimique, des clones ayant perdu l'activité  $\sigma^E$  mais ayant conservé l'activité  $\sigma^F$  (repérés sur milieux indicateurs adéquats *via* l'expression d'une fusion avec le gène *lacZ* ou le gène *gus*). Les mutations ainsi obtenues ont ensuite été cartographiées sur le chromosome et le locus affecté a été caractérisé au sein d'une région du génome de *B. subtilis* soumise au séquençage systématique [17]. Dans l'autre cas, une banque plasmidique de séquences de *B. subtilis* sous la forme de gènes de fusion avec le gène marqueur *lacZ*, codant pour la  $\beta$ -galactosidase, a été introduite dans une souche de *B. subtilis* dont le gène *spoIIE* est activé en présence de xylose. Le xylose active donc la synthèse de la phosphatase SpoIIE, ce qui conduit à l'activation de  $\sigma^F$  et des gènes qu'il contrôle. Les

séquences de *B. subtilis* transfectées s'intègrent par recombinaison homologue dans les gènes chromosomiques correspondants, plaçant le gène *lacZ* sous le contrôle de leurs régions régulatrices. Le crible consistait donc à détecter des clones synthétisant la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du xylose, permettant de détecter les loci sous le contrôle de  $\sigma^F$ . Ceux-ci ont été inactivés par génétique inverse et l'un d'eux, *spoIIR*, s'est avéré avoir toutes les caractéristiques attendues d'un locus impliqué dans la signalisation entre  $\sigma^F$  et  $\sigma^E$ . Son inactivation bloque la maturation de pro- $\sigma^E$ , tandis que son expression hétérochronique (sous le contrôle d'un promoteur soumis à un autre type de régulation temporelle) suffit à activer *spoIIGA* et à déclencher l'apparition de la forme active de  $\sigma^E$  [18]. La protéine SpoIIR est le seul produit synthétisé dans la préspore sous le contrôle de  $\sigma^F$  qui soit nécessaire à la maturation de  $\sigma^E$ .

La séquence de SpoIIR indique la présence d'une séquence signal permettant à la protéine d'être exportée à travers la membrane de la préspore. Effectivement, il a été possible de trouver dans le surnageant de cellules de *B. subtilis* exprimant le gène *spoIIR* une activité capable d'induire *in vitro* la maturation de pro- $\sigma^E$  après incubation avec des protoplastes fabriqués à partir de cellules de *B. subtilis* en croissance exponentielle produisant SpoIIGA et pro- $\sigma^E$  [19]. Ces résultats suggèrent fortement que la protéine SpoIIR sort de la préspore et interagit avec la protéase SpoIIGA insérée dans la membrane de la cellule mère. Il est vraisemblable que cette interaction est optimale dans l'espace intraseptal où les deux cellules sont en contact étroit (*figure 2*). On ne peut encore exclure qu'il existe certains intermédiaires entre SpoIIR et SpoIIGA qui soient présents dans les cellules en croissance exponentielle et qui correspondraient à des protéines produites de façon constitutive.

Il reste à comprendre comment le signal engendré par SpoIIR (et dont la nature biochimique est encore inconnue) n'agit que sur les molécules de SpoIIGA présentes dans la membrane de la cellule mère. Il est crucial

que cette signalisation soit directionnelle, puisqu'elle doit permettre l'apparition de  $\sigma^E$  uniquement dans la cellule mère. Quel que soit ce mécanisme (par exemple l'apparition dans la préspore, sous le contrôle de  $\sigma^F$ , d'un antagoniste de SpoIIIGA ou de  $\sigma^E$ ) [16], la découverte de SpoIIR permet maintenant de comprendre comment la différenciation de la petite cellule en préspore (sous l'action du facteur de transcription  $\sigma^F$ ) peut induire dans la grande cellule voisine sa différenciation en cellule mère (par l'apparition du facteur de transcription  $\sigma^E$ ). Cette communication intercellulaire à un stade très précoce du développement peut se révéler un paradigme pour d'autres systèmes plus évolués de différenciation ■

## RÉFÉRENCES

- Horvitz HR, Herskowitz I. Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* 1992; 68: 237-55.
- Losick R, Stragier P. Crisscross regulation of cell-type specific gene expression during development in *Bacillus subtilis*. *Nature* 1992; 355: 601-4.
- Cano RJ, Borucki MK. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* 1995; 268: 1060-4.
- Stragier P. A few good genes: developmental loci in *Bacillus subtilis*. In: *Regulation of bacterial differentiation*, Washington: American Society for Microbiology, 1994: 207-45.
- Errington J. Sporulation in *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol Rev* 1993; 57: 1-33.
- Margolis P, Driks A, Losick R. Establishment of cell type by compartmentalized activation of a transcription factor. *Science* 1991; 254: 562-5.
- Schmidt R, Margolis P, Duncan L, Copolecchia R, Moran CP Jr, Losick R. Control of developmental transcription factor  $\sigma^F$  by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9221-5.
- Duncan L, Losick R. SpoIIAB is an anti-sigma factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein  $\sigma^F$  from *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2325-9.
- Min KT, Hilditch CM, Diederich B, Errington J, Yudkin MD.  $\sigma^F$ , the first compartment specific transcription factor of *Bacillus subtilis*, is regulated by an anti-sigma factor which is also a protein kinase. *Cell* 1993; 74: 735-42.
- Alper S, Duncan L, Losick R. An adenosine nucleotide switch controlling the activity of a cell type-specific transcription factor in *B. subtilis*. *Cell* 1994; 77: 195-205.
- Diederich B, Wilkinson JF, Magnin T, Najafi SMA, Errington J, Yudkin MD. Role of interactions between SpoIIAA and SpoIIAB in regulating cell-specific transcription factor  $\sigma^F$  of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 1994; 8: 2653-63.
- Duncan L, Alper S, Arigoni F, Losick R, Stragier P. Activation of cell-specific transcription by a serine phosphatase at the site of asymmetric division. *Science* 1995; 270: 641-4.
- Arigoni F, Pogliano K, Webb CD, Stragier P, Losick R. Localization of protein implicated in establishment of cell type to sites of asymmetric division. *Science* 1995; 270: 637-40.
- Driks A, Losick R. Compartmentalized expression of a gene under the control of sporulation transcription factor  $\sigma^E$  in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9934-8.
- Stragier P, Bonamy C, Karmazyn-Campelli C. Processing of a sporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*: how morphological structure could control gene expression. *Cell* 1988; 52: 697-704.
- Shazand K, Frandsen N, Stragier P. Cell-type specificity during development in *Bacillus subtilis*: the molecular and morphological requirements for  $\sigma^E$  activation. *EMBO J* 1995; 14: 1439-45.
- Karow ML, Glaser P, Piggot PJ. Identification of a gene, *spoIIR*, which links the activation of  $\sigma^E$  to the transcriptional activity of  $\sigma^F$  during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2012-6.
- Londoño-Vallejo JA, Stragier P. Cell-cell signaling pathway activating a developmental transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 1995; 9: 503-8.
- Hofmeister AEM, Londoño-Vallejo A, Harry E, Stragier P, Losick R. Extracellular signal protein triggering the proteolytic activation of a developmental transcription factor in *B. subtilis*. *Cell* 1995; 83: 219-26.

### Patrick Stragier

Institut de Biologie Physico-Chimique, 13, rue Pierre-et-Marie-Curie, 75005 Paris, France.

## TIRÉS À PART

P. Stragier.