médecine/sciences 1998 ; 14 : 340-3

Une horloge moléculaire liée à la segmentation des vertébrés

L'aspect segmenté, ou métamérique, est caractéristique de nombreuses classes d'animaux depuis les invertébrés jusqu'à l'homme. La segmentation du corps correspond à la répétition le long de l'axe antéro-postérieur de structures similaires incluant généralement des dérivés de plusieurs feuillets embryonnaires. Chez les vers annélides, tels que le ver de terre, la segmentation se manifeste par l'importante succession d'anneaux qui forment le corps de l'animal. Chez les vertébrés adultes, la segmentation est particulièrement évidente au niveau des vertèbres et du système nerveux périphérique. Cette segmentation de l'adulte dérive de la mise en place chez l'embryon de structures métamériques mésodermiques appelées somites [1]. Dans de nombreuses espèces, un rôle majeur de la segmentation antéro-postérieure de l'axe du corps est de permettre l'articulation et le mouvement de structures rigides telles que le squelette. Cela est particulièrement vrai chez les insectes où l'exosquelette cuticulaire est segmenté, ou bien chez les vertébrés où c'est l'endosquelette (la colonne vertébrale) qui se subdivise en segments. Bien que la segmentation soit considérée comme une caractéristique fondamentale de nombreuses classes d'animaux, il est généralement admis que ce processus est apparu de manière indépendante au cours de l'évolution en particulier chez les vertébrés et les invertébrés.

Depuis les premiers cribles de mutants du développement embryonnaire chez la mouche réalisés par Nüsslein-Volhart et Wieschaus dans les années 1980, une masse considérable de données moléculaires a été obtenue sur les mécanismes de la segmentation chez cet insecte [2, 3]. On connaît maintenant la hiérarchie génétique impliquée dans la mise en place du patron segmenté de l'embryon [4]. Une première catégorie de gènes maternels intervient pour définir l'axe antéro-postérieur matérialisé par l'établissement d'un gradient d'une protéine régulatrice, bicoid *(m/s n° 5, vol. 12, p. 639)*. Ce gradient va permettre une activation dépendante de la concentration des gènes zygotiques de la catégorie *gap* qui sont des facteurs de transcription s'exprimant dans de larges domaines antéro-postérieurs de l'embryon. La combinatoire de l'expression de ces gènes *gap* va favoriser l'expression d'une nouvelle classe de régulateurs appelés gènes *pair rule* dont l'expression divise l'embryon en 7 bandes positives alternant avec 7 bandes négatives, préfigurant ainsi les futurs 14 segments du corps de l'adulte. Finalement, les gènes *pair rule* activent une dernière catégorie de gènes appelés gènes de polarité segmentaire, responsables de la mise en place des frontières définitives des segments du corps [5]. De nombreux analogues vertébrés des gènes de segmentation de la drosophile ont aujourd'hui été identifiés ; pour leur majorité, ils ne s'expriment pas dans les somites qui constituent la structure embryonnaire segmentée par excellence des vertébrés. Par ailleurs, l'invalidation génique chez la souris de plusieurs composantes de la voie de signalisation *Notch-Delta* démontre l'implication de ces gènes dans la somitogenèse alors que, chez la drosophile, ces gènes ne paraissent pas jouer de rôle majeur dans la segmentation [6-8]. Par conséquent, ces résultats ont été considérés comme des arguments supplémentaires à l'encontre de mécanismes communs impliqués dans la segmentation des vertébrés et des invertébrés. Cette idée s'oppose toutefois à l'extrême conservation des mécanismes moléculaires de l'embryogenèse observée entre la mouche et les vertébrés, par exemple au niveau des gènes *Hox*, ou des gènes de mise en place de l'axe dorso-ventral.

Récemment, quelques éléments sont venus ébranler cette idée. Un analogue du gène *pair rule hairy* a été identifié chez le poisson-zèbre et son expression a été décrite comme étant de type *pair rule* chez cet organisme [9]. Par ailleurs, l'analogue du gène *engrailed* de l'amphioxus, récemment identifié, s'exprime dans la partie postérieure des somites de la tête, à l'instar de la mouche chez laquelle il s'exprime dans la partie postérieure de chaque segment [10]. Ces observations ont suffi pour relancer le débat concernant la segmentation d'*Urbilateria*, l'ancêtre commun des vertébrés et des invertébrés [11, 12].

Nous avons étudié un analogue aviaire du gène *pair rule hairy* de drosophile, appelé c-*hairy1* [13]. L'analyse de la séquence de ce gène montre qu'il code pour un facteur de transcription contenant un domaine basique hélice-boucle-hélice et un tétrapeptide WRPW* carboxy-terminal caractéristique de la famille des répresseurs transcriptionnels du type hairy et enhancer of split. L'analyse phylogénétique de cette séquence montre qu'elle est plus apparentée au

* *Try-Arg-Pro-Try.*

gène *hairy* de drosophile qu'à la famille des gènes *enhancer of split* qui ne jouent pas de rôle dans la segmentation de la mouche. L'analyse par hybridation *in situ* de l'expression de ce gène montre un patron très dynamique dans le territoire présomptif des somites appelé mésoderme présomitique.

Chez l'embryon de poulet comme chez tous les vertébrés, les somites constituent la manifestation la plus évidente de la segmentation. Ces structures mésodermiques sont des sphères épithéliales produites séquentiellement selon un gradient crânio-caudal. Les somites se forment bilatéralement de manière coordonnée toutes les 90 minutes chez le poulet à partir du mésoderme présomitique. Ce dernier est mis en place au cours de la gastrulation au niveau de la ligne primitive puis du bourgeon caudal, et il apparaît sous forme de deux bandelettes de mésenchyme encadrant le tube neural dans la partie caudale de l'embryon. Ce mécanisme de segmentation progressive du mésoderme présomitique est très différent du mode de formation des segments de la mouche chez laquelle tous les segments sont déterminés d'un seul coup le long de l'axe antéro-postérieur. Il est à rapprocher des modes de segmentation d'autres insectes tels que la sauterelle ou bien des annélides chez lesquels les segments sont progressivement ajoutés à partir d'une zone caudale, plus immature [14]. Contrairement à la situation décrite chez la drosophile, on sait extrêmement peu de choses sur les aspects moléculaires de ces autres modes de segmentation.

En compilant des observations réalisées sur un grand nombre d'embryons dotés exactement du même nombre de somites, et grâce à un système de somitogenèse *in vitro*, nous avons déterminé le patron d'expression du gène c-*hairy1* au cours de la somitogenèse aviaire. Nous avons ainsi démontré que, durant les 90 minutes que prend la formation d'un somite, son ARN messager suit une séquence d'expression complexe dans le mésoderme présomitique, qui apparaît comme une vague progressant de la partie postérieure vers la partie antérieure de l'embryon *(figure 1A)*. Cette vague se rétrécit de plus en plus au fur et à mesure qu'elle avance antérieurement de telle sorte qu'elle finit par se restreindre à la partie caudale du somite nouvellement formé. L'expression de c-*hairy1* est maintenue dans les somites nouvellement

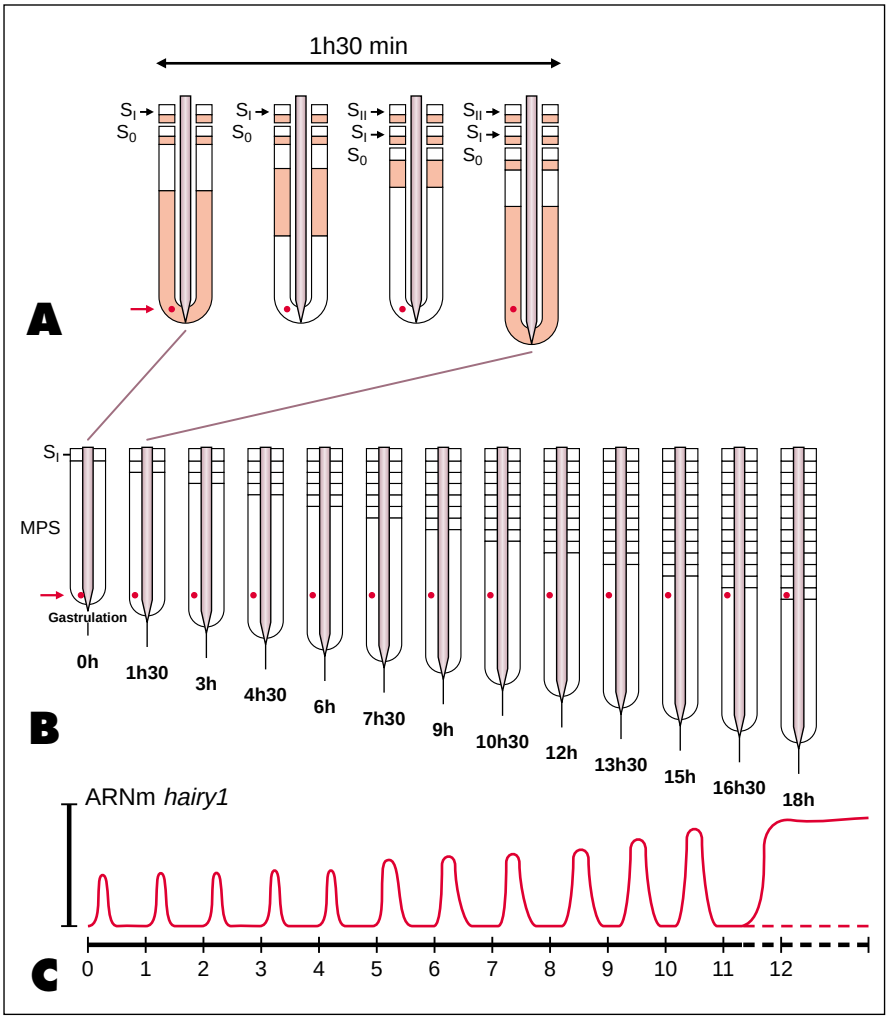

Figure 1. ***Expression du gène* hairy *pendant la somitogenèse*. *A.*** *Représentation schématique de l'expression de c-*hairy1 *dans le mésoderme présomitique au cours de la formation d'un nouveau somite (en rose). Cette expression apparaît comme une vague provenant de la partie postérieure de l'embryon qui semble migrer vers la partie antérieure en voyant son domaine devenir de plus en plus étroit au fur et à mesure qu'elle progresse. Le domaine d'expression de c-*hairy1 *finit par définir la partie caudale du somite nouvellement formé où son expression reste maintenue. S0 : somite en formation, SI : dernier somite formé, SII : avant-dernier somite formé.* ***B.*** *Histoire d'une cellule du mésoderme présomitique (MPS) entre sa sortie de gastrulation (0 h) et le moment où cette cellule devient elle-même incorporée dans un somite (18 h). Étant donné que le mésoderme présomitique contient 12 somites en devenir, 12 somites vont se former dans cet intervalle de temps (un par heure et demie). La cellule est figurée en rouge.* ***C.*** *Oscillations de la quantité d'ARN c-*hairy1 *dans la cellule figurée en B durant le temps que celle-ci passe dans le mésoderme présomitique. Au 12e cycle, l'expression de c-*hairy1 *est maintenue si la cellule appartient au compartiment caudal du somite ou disparaît si la cellule se retrouve dans le somite rostral.*

formés. De manière surprenante, cette vague d'expression est reproduite à l'identique au cours de la formation de chaque somite.

Plusieurs explications pouvaient être envisagées pour rendre compte de la propagation d'une telle vague dans le mésoderme présomitique. La première consistait à présumer que ce mouvement de l'expression de c-*hairy1* reflétait en réalité le déplacement massif de cellules exprimant c-*hairy1*. Des expériences de marquage cellulaire ont permis d'écarter cette éventualité. Une deuxième hypothèse consistait à proposer l'existence d'un signal produit de manière périodique toutes les 90 minutes dans la partie postérieure de l'embryon. La propagation de ce signal dans le mésoderme présomitique permettrait l'activation progressive de l'expression de c-*hairy1*. Des expériences d'ablation de la partie caudale de l'embryon ont permis d'établir que cette opération n'affecte ni la progression ni la cinétique de la vague d'expression de c-*hairy1*. Par conséquent, il semble que cette dynamique d'expression corresponde à une propriété entièrement intrinsèque du mésoderme présomitique. Cette propriété a été établie en démontrant que la cinétique d'expression n'est pas affectée dans des cultures d'explants de mésoderme présomitique isolés des structures avoisinantes telles que l'ectoderme, le tube neural. Reste à savoir si cette rythmicité est maintenue dans des cellules dissociées. Par conséquent, la vague apparente d'expression de c-*hairy1* ne dépend ni de mouvements cellulaires ni de phénomènes propagatoires et semble définir une propriété intrinsèque du mésoderme présomitique.

D'autre part, au cours de la formation de chaque somite, cette vague apparente balaye la totalité du mésoderme présomitique, depuis les cellules les plus immatures localisées postérieurement, près du site de gastrulation, jusqu'à celles qui vont former le prochain somite. A chaque formation de somite, toute cellule du mésoderme présomitique va donc connaître une phase d'expression transitoire du gène c-*hairy1*. Étant donné que le mésoderme présomitique contient 12 somites en devenir, chacune de ses cellules connaîtra 12 phases d'expression de c-*hairy1* entre le moment où elle quitte la gastrulation et le moment où elle est incorporée dans un somite *(figure 1B, C)*. Par conséquent, nous avons proposé que ces oscillations du taux d'expression de l'ARN messager de c-*hairy1* réitérées toutes les 90 minutes identifient une horloge moléculaire liée à la segmentation somitique. De manière remarquable, l'existence d'une telle horloge dans les cellules du mésoderme présomitique avait été prédite il y a près d'une vingtaine d'année sur la base de considérations théoriques par Jonathan Cooke (Londres, GB) dans un modèle de somitogenèse appelé le *clock and wavefront model* [15]. Claudio Stern (Cambridge, GB), à la suite de travaux plus récents, avait proposé que cette horloge corresponde au cycle cellulaire qui dure environ 9 heures dans ces cellules [16]. Cependant, la périodicité de la séquence d'expression du gène c-*hairy1* n'est que de 90 minutes et nos résultats sont difficiles à réconcilier avec le modèle du cycle cellulaire.

A l'heure actuelle, les mécanismes d'horloges moléculaires les mieux décrits sont ceux des horloges circadiennes spécialisées dans la régulation des rythmes jour/nuit et dont la période est de 24 h [17-19]. Le fonctionnement de ces horloges repose en général sur des mécanismes transcriptionnels impliquant des boucles d'autorégulation négatives. Bien que le gène c-*hairy1* code pour un répresseur transcriptionnel, et pourrait donc s'autorégler négativement, le blocage de la synthèse protéique n'a pas d'effet sur sa dynamique d'expression. Il semble donc improbable que c-*hairy1* fasse partie du mécanisme de l'horloge. Son expression rythmique pourrait simplement refléter l'existence de cette horloge qui reposerait plutôt sur des mécanismes d'action post-traductionnels. Du fait de son expression dans la partie caudale du somite, le rôle de c-*hairy1* pourrait être dévolu à la spécification de ce compartiment somitique. Les vagues de production de l'ARN messager de c-*hairy1* pourraient aussi être utilisées par les cellules pour mesurer le temps écoulé dans le mésoderme présomitique. Ces oscillations conduiraient à l'accumulation d'une protéine stable (soit c-*hairy1*, soit une protéine dont l'expression est contrôlée par c-*hairy1*) qui déclencherait la somitogenèse lorsqu'un seuil correspondant au douzième cycle de production de la protéine serait atteint.

Nos travaux mettant en évidence les oscillations de la quantité d'ARN messager du gène c-*hairy1* dans le mésoderme présomitique suggèrent l'existence d'une horloge moléculaire liée à la segmentation somitique, dont nous pensons qu'elle pourrait être responsable de la genèse de la périodicité caractéristique de la segmentation des vertébrés [13]. Outre le fait qu'il s'agisse d'un nouveau type d'horloge à l'œuvre au cours du développement, cette dernière possède des propriétés tout à fait remarquables. La plus étonnante est sans aucun doute l'extrême coordination spatiale des oscillations de l'expression de l'ARN messager de c-*hairy1* à l'origine de ce mouvement de vague apparente balayant le mésoderme présomitique lors de la formation du somite. Nous savons que ces oscillations sont une propriété intrinsèque du tissu et nous cherchons à établir si elles constituent une propriété intrinsèque des cellules. Notre objectif est aussi de mieux caractériser le moteur moléculaire de ces oscillations. Enfin, une conclusion importante de ces études au plan évolutif concerne le fait que l'homologue d'un gène de segmentation *pair rule* de drosophile soit aussi impliqué dans le processus de segmentation chez les vertébrés. Cette observation constitue un argument supplémentaire dans le sens d'une conservation plus importante qu'il n'est généralement envisagé entre les modes de métamérisation des insectes et de l'homme ■

Remerciements

Les auteurs remercient Pascale Malapert pour sa lecture critique du manuscrit. Ces recherches ont été financées par le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), l'Association Française contre les Myopathies (AFM), et l'association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). I. Palmeirim est boursière du programme de thèse de la Fondation Gulbenkian (Portugal).

RÉFÉRENCES

1. Pourquié O. La ségrégation des lignages somitiques. *Med Sci* 1997; 13: 1145-56.

2. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature* 1980; 287: 795-801.

3. Deutsch J, Lamour-Isnard C, Lepesant J. Le prix Nobel 95 attribué à Ed Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard et Éric Wieschaus: la reconnaissance de la génétique du développement. *Med Sci* 1995; 11: 1625-8.

4. Lawrence PA. The Making of a Fly. Oxford: Blackwell Science, 1992.

5. Bellaïche Y, Perrimon N. La voie de signalisation Wingless chez la drosophile. *Med Sci* 1997; 13: 166-74.

6. Conlon RA, Reaume AG, Rossant J. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 1995; 121 : 1533-45.

7. Schweisguth F, Israël A. Signalisation intercellulaire par le récepteur Notch: conservation de la drosophile aux mammifères. *Med Sci* 1996; 12: 155-63.

8. Hrabe de Angelis M, McIntyre J, Gossler A. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DIII. *Nature* 1997; 386: 717-21.

9. Muller M, von Weizsacker E, Campos-Ortega JA. Expression domains of a zebrafish homologue of the Drosophila pair-rule gene hairy correspond to primordia of alternating somites. *Development* 1996; 122: 2071-8.

10. Holland LZ, Kene M, Williams NA, Holland ND. Sequence and embryonic expression of the amphioxus engrailed gene (AmphiEn): the metameric pattern of transcription resembles that of its segment-polarity homolog in Drosophila. *Development* 1997; 124: 1723-32.

11. Kimmel CB. Was Urbilateria segmented? *Trends Genet* 1996; 12: 329-31.

12. De Robertis EM. Evolutionary biology. The ancestry of segmentation. *Nature* 1997; 387: 25-6.

13. Palmeirim I, Henrique D, Ish-Horowicz D, Pourquie O. Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 1997; 91: 639-48.

14. Weisblat DA, Wedeen CJ, Kostriken RG. Evolution of developmental mechanisms: spatial and temporal modes of rostrocaudal patterning. *Curr Top Dev Biol* 1994; 29; 101-34.

15. Cooke J, Zeeman EC. A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J Theor Biol* 1976; 58: 455-76.

16. Stern CD, Fraser SE, Keynes RJ, Primmett DR. A cell lineage analysis of segmentation in the chick embryo. *Development* 1988; 104: 231-44.

17. Sassone-Corsi P. Rhythmic transcription and autoregulatory loops: winding up the biological clock. *Cell* 1994; 78: 361-4.

18. Dunlap JC. Genetics and molecular analysis of circadian rhythms. *Annu Rev Genet* 1996; 30: 579-601.

19. Couderc J. Mécanismes moléculaires du fonctionnement et de la remise à l'heure de l'horloge biologique. *Med Sci* 1996; 12: 798-801.

Olivier Pourquié

Docteur en biologie, chargé de recherche Cnrs, responsable d'équipe ATIPE. Laboratoire de génétique et de physiologie du développement (IBDM), Cnrs-Inserm-Université de la Méditerranée-AP de Marseille, Campus de Luminy. Case 907, 13288 Marseille Cedex 09, France.

Isabel Palmeirim

Docteur en médecine. Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire, Cnrs et Collège de France, 49 bis, avenue de La Belle-Gabrielle, 94736 Nogent-sur-Marne Cedex, France.

TIRÉS À PART

O. Pourquié.

L'Institut pour la Recherche sur la Moelle Épinière (IRME)

organise à Deauville, les 14-15-16 octobre 1998,
son 4e Symposium International sur les

Lésions traumatiques de la moelle épinière

5 thèmes seront abordés :

• Neuroprotection • Modèles animaux • Activité de la moelle sous-lésionnelle
• Imagerie des lésions traumatiques de la moelle épinière • Régénération

Une exposition permanente de posters se tiendra pendant ces journées.

Comité Scientifique
Président : Pr Michel Hurth

Comité d'Organisation
Président : Pr Alain Privat

Renseignements : IRME - 45, rue Vineuse 75116 PARIS
Tél. : 01 44 05 15 43 - Fax 01 44 05 15 22 - E-mail irme @ wanadoo.fr