

Biologie du développement : frontières et organisation

Nous avons développé, dans de précédents numéros de médecine/sciences, l'importance des notions d'asymétrie, de gradient de morphogène et de migration cellulaire contrôlée en biologie du développement. C'est le concept de frontière et de limite qui est particulièrement illustré dans ce numéro. Une frontière est, par essence, une discontinuité entre deux schémas d'organisation qui peuvent être interdépendants si la frontière est aussi le siège du centre organisateur des structures en deçà et au-delà. De telles frontières organisatrices sont très nombreuses au cours du développement de tous les organismes : frontières entre les segments des structures métamériques, entre la partie dorsale et la partie ventrale de l'embryon, etc. Au cours du développement du système nerveux central, l'isthme, situé entre le métencéphale et le mésencéphale, est à proximité immédiate d'un organisateur gouvernant la différenciation dorsale en toit optique en avant et en cervelet en arrière. La différenciation des structures antérieures en toit optique exige un signal d'origine postérieure qui peut être le FGF-8. En revanche, le signal d'origine antérieure, nécessaire à la différenciation du cervelet, n'est pas connu. La plaque motrice est un autre schéma de différenciation nécessitant des influences inductrices réciprocques. L'axone en croissance sécrète l'agrine qui se fixe à un récepteur musculaire à activité kinasique, la MuSK. Des souris dépourvues d'agrine ou de MuSK n'ont pas de plaque motrice. Ainsi, avançons-nous dans la compréhension des mécanismes du développement du système nerveux, assez comparable chez tous les vertébrés, voire de la mouche à l'homme. Les fonctions cognitives, en revanche, n'ont pas la même permanence au cours de l'évolution, ce qui doit mettre en garde contre des approches par trop réductionnistes des mécanismes de la conscience. Peut-être est-ce dans de telles tendances que réside l'origine des déboires rencontrés dans la recherche des gènes de susceptibilité à des maladies psychiatriques, notamment la psychose maniaco-dépressive.

FGF-8, un signal impliqué dans l'organisation du tube neural

La formation du système nerveux des vertébrés nécessite la mise en place d'une multitude de types cellulaires dont l'agencement est crucial pour l'établissement du réseau de connexions qui sous-tendent les fonctions cérébrales. Au cours du développement, un jeu d'interactions successives permet d'atteindre à cette extrême précision d'une manière à la fois reproductible et très souple. Dans un premiers temps, des signaux provenant de structures non nerveuses comme le mésoderme et l'ectoderme permettent une grossière régionalisation du système nerveux [1]. Des signaux émanant des cellules nerveuses elles-mêmes viennent très rapidement se combiner aux premiers pour en moduler l'action et augmenter la complexité des états cellulaires. Dès la formation des premiers somites, les interactions à l'intérieur de la plaque neurale sont devenues prépondérantes.

L'organisateur de Spemann

Les signaux qui agissent à ce stade sont de deux sortes. D'une part, de petits signaux qui voyagent de proche en proche sont constitutifs d'un effet de communauté : si l'on transplante un groupe assez grand de cellules voisines dans une autre région du tube nerveux, elles maintiennent leur première identité. Les cellules transplantées ne sont pas déterminées (voir plus loin) mais elles sont déjà engagées dans une voie de différenciation sous le fait d'instructions plus anciennes et elles la maintiennent par solidarité [2]. D'autre part, il existe des régions restreintes dans le tube nerveux qui manifestent des propriétés d'organisateur. Transplantées en position

ectopique, elles sont capables de modifier profondément l'identité des structures nerveuses environnantes. Les organisateurs sont des structures biologiques aux propriétés fascinantes. Composés d'un petit groupe de cellules, ils ne sont particuliers ni au système nerveux ni aux vertébrés. Leur prototype est la lèvre dorsale du blastopore ou organisateur de Spemann qui assure la formation et l'unicité de l'axe embryonnaire chez les amphibiens [3]. Spemann et Mangold ont montré, voici plus de 70 ans, que la transplantation en position ectopique d'une lèvre dorsale surnuméraire induit la formation par l'hôte d'un second embryon (voir [1]). On peut se représenter un organisateur comme un oscillateur produisant une onde qui se propage et peut induire ou réorienter la formation d'une constellation d'états cellulaires labiles mais stationnaires. Ce sont ces états qui sont désignés en général par le terme d'informations de position et qui, maintenus assez longtemps, orientent irréversiblement le devenir cellulaire vers une identité de position.

Les recherches visant à identifier les facteurs responsables de la formation et de la fonction de l'organisateur de Spemann ont été stimulées par ses étonnantes propriétés. Des molécules appartenant à plusieurs familles de facteurs de transcription et de molécules sécrétées qui semblaient impliquées dans le réseau d'interactions cellulaires qui constituent l'organisateur ont ainsi été identifiées. Ces facteurs sont liés par des interrégulations croisées. Ainsi, l'injection d'ARN codant pour un seul élément de la cascade régulatrice dans le pôle animal de l'embryon de xénope suffit

à induire la formation d'un organisateur surnuméraire et d'un second axe embryonnaire. En particulier, le facteur de transcription Goosecoid et certains membres de la famille Wnt de protéines sécrétées, comme Wnt-1 et Wnt-8, peuvent à eux seuls déclencher la formation d'un organisateur de Spemann ectopique.

Autres organisateurs: l'organisateur isthmique

D'autres régions organisatrices ont été étudiées en détail: la frontière organisatrice du segment et la région de la marge de l'aile chez la drosophile, la zone d'activité polarisatrice du bourgeon de membre des vertébrés, et deux organisateurs du tube neural formés, l'un par le couple notochorde/plaque du plancher, l'autre par l'organisateur isthmique. L'un des résultats les plus surprenants de ces études est que certaines familles de molécules, et peut-être certaines boucles de régulation, sont recrutées de manière répétée dans les régions organisatrices. Une région organisatrice pourrait être caractérisée par la convergence et l'interrégulation d'une combinaison de boucles d'interactions cellulaires dont le répertoire serait relativement limité.

L'organisateur isthmique a été découvert récemment à la suite d'expériences visant à étudier la détermination de différentes régions du tube neural d'embryons aviaires par des transplantations hétérotopiques effectuées entre les stades 9 et 16 somites. A ces stades, le tube neural forme plusieurs renflements ou vésicules qui préfigurent les grandes subdivisions du cerveau adulte (figure 1). L'organisateur isthmique est placé en avant de la constriction (isthme) qui sépare les vésicules més- et métencéphaliques et au centre d'un territoire du tube neural caractérisé par l'expression des gènes à homéoboîtes *En-1* et *En-2*. La partie dorsale de ce domaine donnera naissance au cervelet et au toit optique. Des fragments de neuroépithélium isthmique transplantés dans une région antérieure ou postérieure au domaine normal d'expression d'*En-1/2* (figure 2A), maintiennent leur identité présomptive et modifient le

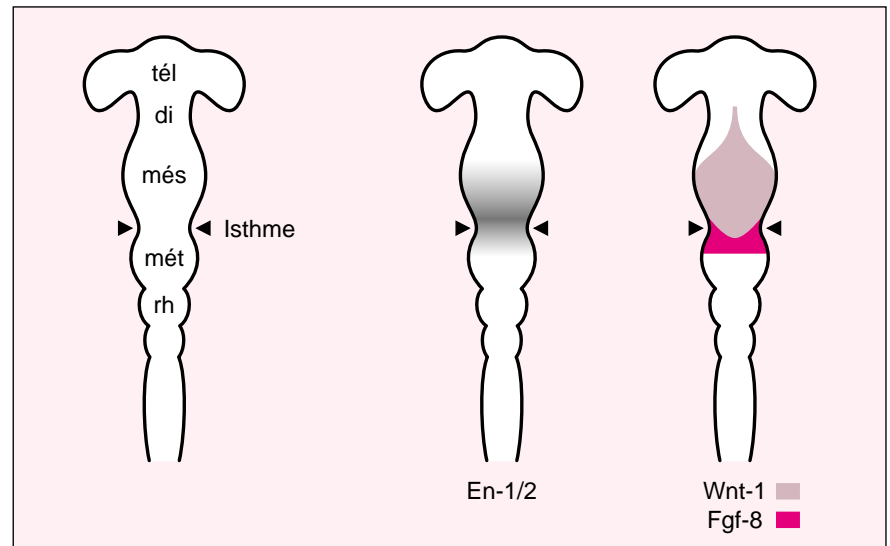


Figure 1. **Principales subdivisions du tube neural de poulet au stade 12 somites** (1,5 jour d'incubation). A gauche: télencéphale (tél), diencéphale (di), mésencéphale (més), métencéphale (mét) et rhombencéphale (rh). La région de l'isthme est indiquée par des têtes de flèches. Au centre et à droite sont représentés, respectivement, les domaines de synthèse des facteurs de transcription à homéodomaine *En-1* et *En-2* (grisé) et des molécules signalisatrices *Wnt-1* (bistre) et *FGF-8* (rouge).

devenir du territoire adjacent de l'hôte [4]. Vingt-quatre à 48 heures après transplantation, le neuroépithélium de l'hôte commence à exprimer *En-1/2* au contact du greffon. A des stades plus tardifs, le neuroépithélium de toit optique ou de cervelet selon qu'il est situé dans un domaine antérieur (diencéphale) ou postérieur (rhombencéphale) par rapport à la région mét/mésencéphalique. Seules certaines régions du tube neural sont compétentes et modifient leur phénotype en réponse à l'organisateur isthmique; en particulier, les parties les plus antérieures du tube ne réagissent pas à la présence d'un greffon isthmique qui, d'ailleurs, s'y intègre difficilement. D'autre part, les différences de phénotype observées dans différentes régions du tube neural en réponse à l'induction suggèrent que le signal isthmique n'est pas instructif mais seulement permissif (voir plus loin).

L'identification de molécules impliquées dans la formation ou la fonction de l'organisateur isthmique s'est faite un peu par hasard. D'une part, les gènes à homéoboîtes *En-1* et -2

(homologues de *en* de drosophile) et *Otx-1* et -2 (homologues de *otd* de Drosophile) ont été identifiés à la suite de l'effort général pour cloner des homologues chez les vertébrés de divers gènes de développement de la drosophile. L'étude du profil d'expression des gènes *En*, isolés d'abord chez la souris puis chez d'autres vertébrés, a montré qu'ils étaient exprimés très tôt à la jonction mét/mésencéphalique du tube neural. *Wnt-1* d'autre part, a d'abord été identifié sous le nom de *int-1* (integration site 1) comme un protooncogène activé par l'insertion préférentielle, dans ses séquences régulatrices, du virus MMTV responsable de la formation de tumeurs mammaires chez la souris. Lorsque *Int-1* a été cloné, on s'est aperçu qu'il codait pour une protéine sécrétée et était exprimé précocement à la jonction mét/mésencéphalique du tube neural [5]. L'analyse des séquences et des tests de complémentation fonctionnelle ont montré que *int-1* était l'homologue du gène *wg* de drosophile. *int-1* a alors été rebaptisé *Wnt-1* pour *wg* related integration site 1. *wg* et *en* sont des gènes

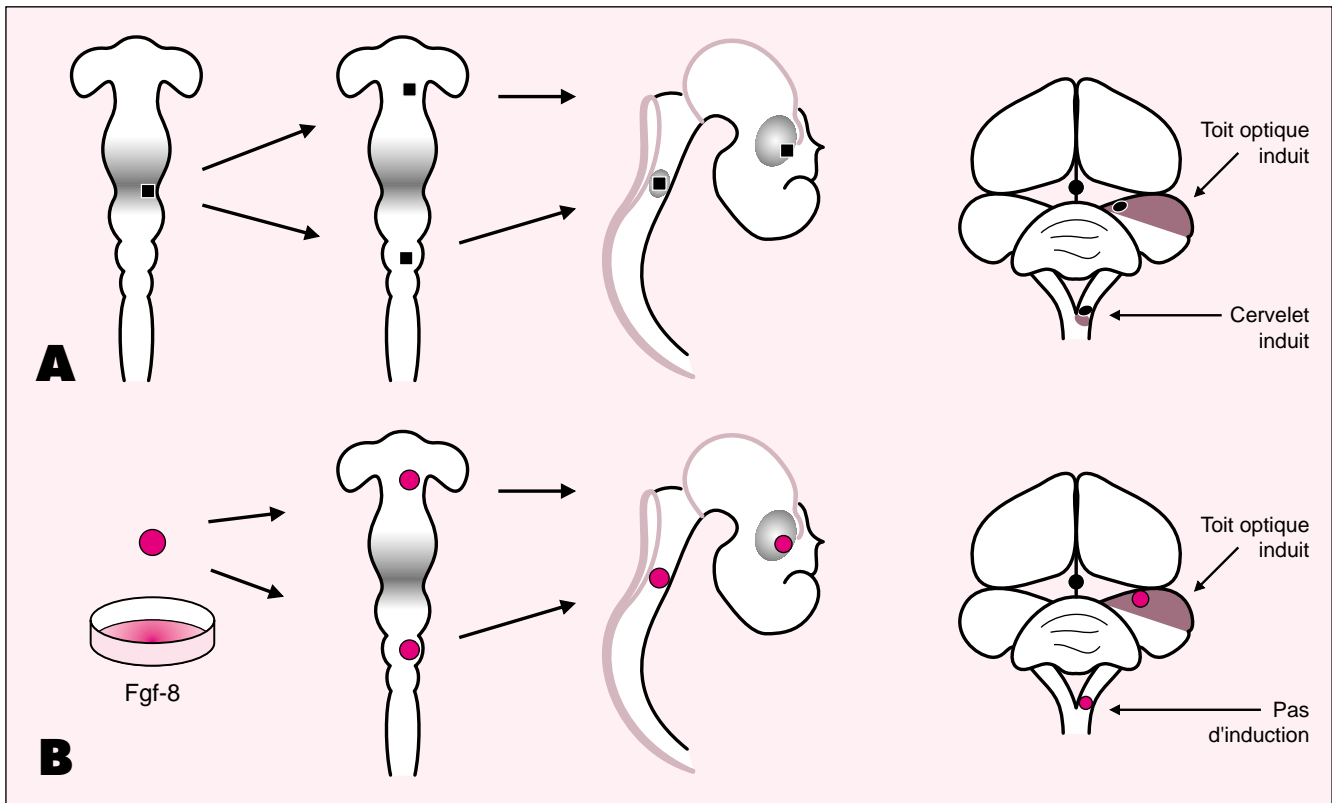


Figure 2. A. Mise en évidence des propriétés organisatrices de l'isthme. Un greffon (noir) prélevé dans la région isthmique d'un embryon aviaire (9-12 somites) est transplanté dans le diencéphale ou dans le rhombencéphale d'un autre embryon aviaire au même stade. Deux jours après transplantation une synthèse ectopique de *En-2* est induite dans le tissu nerveux de l'hôte au contact du greffon. A des stades plus tardifs, le neuroépithélium induit change de phénotype et adopte une identité mét/mésencéphalique: le diencéphale forme un toit optique et le rhombencéphale forme un cervelet. **B. Une bille d'héparine-acrylique trempée dans une solution de FGF-8 reproduit l'effet d'un greffon isthmique lorsqu'elle est placée dans le diencéphale mais elle n'a pas d'effet sur le rhombencéphale.**

dits de segmentation impliqués dans l'organisation des segments de drosophile.

L'inactivation par recombinaison homologue des gènes *Wnt-1* [6] et *En-1* [7] chez la souris a montré que leurs fonctions étaient nécessaires à des stades précoces pour le développement du mésencéphale et du métencéphale. La majeure partie du cervelet et du mésencéphale manquant dans le cerveau des mutants *Wnt-1^{-/-}* ou *En-1^{-/-}*. Ces données suggèrent que les interactions génétiques qui modèlent les segments de drosophile pourraient être similaires à celles qui organisent le territoire mét/mésencéphalique du tube neural des vertébrés. En effet, les segments de drosophile sont organisés par des signaux provenant de la frontière du parasegment qui marque la limite entre la rangée de cellules

exprimant *wg* et celle exprimant *en* (figure 3). Comme pour *Wnt-1* et *En-1*, les deux gènes de Drosophile sont d'abord mis en route indépendamment. Plus tard, vers le stade 5-7 somites chez la souris, ils commencent à s'intégrer de telle sorte que l'expression de l'un décline puis disparaît en réponse à l'absence de l'autre. Pour essayer d'identifier des gènes impliqués dans la fonction de l'organisateur isthmique, on s'est donc tout naturellement tourné vers la recherche d'autres gènes de vertébrés homologues de gènes de segmentation de la drosophile [8]. *Hedgehog* (*hh*), en particulier, qui code pour une autre molécule sécrétée et qui joue un rôle majeur dans l'organisation des segments: en effet, *hh* constitue le signal en retour des cellules exprimant *en* vers celles exprimant *wg* (figure 3). Des homologues

de *hh*, constituant une famille comportant au moins quatre membres différents, ont été clonés simultanément chez la souris [9], le poulet et le poisson zèbre. Il s'est avéré qu'aucun de ces gènes n'était exprimé à la jonction mét/mésencéphalique mais qu'ils étaient probablement impliqués dans plusieurs autres interactions cellulaires. L'un de ces gènes *shh* a été étudié plus en détail parce qu'il était exprimé dans deux structures organisatrices bien caractérisées, la notochorde/plaque du plancher du tube neural et la zone d'activité polarisatrice du bourgeon de membre. Il a pu être montré dans les deux cas que l'expression ectopique de *shh* est suffisante, d'abord pour induire les gènes caractéristiques d'un nouvel organisateur, puis en mimer la fonction inductrice [10].

Une nouvelle molécule inductrice de l'organisateur isthmique: FGF-8

Le signal responsable de l'action inductrice de l'organisateur isthmique restait mystérieux, d'autant que le résultat d'expression ectopique de *Wnt-1* dans le tube neural semblait l'impliquer dans le contrôle de la prolifération ou le maintien des cellules dans un état réceptif plutôt que comme signal inducteur. Un tel signal vient enfin d'être identifié par le groupe de G. Martin [11, 12]. Il s'agit du FGF-8 une protéine sécrétée de la famille des *fibroblast growth factors* dont plusieurs membres sont impliqués dans la formation du bourgeon de membre et le maintien de l'expression de *shh* et de l'activité polarisatrice. Il avait été montré que l'on pouvait induire un membre surnuméraire chez le poulet en implantant une bille imbibée de FGF-2 ou FGF-4 entre les bourgeons des membres antérieur et postérieur. C'est en essayant d'identifier la molécule endogène agissant comme inducteur que Crossley *et al.* [10] ont isolé FGF-8. Comme c'est le cas pour *shh*, *Fgf-8* s'exprime dans plusieurs structures inductrices comme le mésoderme néphrogénique, la crête apicale ectodermique du bourgeon de membre et surtout dans la région isthmique du tube neural juste au contact du domaine d'expression de *Wnt-1* (figure 1). Une bille imbibée de FGF-8 implantée dans le diencéphale d'un embryon de poulet mime l'effet d'un greffon isthmique et modifie le phénotype du tissu adjacent (figure 2B). L'expression des gènes *Fgf-8* endogène et *en-2* est induite 24 heures après l'implantation et, après 48 heures, on observe une modification du profil d'expression de *Wnt-1*. A des stades plus tardifs, le tissu proscéphalique de l'hôte forme un toit optique surnuméraire au lieu des structures thalamiques attendues. Dans la région du tube antérieure à la constriction isthmique, les mêmes domaines sont compétents à répondre à une induction isthmique et à l'implantation d'une bille imbibée de FGF-8. Cependant, bien que FGF-8 puisse mimer son activité dans le tube neural antérieur, il est évident que d'autres signaux contri-

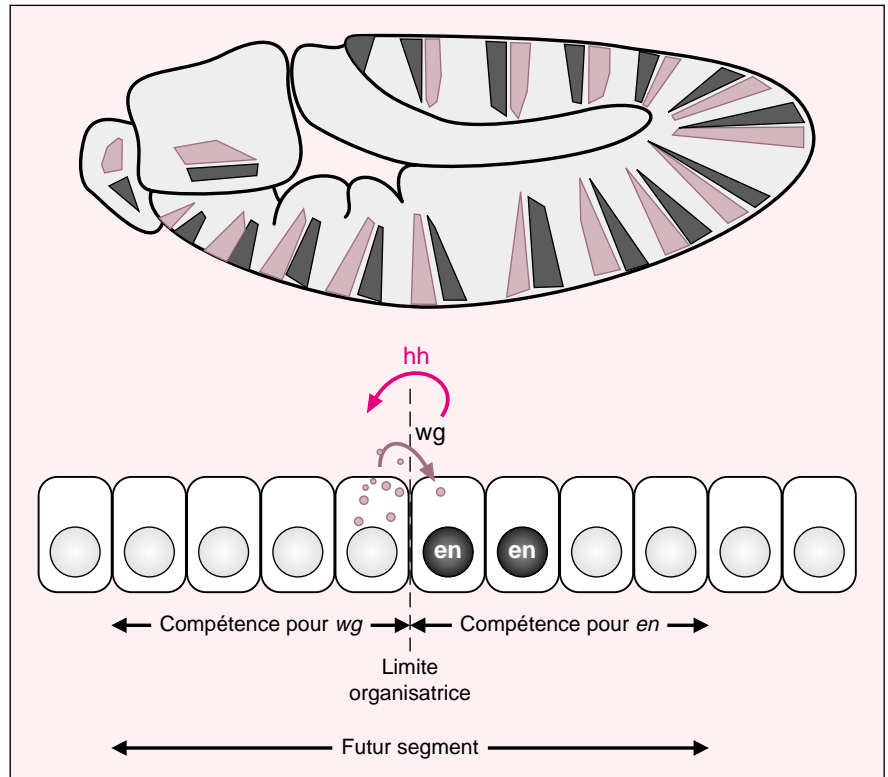


Figure 3. La limite organisatrice du segment de drosophile s'élabore autour d'une boucle d'interactions cellulaires impliquant les gènes *wg* (*Dwnt-1*), *en* et *hh*. Le corps de la drosophile est constitué par des métamères ou segments recouverts d'une cuticule. La couche monocellulaire de l'épiderme sécrète la cuticule et comporte une constellation de poils et organes sensoriels divers facilement reconnaissable par simple inspection visuelle. Les segments du corps sont tous construits sur le même modèle et la mise en place de ce plan commun dépend des interactions cellulaires contrôlées par les gènes de segmentation en particulier *wg*, *en* et *hh*. Par ailleurs, l'expression différentielle des gènes de type HOM/Hox permet de moduler l'exécution du plan de base, donnant à chaque segment une identité de position particulière. (D'après [13, 14].)

buent à la fonction de l'organisateur isthmique. Ainsi, une bille imbibée de FGF-8 implantée dans le rhombencéphale ne le modifie pas alors que, dans les mêmes conditions, un greffon isthmique induit l'expression de *en-2* et la formation d'une structure cérébelleuse ectopique dans le neuroépithélium de l'hôte [11] (figure 2, comparer A et B). Il est probable que d'autres molécules signalisatrices impliquées dans la fonction de l'organisateur isthmique restent à identifier. L'activité de tous les organisateurs étudiés jusqu'ici dépendait des interactions entre au moins deux populations cellulaires différentes: au niveau de l'organisateur isthmique, on peut suppo-

ser que la différenciation en toit optique en avant de l'isthme serait le résultat d'un signal provenant de cellules postérieures, alors que la différenciation du cervelet en arrière de l'isthme nécessiterait la perception d'un signal provenant de cellules antérieures. Placé dans le tube neural antérieur, FGF-8 remplacerait ainsi, probablement, le signal de la population cellulaire postérieure. Le signal de la population antérieure est cependant de nature différente, inconnue à ce jour, expliquant que FGF-8 n'ait pas d'effet dans le contexte postérieur. L'approche évolutive semble prometteuse mais sa difficulté est bien illustrée dans le cas de l'organisateur isthmique. Faut-il

poursuivre l'analogie avec la limite organisatrice du segment de drosophile? Des gènes de souris constituant des familles d'homologues de plusieurs gènes de segmentation de drosophile ont été clonés par les équipes qui s'intéressent au développement de la jonction més/métencéphalique. Il n'est pas toujours évident que ces homologues soient réellement importants dans le contexte mét/mésencéphalique. Faut-il s'intéresser à des signaux impliqués dans la fonction d'autres régions organisatrices? sur quels critères les choisir? Il reste toujours la consolation de se dire que, même si la molécule signalisatrice que vous aurez ainsi identifiée n'est pas impliquée dans la fonction de votre organisateur favori, elle a de fortes chances d'être impliquée dans un autre, vous donnant ainsi l'occasion d'étendre votre culture et une excuse pour explorer un nouveau système biologique ■

TIRÉS À PART

M. Wassef.

RÉFÉRENCES

1. Niehrs C, De Robertis EM. Vertebrate axis formation. *Curr Op Gen Dev* 1992; 2: 550-5.
2. Gurdon JB, Lemaire P, Kato K. Community effects and related phenomena in development. *Cell* 1993; 75: 831-4.
3. Condamine H. L'organisateur de l'embryon d'amphibien. *médecine/sciences* 1992; 8: 483-6.
4. Martinez S, Wassef M, Alvarado-Mallart RM. Induction of a mesencephalic phenotype in the 2 day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*. *Neuron* 1991; 6: 971-81.
5. Wilkinson D, Bailes JA, Champion JF, McMahon AP. Expression of the proto-oncogene *int-1* is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo. *Cell* 1987; 50: 79-88.
6. McMahon AP, Joyner AL, Bradley A, McMahon JA. The midbrain hindbrain phenotype of Wnt-1/Wnt-1- mice results from the stepwise deletion of engrailed expressing cells by 3.5 days postcoitum. *Cell* 1992; 69: 581-95.
7. Wurst W, Auerbach AB, Joyner AL. Multiple developmental defects in *Engrailed-1* mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 1994; 120: 2065-75.
8. Joyner AL. Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain-hindbrain development. *Trends Genet* 1996; 12: 15-20.
9. Echelard Y, Epstein DJ, St Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. *Sonic hedgehog*, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS and limb polarity. *Cell* 1993; 75: 1417-30.
10. Concordet J. Morphogenèse, acide rétinolique et Sonic Hedgehog. *médecine/sciences* 1994; 10: 570-3.
11. Crossley PH, Martinez S, Martin GR. Midbrain development induced by FGF-8 in the chick embryo. *Nature* 1996; 380: 66-8.
12. Crossley PH, Minowada G, MacArthur CA, Martin GR. Roles for FGF-8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* 1996; 84: 127-36.
13. Siegfried E, Perrimon N. Drosophila Wingless: a paradigm for the function and mechanism of Wnt signaling. *BioEssays* 1993; 16: 395-404.
14. Klingensmith J, Nusse R. Signaling by wingless in Drosophila. *Dev Biol* 1994; 166: 396-414.

Marion Wassef

Cnrs Ura 1414, Équipe ATIPE, niveau 3, École Normale Supérieure, 46, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France.