

## **Processus morphogénétiques**

M. Alain PROCHIANTZ, membre de l'Institut  
(Académie des Sciences), professeur

### **Morphogènes et morphogenèse**

Le cours de la chaire des Processus morphogénétiques portait cette année sur la question des morphogènes. La première définition du terme de morphogène nous vient d'un article de 1952 d'Alan Turing « Les bases moléculaires de la morphogenèse ». Pour Turing, il s'agit d'évocateurs de formes, en référence aux évocateurs de Waddington. Il s'agit donc là d'une définition assez vague, très éloignée des critères un peu contraignants qui président aujourd'hui au classement d'une substance dans la catégorie des morphogènes. Il reste que Turing dans cet article séminal a mis en place le principe de réaction-diffusion qui permet de comprendre, en principe, comment à partir d'un champ homogène deux morphogènes auto-inducteurs et inhibiteurs réciproques, peuvent créer des « patterns » à la suite d'un simple différentiel de diffusion.

Au delà de Turing et de sa théorie des « gènes diffusibles », ce qui me semble constituer le fond de l'affaire, le point de départ du cours est le problème du drapeau français tel qu'il est posé par Lewis Wolpert dans un article très important de 1967. Dans cet article Wolpert propose un modèle très simple de patterning d'un champ morphogénétique. Une source de morphogène, à une certaine distance un puits qui dégrade le morphogène, et entre source et puits un gradient continue de ce morphogène. Chaque cellule du champ reçoit une certaine dose de morphogène en fonction de sa position entre source et puits et répond à cette information de position par l'expression d'un caractère. Si on ajoute des effets seuils, le champ peut être divisé en plusieurs zones qui expriment des caractères différents, par exemple une zone bleue, une blanche et une rouge, d'où le « drapeau français » de Wolpert.

Cet article pose dès le début un grand nombre de problèmes qui sont loin d'être résolus et qui ont fait la substance du cours. Le premier est la diffusion : les

morphogènes diffusent-ils ? Si on considère la surface des cellules comme une toile cirée, rien ne s'y oppose. Mais la réalité est très éloignée de cette image. La surface des cellules est un maquis de protéines et de sucres complexes rendant très improbable que les morphogènes diffusent librement. Il est intéressant, et ironique, de constater que Wolpert lui-même vient d'écrire un article dans lequel il revient sur son idée de départ pour déclarer que les morphogènes ne diffusent pas. Un deuxième problème est que les champs morphogénétiques ne sont pas stables. Les cellules se divisent, meurent, migrent et acquièrent continûment des propriétés nouvelles. Un troisième obstacle est celui du temps. Une cellule, en fonction de sa position est exposée, certes à une certaine concentration de morphogène, mais cette exposition dure plus ou moins longtemps. Tout modèle doit donc intégrer cette notion de durée d'exposition. Enfin (provisoirement car il ne s'agit pas d'être exhaustif), la concentration efficace de morphogène dépend aussi du mode de transduction du signal et de la régulation de cette transduction. Le problème est plus compliqué, donc, que ne le laisse penser ce modèle idéal proposé par Wolpert en 1967 et dont l'évidente simplicité rallia tous les esprits (les bons).

Malgré ce caveat, le modèle de Wolpert fut considéré très longtemps comme incontournable, il est encore considéré comme valable dans certains de ses aspects. Aussi parce qu'il a reçu de forts soutiens expérimentaux. Le plus décisif fut l'étude de l'établissement de l'axe antéro-postérieur de l'embryon de *Drosophile*. Sans entrer dans les détails, l'équipe de Nüsslein-Volhard établit que la protéine Bicoïd est synthétisée au pôle antérieur, à partir de messagers ancrés à ce pôle et diffuse à travers l'embryon qui, à ce stade, est un syncytium, c'est-à-dire que les noyaux se divisent mais baignent tous dans le même cytoplasme (les membranes se formeront plus tard). La taille totale de l'embryon est constante à ce stade et la protéine diffuse librement, instruisant chaque noyau de sa position et régulant l'expression de gènes qui « coupent » l'embryon en trois domaines. On ne pouvait rêver mieux comme illustration du problème du drapeau français. C'est ainsi que Bicoïd, (pourtant un facteur de transcription !) fut longtemps considéré comme morphogène idéal.

Sur ce modèle il fut découvert que de nombreux morphogènes apportent par diffusion une information de position déterminant le devenir morphologique et physiologique d'ensembles cellulaires. Un excellent exemple chez les vertébrés est fourni par *sonic hedgehog* (SHH) dont la diffusion à partir de la notochorde puis de la plaque du plancher détermine, avec d'autres facteurs comme les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), le patron d'expression des gènes de développement le long de l'axe dorso-ventral du tube nerveux. Son activité morphogénétique au niveau de la patte est aussi un grand classique. Dans ce cas comme dans celui d'autres morphogènes (BMPs, FGFs, Wnts,...) l'existence d'un gradient né d'une diffusion a toujours été postulée, parfois démontrée. La *drosophile* a constitué un objet d'étude essentiel à notre compréhension de la nature et du mode d'action de morphogènes, pas seulement pour le cas de Bicoïd que je viens d'évoquer, mais aussi pour d'autres de ces facteurs, dont DPP (une parente des BMP), *Wingless*

(Wg) et Hedgehog (HH). Mais avant de développer le rôle de ces morphogènes dans la construction de l'aile de drosophile, le cours s'est attardé sur Bicoïd.

En 2002, Bahram Huchmandzadeh, Eric Wieschaus et le mathématicien Stanislas Leibler publient un article dans lequel ils démontrent que le gradient de Bicoïd est très variable entre embryons mais que les bords qui sont déterminés et les domaines d'expression des gènes définissant les territoires morphogénétiques restent très stables dans leurs positions et étendues. D'où un problème intéressant de robustesse de la réponse malgré le bruit du signal. Trois années plus tard, l'équipe de Nathalie Dostatni publie un autre article qui démontre que « *contrary to recent reports proposing that the Bcd gradient is not sufficient to establish precise positional information, we show that Bcd drives precise and sharp expression of its target genes through a process that depends exclusively on its ability to activate transcription* ». Décryptons : Contrairement à ce que propose Huchmandzadeh, Wieschaus et Liebler, aucun système de filtrage du bruit n'est nécessaire à la robustesse de la réponse génétique. Ce débat, va initier toute une série d'expériences au cours desquelles il sera démontré que la constante de diffusion de Bicoïd est dix fois inférieure à ce qui serait nécessaire pour établir un gradient et surtout pour que la longueur scalaire soit constante. Ce qui semble exclure une diffusion passive à partir d'une source antérieure et oblige à s'interroger sur la façon dont le gradient de Bicoïd se met en place au tout début du développement embryonnaire.

Cette question de la diffusion des morphogènes est centrale et dépasse largement le cas de Bicoïd. Une grande partie des exemples du cours pris dans la morphogenèse de l'aile de la Drosophile ont eu pour but de s'interroger sur ce point. Il y a plusieurs façons d'aborder le problème. D'abord du côté des morphogènes et de leur structure. Ce sont des molécules souvent chargées positivement et donc susceptibles d'interagir fortement avec des protéines de la matrice extracellulaire ou de récepteurs de surface de type protéoglycans. Certains d'entre eux, Wnt/Wg et sHH/HH par exemple, sont modifiés par l'addition de séquences lipidiques hydrophobes, ou d'un résidu cholestérol, ce qui induit des interactions avec des lipide membranaires. Ce sont là des freins à la diffusion qui nécessitent des stratégies de « contournement » impliquant l'existence de transporteurs, de mécanismes de clivage des domaines actifs, etc. Un autre paramètre est la structure du milieu. Si l'on prend l'épithélium à jonctions serrées du disque imaginal de l'aile de drosophile, il est constitué de cellules polarisées avec une face basolatérale et une face apicale. La face basolatérale est extrêmement contournée et il est improbable que la diffusion puisse se faire autrement que par mouvement brownien, ce qui n'empêche pas que la présence de matrice et de récepteurs de surface bloque cette diffusion.

Sans vouloir énumérer tous les cas particuliers, une chose est certaine, le mouvement des morphogènes, le plus souvent, ne peut reposer sur une diffusion passive mais requiert des systèmes de transport. Un des systèmes de transport, « l'argosome », repose sur l'endocytose et l'exocytose des morphogènes. On se gardera

d'entrer trop avant dans le débat sur la nécessité, ou non, de l'endocytose pour que la signalisation prenne place. Débat intéressant cependant, car il est lié à la question de la durée d'exposition à un morphogène, variable aussi importante que sa concentration. Si la signalisation demande une endocytose, le temps passé dans la vésicule d'endocytose, aussi vésicule de signalisation, peut influencer l'activité du morphogène. L'argosome peut signaler mais il peut aussi en passant de cellule à cellule transporter les morphogènes sans que ceux-ci ne soient jamais, ou presque, en contact avec le monde extérieur. Ce transport planaire est une façon élégante d'échapper aux obstacles à la diffusion présents dans l'espace intercellulaire. Un autre mode de transport à grande distance est le cytonème. Il s'agit de longs prolongements cellulaires très fins, constitués de filaments d'actine, et qui contactent les morphogènes à des distances parfois très grandes. L'idée est que le temps mis pour que le signal remonte au corps cellulaire constitue une « mesure » de la distance.

Mais le modèle le plus populaire aujourd'hui est celui du cil. Il est admis désormais que presque toutes les cellules ont un cil primaire. Ce cil est une sorte d'organe sensoriel qui présente des récepteurs à son extrémité. Par exemple, *sHH* signale en se fixant à l'extrémité du cil sur son récepteur « *patched/smoothened* ». Mais, en même temps, les cils battent et ce battement est de nature à orienter les morphogènes. Cela est d'autant plus proche de la réalité que les cellules porteuses de cils forment un épithélium à polarité planaire conduisant à une synchronisation du battement ciliaire. L'implication des cils a été démontrée à toutes les étapes du développement (par exemple l'établissement d'une dissymétrie droite/gauche) non sans conséquences sur l'étiologie de plusieurs pathologies. Un exemple intéressant de ce concept se trouve dans la description d'un cas de morphogenèse adulte, celui de la migration des cellules neurales de la zone subventriculaire (SVZ) vers le bulbe olfactif. Ces cellules générées — à partir de cellules souches adultes — au niveau de l'épithélium qui borde le ventricule latéral migrent selon un courant antérograde et renouvellent les interneurons GABAergiques du bulbe olfactif, la région la plus antérieure du cerveau. Des travaux récents impliquant plusieurs laboratoires et coordonnés par Arturo Alvarez Buylla démontrent que cette direction antérograde est induite par un facteur répulsif (*Slit1/2*) sécrété par le plexus choroïde et poussé en avant par le battement coordonné des cils qui bordent le ventricule. Pour résumer les cils ont une double action : mécanique sur le transport des morphogènes et transductrice du signal dans la mesure où ils portent des récepteurs aux morphogènes.

En conclusion, le cours a abordé ces questions avec pour objectif de mettre en évidence les zones d'ombres, les contradictions expérimentales et les simplifications abusives de nombre des modèles qui circulent. Nous n'avons pas de proposition miracle, mais nous pensons que le phénomène de transduction des homéoprotéines, considérées comme de véritables morphogènes, constitue une solution intéressante. Cette solution a été examinée sur le plan théorique, en collaboration avec David Holcman, et sur le plan expérimental. Curieusement, quand il s'agit de la formation de bords, elle rejoint très exactement les propositions initiales d'Alan Turing.

## RÉFÉRENCES PRINCIPALES DU COURS 2007-2008

1. Affolter, M. & Basler, K. The Decapentaplegic morphogen gradient : from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* 8, 663-74 (2007).
2. Ainsworth, C. Cilia : tails of the unexpected. *Nature* 448, 638-41 (2007).
3. Ashe, H.L. & Briscoe, J. The interpretation of morphogen gradients. *Development* 133, 385-94 (2006).
4. Barkai, N. & Shilo, B.Z. Variability and robustness in biomolecular systems. *Mol Cell* 28, 755-60 (2007).
5. Bollenbach, T. et al. Precision of the Dpp gradient. *Development* 135, 1137-46 (2008).
6. Breitling, R. Greased hedgehogs : new links between hedgehog signaling and cholesterol metabolism. *Bioessays* 29, 1085-94 (2007).
7. Brunet, I., Di Nardo, A.A., Sonnier, L., Beurdeley, M. & Prochiantz, A. The topological role of homeoproteins in the developing central nervous system. *Trends in Neurosci.* 30, 260-67 (2007).
8. Bulow, H.E. & Hobert, O. The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 375-407 (2006).
9. Cadigan, K.M. Regulating morphogen gradients in the *Drosophila* wing. *Semin Cell Dev Biol* 13, 83-90 (2002).
10. Caspary, T. & Anderson, K.V. Patterning cell types in the dorsal spinal cord : what the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci* 4, 289-97 (2003).
11. Caspary, T., Larkins, C.E. & Anderson, K.V. The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. *Dev Cell* 12, 767-78 (2007).
12. Christensen, S.T. & Ott, C.M. Cell signaling. A ciliary signaling switch. *Science* 317, 330-1 (2007).
13. Christian, J.L. Argosomes : intracellular transport vehicles for intercellular signals ? *Sci STKE* 2002, PE13 (2002).
14. Ciani, L. & Salinas, P.C. WNTs in the vertebrate nervous system : from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* 6, 351-62 (2005).
15. Crauk, O. & Dostatni, N. Bicoid determines sharp and precise target gene expression in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol* 15, 1888-98 (2005).
16. Denzer, K., Kleijmeer, M.J., Heijnen, H.F., Stoorvogel, W. & Geuze, H.J. Exosome : from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* 113 Pt 19, 3365-74 (2000).
17. Dessaud, E. et al. Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* 450, 717-20 (2007).
18. Driever, W. & Nusslein-Volhard, C. The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* 54, 95-104 (1988).
19. Driever, W. & Nusslein-Volhard, C. A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* 54, 83-93 (1988).
20. Eaton, S. Release and trafficking of lipid-linked morphogens. *Curr Opin Genet Dev* 16, 17-22 (2006).
21. Eldar, A., Shilo, B.Z. & Barkai, N. Elucidating mechanisms underlying robustness of morphogen gradients. *Curr Opin Genet Dev* 14, 435-9 (2004).
22. Gibson, M.C. Bicoid by the numbers : quantifying a morphogen gradient. *Cell* 130, 14-6 (2007).
23. Gierer, A. & Meinhardt, H. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* 12, 30-9 (1972).

24. Goldberg, A.D., Allis, C.D. & Bernstein, E. Epigenetics : a landscape takes shape. *Cell* 128, 635-8 (2007).
25. Gonzalez-Gaitan, M. & Stenmark, H. Endocytosis and signaling : a relationship under development. *Cell* 115, 513-21 (2003).
26. Greco, V., Hannus, M. & Eaton, S. Argosomes : a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell* 106, 633-45 (2001).
27. Gregor, T., McGregor, A.P. & Wieschaus, E.F. Shape and function of the Bicoid morphogen gradient in dipteran species with different sized embryos. *Dev Biol* 316, 350-8 (2008).
28. Gregor, T., Tank, D.W., Wieschaus, E.F. & Bialek, W. Probing the limits to positional information. *Cell* 130, 153-64 (2007).
29. Gregor, T., Wieschaus, E.F., McGregor, A.P., Bialek, W. & Tank, D.W. Stability and nuclear dynamics of the bicoid morphogen gradient. *Cell* 130, 141-52 (2007).
30. Guerrero, I. & Chiang, C. A conserved mechanism of Hedgehog gradient formation by lipid modifications. *Trends Cell Biol* 17, 1-5 (2007).
31. Gurdon, J.B. & Bourillot, P.Y. Morphogen gradient interpretation. *Nature* 413, 797-803 (2001).
32. Holcman, D., Kasatkin, V. & Prochiantz, A. Modeling homeoprotein intercellular transfer unveils a parsimonious mechanism for gradient and boundary formation in early brain development. *J Theor Biol* 249, 503-17 (2007).
33. Houchmandzadeh, B., Wieschaus, E. & Leibler, S. Establishment of developmental precision and proportions in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 415, 798-802 (2002).
34. Houchmandzadeh, B., Wieschaus, E. & Leibler, S. Precise domain specification in the developing *Drosophila* embryo. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 72, 061920 (2005).
35. Hsiung, F., Ramirez-Weber, F.A., Iwaki, D.D. & Kornberg, T.B. Dependence of *Drosophila* wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic. *Nature* 437, 560-3 (2005).
36. Kasatkin, V., Prochiantz, A. & Holcman, D. Morphogenetic gradients and the stability of boundaries between neighboring morphogenetic regions. *Bull Math Biol* 70, 156-78 (2008).
37. Kerszberg, M. Noise, delays, robustness, canalization and all that. *Curr Opin Genet Dev* 14, 440-5 (2004).
38. Kerszberg, M. & Wolpert, L. Specifying positional information in the embryo : looking beyond morphogens. *Cell* 130, 205-9 (2007).
39. Kicheva, A. & Gonzalez-Gaitan, M. The Decapentaplegic morphogen gradient : a precise definition. *Curr Opin Cell Biol* 20, 137-43 (2008).
40. Kicheva, A. et al. Kinetics of morphogen gradient formation. *Science* 315, 521-5 (2007).
41. Kiecker, C. & Lumsden, A. Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat Rev Neurosci* 6, 553-64 (2005).
42. Kornberg, T. Pictures in cell biology. Cytonemes. *Trends Cell Biol* 9, 434 (1999).
43. Lander, A.D. Morpheus unbound: reimagining the morphogen gradient. *Cell* 128, 245-56 (2007).
44. Lawrence, P.A. & Struhl, G. Morphogens, compartments, and pattern : lessons from *drosophila* ? *Cell* 85, 951-61 (1996).
45. McHale, P., Rappel, W.J. & Levine, H. Embryonic pattern scaling achieved by oppositely directed morphogen gradients. *Phys Biol* 3, 107-20 (2006).
46. Meinhardt, H. Space-dependent cell determination under the control of morphogen gradient. *J Theor Biol* 74, 307-21 (1978).

47. Nusse, R. Wnts and Hedgehogs : lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development* 130, 5297-305 (2003).
48. O'Connor, M.B., Umulis, D., Othmer, H.G. & Blair, S.S. Shaping BMP morphogen gradients in the *Drosophila* embryo and pupal wing. *Development* 133, 183-93 (2006).
49. O'Leary, D.D., Chou, S.J. & Sahara, S. Area patterning of the mammalian cortex. *Neuron* 56, 252-69 (2007).
50. Panakova, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C. & Eaton, S. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* 435, 58-65 (2005).
51. Placzek, M. & Briscoe, J. The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat Rev Neurosci* 6, 230-40 (2005).
52. Ramirez-Weber, F.A. & Kornberg, T.B. Cytonemes : cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 97, 599-607 (1999).
53. Reeves, G.T., Muratov, C.B., Schupbach, T. & Shvartsman, S.Y. Quantitative models of developmental pattern formation. *Dev Cell* 11, 289-300 (2006).
54. Reinitz, J. Developmental biology : a ten per cent solution. *Nature* 448, 420-1 (2007).
55. Rogulja, D. & Irvine, K.D. Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient. *Cell* 123, 449-61 (2005).
56. Rohatgi, R., Milenkovic, L. & Scott, M. P. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317, 372-6 (2007).
57. Rusakov, D.A. & Kullmann, D. M. A tortuous and viscous route to understanding diffusion in the brain. *Trends Neurosci* 21, 469-70 (1998).
58. Satir, P. & Christensen, S.T. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* 69, 377-400 (2007).
59. Sjodal, M., Edlund, T. & Gunhaga, L. Time of exposure to BMP signals plays a key role in the specification of the olfactory and lens placodes *ex vivo*. *Dev Cell* 13, 141-9 (2007).
60. Spemann, H. *Embryonic Development and Induction* (Yale University Press, 1938).
61. Tabin, C.J. The key to left-right asymmetry. *Cell* 127, 27-32 (2006)..
62. Teleman, A.A., Strigini, M. & Cohen, S. M. Shaping morphogen gradients. *Cell* 105, 559-62 (2001).
63. Turing, A.M. The chemical basis of morphogenesis. *Phil trans B* 237, 37-72 (1952).
64. Umulis, D., O'Connor, M.B. & Othmer, H.G. Robustness of embryonic spatial patterning in *Drosophila melanogaster*. *Curr Top Dev Biol* 81, 65-111 (2008).
65. Vincent, J.P. & Magee, T. Argosomes : membrane fragments on the run. *Trends Cell Biol* 12, 57-60 (2002).
66. Wolpert, L. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* 25, 1-47 (1969).
67. Yucel, G. & Small, S. Morphogens : precise outputs from a variable gradient. *Curr Biol* 16, R29-31 (2006).
68. Zhu, A.J. & Scott, M.P. Incredible journey : how do developmental signals travel through tissue ? *Genes Dev* 18, 2985-97 (2004).

## Séminaire

Le séminaire a été tenu sous la forme d'une journée dédiée au thème Forme et Polarité cellulaire, le Lundi 10 décembre 2007. Cette journée a été divisée en 4 thèmes :

### I. Organisation dynamique de la synapse, biologie cellulaire et modélisation

Antoine Triller, INSERM et Ecole normale supérieure

Maxime Dahan, CNRS et Ecole normale supérieure

### II. Transport et fusion vésiculaire, biologie cellulaire et modélisation

Thierry Galli, CNRS et Institut Jacques Monod/Université Denis Diderot

David Holcman, CNRS et Ecole normale supérieure

### III. Morphogenèse et polarités cellulaire et planaire

Yohan Bellaïche, CNRS et Institut Curie

Thomas Lecuit, CNRS et Université de Marseille-Luminy

Hotoyoshi Yasuo, CNRS, Villefrance-sur-mer

Alain Prochiantz, CNRS, Collège de France et Ecole normale supérieure

## Recherche

La recherche du laboratoire se divise, avec des recouvrements, entre une partie théorique et fondamentale et une autre plus orientée vers les applications technologiques ou thérapeutiques.

### Partie théorique et fondamentale

#### *Création de patterns*

Nous avons continué d'explorer la signification physiologique du mécanisme de signalisation par transfert intercellulaire de protéines à homéodomaine. Ces études s'appuient sur quatre modèles. Un premier modèle est la formation de bords le long de l'axe dorso-ventral du tube nerveux aux périodes précoces du développement. La stratégie est de suivre la façon dont les frontières entre territoires dorso-ventraux peuvent être modifiés quand on bloque le passage intercellulaire de certains facteurs de transcription de la classe des homéoprotéines en particulier Pax6 et Nkx2.2. Ces études menées en collaboration avec l'équipe de Jean-Léon Thomas à la Salpêtrière viennent de débiter et il est encore trop tôt pour tracer l'état des lieux. Les premières données sont encourageantes dans la mesure où le blocage du passage intercellulaire de Pax6 chez le poulet au stade E2 induit une modification du patron d'expression de MNR2 et HB9.

Dans le même ordre d'idée nous avons utilisé, en collaboration avec Forence Maschat (CNRS, Montpellier), une stratégie de blocage du passage de l'homéoprotéine *Engrailed* dans le disque imaginal de l'aile de drosophile. Les données sont, ici encore, préliminaires mais elles suggèrent que cette opération modifie de façon non autonome cellulaire le développement de la veine transverse dans la partie antérieure de l'aile (à proximité de la frontière antéro-postérieure).

### *Guidage axonal*

Dans une étude antérieure menée en collaboration avec le laboratoire de Christine Holt (Cambridge, UK) nous avons démontré (Brunet et al. *Nature*, **483**, 94-98, 2005) que les cônes de croissance des neurones ganglionnaires de la rétine (RGCs) d'origine nasale et temporale répondent de façon opposée (attraction et répulsion) quand ils sont placés dans un gradient de l'homéoprotéine *Engrailed*. Cette réponse requière l'internalisation de la protéine par les cônes et repose sur une régulation de la traduction locale des ARN messagers des cônes par l'homéoprotéine, sans implication de la transcription. Cela nous a amené à développer le travail le long de deux axes. D'une part vérifier que ce mécanisme opère *in vivo* au moment de la mise en place des connexion retine-tectum. D'autre part identifier les ARN messagers régulés au niveau traductionnel après internalisation de l'homéoprotéine.

La partie *in vivo* implique une collaboration avec Andrea Wizenmann et Wolfgang Wurst (Tübingen et Munich, Allemagne), et Christine Holt (Cambridge, UK). Elle est pratiquement achevée et sera renvoyée, sous la forme d'un manuscrit révisé, à la revue *Neuron* dans les semaines qui viennent. Dans ce manuscrit nous démontrons sans ambiguïté les faits suivants :

1. *Engrailed* (*En1* et *En2*) sont exprimés à la surface du tectum selon un gradient antéro-postérieur. La quantité de protéine à la surface correspond à 5 % de son contenu nucléaire.
2. La neutralisation de la protéine extracellulaire *in vivo* entraîne une projection ectopique des neurones temporaux dans les domaines postérieurs du tectum.
3. Cette activité d'*Engrailed* se fait en coopération avec les Ephrins, l'EphrinA5 en particulier.

Nous pouvons donc conclure que le transfert *in vivo* de l'homéoprotéine *Engrailed* est nécessaire au patterning des projections de la rétine sur le tectum.

Pour ce qui est de la caractérisation des messagers traduits, nous avons utilisé une approche par puces à ADN en comparant dans diverses situations (*Engrailed* internalisé ou non) le population des messagers en cours de traduction (sur les polysomes). Nous avons aujourd'hui une dizaine de candidats sérieux qui seront bientôt testés (en collaboration avec le laboratoire de Christine Holt). Parmi ces candidats nous avons eu la surprise de trouver des messagers mitochondriaux et nous développons, sur cette base, l'hypothèse selon laquelle l'internalisation d'*Engrailed* entraîne une augmentation de l'activité du complexe I et la synthèse

d'ATP. Cet ATP pourrait avoir une activité intracellulaire, mais aussi extracellulaire après sécrétion et fixation sur des récepteurs purinergiques. Nous testons actuellement cette hypothèse en mesurant l'ATP extracellulaire et en vérifiant si la réponse à *Engrailed* est modifiée par des agents pharmacologique interférant avec la voie de signalisation purinergique.

### *Période critique*

Dans ce travail (collaboration avec Takao Hensch, Harvard Medical School, Boston, USA) nous avons démontré que la capture de l'homéoprotéine *Otx2* par les interneurons GABAergiques à parvalbumine (couches 3 et 4 du cortex visuel binoculaire) ouvre la période critique (plasticité corticale) au cours de la maturation post-natale du système visuel. Ce travail fondé sur des pertes et gain de fonction d'*Otx2* et des enregistrements électrophysiologiques est actuellement sous presse (Sugiyama et al., *Cell*, **134**, 508-520, 2008).

Au cours de cette étude nous avons observé qu'*Otx2* infusé dans le cortex est spécifiquement internalisé par les neurones GABA à parvalbumine, suggérant un mécanisme de reconnaissance spécifique. Au cours de l'année écoulée nous avons accumulé des données qui soutiennent l'hypothèse de l'existence de sites de fixation constitués par des sucres complexes (glycosaminoglycans). Nous avons identifié dans la séquence d'*Otx2* un domaine de 12 acides aminés responsable de cette reconnaissance. La prochaine étape est donc de tester l'importance physiologique de cette reconnaissance en la bloquant *in vivo* au cours de la période critique. Un autre point important est de comprendre le mode de transduction du signal. Nous le faisons en recherchant les cibles transcriptionnelles et traductionnelles d'*Otx2* dans les neurones GABA à parvalbumine.

### *Modélisation*

En collaboration avec David Holcman (Ecole normale supérieure), nous avons développé des modèles pour tester les différents paramètres, tout particulièrement la robustesse, de ce mode de signalisation au cours de la mise en place de gradients morphogénétiques et de la formation de frontières entre territoires au sein du neuroépithélium. Reprenant les propriétés d'auto-activation et d'inhibition réciproque des homéoprotéines exprimées de part et d'autre d'une frontière, nous avons calculé que ce mécanisme, proche de celui proposé par Turing en 1952, est plausible et compatible avec les données de la littérature. Ces calculs ont été publiés (Holcman et al. *J. Theoretical Biol.* **249**, 503-517, 2007 ; Kasatkin et al., *Bulletin of Mathematical Biology*, **70**, 156-178, 2008).

## Etudes technologiques et applications thérapeutiques

### *Gliomes*

Au cours de l'étude des cellules souches adultes présentes dans le système nerveux central, Isabelle Caillé avait observé l'expression, dans l'hippocampe, de HOP (homeodomain only proteins) qui, comme son nom l'indique, est presque uniquement constituée d'un domaine de fixation à l'ADN (l'homéodomaine). Nous avons démontré, par perte et gain de fonction, que cette mini-protéine est un anti-oncogène pour les cellules neurales souches adultes de l'hippocampe. Cette fonction est exercée à travers le contrôle de la mort programmée de ces précurseurs neuronaux. Grâce à une collaboration avec Ariel Ruiz i Altaba (Faculté de Médecine de Genève, CH), nous avons comparé l'expression de HOP dans des tissus sains et des cellules souches tumorales de gliomes humains. HOP est réprimé dans ces cellules souches tumorales et l'induction de son expression les fait entrer en apoptose, suggérant un rôle important de HOP dans le processus oncogénique (De Toni et al. *Neural Dev.* **3**, 13, 2008).

### *Glaucome*

Le glaucome est provoqué par la mort des cellules ganglionnaires rétiniennes (RGCs). Les causes de cette mort ne sont pas établies avec certitude, même si l'idée prédominante implique une augmentation anormale de la pression intraoculaire. Sur la base d'observations préliminaires, nous avons formé l'hypothèse d'un contrôle de la survie des RGCs par le passage de la protéine Otx2 entre les cellules bipolaires et les RGCs. Dans le cadre d'un contrat industriel avec Fovea-SA, nous avons mis au point des modèles *in vitro* et *in vivo* permettant de tester les propriétés protectrices d'Otx2 sur la mort des RGCs adultes. Nos résultats suggèrent qu'Otx2 internalisé par les RGCs protège ces neurones contre une mort induite soit par l'axotomie (*in vitro*) soit par une neurotoxicité glutamatergique (*in vivo*). Les hypothèses sur le rôle d'Otx2 comme protéine thérapeutique ont donné lieu à un dépôt de brevet.

### *Maladie de Parkinson*

L'homéoprotéine Engrailed (En1 et En2) est exprimée, chez l'adulte, dans les noyaux dopaminergiques (DA) du mésencéphale, qui dégénèrent dans la maladie de Parkinson. Au cours d'un travail publié en 2007 (Sonnier et al., *J. Neurosci.*, **27**, 1063-1071, 2007), nous avons rapporté que la délétion d'un seul allèle *En1* (donc un allèle *Engrailed* sur quatre) s'accompagne d'une mort progressive des neurones DA chez l'adulte. Cette observation et d'autres raisons, que je ne développe pas, nous ont conduits à proposer qu'*Engrailed* pouvait se trouver dans le circuit génétique de la maladie de Parkinson. Depuis nous avons donné du poids à cette hypothèse en démontrant qu'*Engrailed* internalisé par les neurones DA protège *in vitro* et *in vivo* contre leur mort spontanée, mais aussi induite par le MPP+, une drogue qui s'attaque au Complexe I mitochondrial. Nous sommes

actuellement en train d'identifier les cibles transcriptionnelles et traductionnelles qui permettraient d'expliquer cette protection. A ce jour nous avons plusieurs cibles candidates dont nous vérifions la validité dans des modèles in vivo. Parmi ces cibles, on retrouve des messagers encodant des protéine du complexe I, ce qui — à travers la piste purinergique — trace un lien avec les travaux décrits plus haut sur le guidage des axones.

### Publications et brevets 2007-2008

#### Articles

1. D. Holcman, V. Kasatkin & A. Prochiantz. (2007). Modeling homeoprotein intercellular transfer unveils a parsimonious mechanism for gradient and boundary formation in early brain development. *J. Theor. Biol.*, **249**, 503-517.
2. L. Sonnier, G. Le Pen, A. Hartman, J.-C. Bizot, F. Trovero, M.-O. Krebs & A. Prochiantz (2007). Progressive loss of dopaminergic neurons in the ventral midbrain of adult mice heterozygote for Engrailed1 : a new genetic model for neurological and psychiatric disorders. *J. Neurosci.*, **27**, 1063-1071.
3. A. Di Nardo, S. Nedelec (co-first), A. Trembleau, M. Volovitch, A. Prochiantz\* & ML Montesinos (2007). Dendritic localization and activity-dependent translation of En1 homeodomain transcription factor mRNA. *Mol. Cell. Neurosci.*, **35**, 230-236.
4. A. von Holst, U. Egbers, A. Prochiantz & A. Faissner. (2007). Neural stem cell/progenitor cells express 20 tenascin isoforms that are differentially regulated by Pax6. *J. Biol. Chem.*, **282**, 9172-9181.
5. B. Lesaffre, A. Joliot, A. Prochiantz & M. Volovitch. (2007). Direct non-cell autonomous Pax6 activity regulates eye development in the zebrafish. *Neural Development*, **2**, 2.
6. E. Dupont, A. Prochiantz & A. Joliot (2007). Identification of a signal peptide for unconventional secretion. *J. Biol. Chem.*, **282**, 8894-9000.
7. V. Kasatkin, A. Prochiantz & D. Holcman (2008). Morphogenetic gradients and the stability of boundaries between neighbouring morphogenetic regions. *Bulletin of Mathematical Biology*, **70**, 156-178.
8. A. De Toni, M. Zbinden, J.A. Epstein, A. Ruiz, I. Altaba, A. Prochiantz & I. Caillé. (2008). Regulation of survival in adult hippocampal stem cell lineages by the homeodomain only protein HOP. *Neural. Dev.* **3**, 13.
9. S. Sugiyama, A. Di Nardo, S. Aizawa, I. Matsuo, M. Volovitch, A. Prochiantz\* & TK Hensch\*. (2008). Experience-dependent transport of Otx2 homeoprotein in the visual pathway activates postnatal cortical plasticity. *Cell.*, **134**, 508-520.

#### Revue et commentaires

1. I. Brunet, A. Di Nardo, L. Sonnier, M. Beurdeley & A. Prochiantz. Shaping neural pathways with messenger homeoproteins (2007). *Trends in Neurosciences*, **30**, 260-267.
2. A. Prochiantz. (2007). A protein fusion a day keeps the aggregates away. *Molecular Therapy*, **15**, 226-227.
3. Agid, Y. et al. (2007). How can drug discovery for psychiatric disorders be improved ? *Nature Reviews Drug Discovery*, **6**, 189-201.
4. A. Prochiantz. (2007). For protein transduction, chemistry can win over biology. *Nat. Methods*, **4**, 119-120.

**Brevets**

1. A. Prochiantz & K. Moya. Utilisation d'une Homéoprotéine de la famille Bicoïd pour le traitement du Glaucome. 9 janvier 2008, N° 08/001110.

**Conférences 2007-2008**

1. 7<sup>th</sup> meeting of the German Neuroscience Society. Göttingen, Germany, March 29<sup>th</sup>-April 1<sup>st</sup> 2007.
2. Molecular mechanisms in neural patterning and differentiation. CEINGE, Napoli April 20<sup>th</sup>-22<sup>nd</sup> 2007.
3. Designing the Body Plan: Developmental mechanisms. June 4<sup>th</sup>-8<sup>th</sup>, Leiden Lorentz center, 2007.
4. 6<sup>th</sup> international Symposium Neuronal mechanisms of Vision. Ruhr Universtät Bochum October 11<sup>th</sup>-13<sup>th</sup>, 2007.
5. Brain Diseases and Molecular machines. March 25-28, Paris, France. Keynote lecture.
6. Visual System Development Gordon Conference; August 10-15 2008, Newport Rhode Island, USA.
7. The Cell-Penetrating Peptides (CPP) Satellite Meeting, 30-31 August 2008. Helsinki. Keynote lecture.
8. Chemistry and Biology Symposium of the Japan Society of Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry. Nagoya September 27<sup>th</sup> 2008. Keynote lecture.