

Biologie et génétique du développement

M. Spyros ARTAVANIS-TSAKONAS, professeur

La génétique moléculaire des organismes modèles : un paradigme de principes généraux en biologie

Thème général des cours

Le développement harmonieux et cohérent d'un organisme multicellulaire nécessite une parfaite coordination des interactions cellulaires. Leurs dérèglements sont très souvent à l'origine des dysfonctionnements cellulaires responsables des pathologies. Au cours de ces leçons, nous avons examiné les aspects de biologie cellulaire et moléculaire d'une voie de signalisation fondamentale conservée parmi tous les métazoaires. L'acquisition des connaissances de biologie fondamentale sur cette voie conduit à aborder des questions impliquées dans les processus pathologiques et en particulier lors de la tumorigenèse. Nous avons insisté, au cours de ces cours, sur l'usage des systèmes modèles développés chez les vertébrés et les invertébrés, pour répondre à ces différentes questions.

Les séminaires ont été remplacés par un colloque, présenté en anglais le 21 mars sous le titre :

« *Drosophila melanogaster* : un modèle expérimental pour l'étude des maladies humaines »

Ce colloque d'une journée se proposait de donner à un novice un aperçu théorique détaillé de la mouche du fruit, *Drosophila melanogaster*, utilisée comme système modèle expérimental pour répondre à des questions-clé en biologie et en médecine.

Drosophila est l'un des plus importants organismes modèles utilisés de nos jours par les biologistes. Au cours de la longue période historique de son utilisation, près d'un siècle, comme système modèle, la *Drosophila* a permis d'accroître de manière

significative et sur une large échelle notre compréhension des aspects fondamentaux de la biologie, entraînant ainsi plusieurs découvertes qui ont ébranlé les connaissances acquises au préalable.

Le séquençage du génome humain et celui de la mouche et leur grande homologie ont conduit les chercheurs à créer des outils sophistiqués disponibles dans la mouche et applicables aux maladies humaines. Au cours de cette journée, les participants au colloque ont été invités à une démonstration des méthodologies génétiques et moléculaires disponibles couramment chez la mouche, mettant en évidence ses contraintes et ses limites afin d'appréhender aisément la littérature sur la *Drosophile* et concevoir des expériences avec ce puissant système modèle.

Les thèmes suivants ont été abordés :

- *Drosophila* as a model organism – Past, Present and Future
- Basic *Drosophila* skills – Husbandry, Mutations and Phenotypes, Polytene and Balancer Chromosomes, Aneuploidy, Gene Mapping
- Mutagenesis, Basic Genetic Screens and Cloning – Generating Mutations, Performing a Chemical Mutagenesis Screen, Transgenesis, *P* elements, *P lacZ*, *GAL4-UAS* System, Enhancer Trapping, Gain of Function Screens
- Advanced genetics – Tissue-specific Expression, Genetic Mosaics, the *FLP-FRT* and MARCM Systems, Germline Mosaics and *ovo^D*, Inducible *GAL4* expression, GFP tagging, Reverse genetics, RNAi, Transposon insertion collections
- Using flies to address human biology and behavior – Stem Cells, Spinal Muscular Atrophy, Huntington's Disease, Alzheimer's Disease, Cancer and Metastasis, Alcoholism, Drugs of Abuse, Sexual Behavior and Circuitry

Les conférenciers étaient les suivants :

Spyros Artavanis-Tsakonas – Collège de France – Department of Cell Biology, Harvard Medical School

Doug Dimlich, Glenn Doughty, Mark Kankel, Anindya Sen - Department of Cell Biology, Harvard Medical School

Activité générale du laboratoire

Notre recherche se concentre sur l'étude des mécanismes régissant le développement des organismes multicellulaires. Nous essayons de comprendre comment une cellule souche indifférenciée répond pour se différencier à des signaux et évolue ainsi vers un état plus avancé de son développement.

La détermination d'une lignée cellulaire donnée, pendant le développement, dépend d'un ensemble complexe de signaux. Nous sommes plus particulièrement intéressés à définir la base moléculaire des règles à l'origine de ces mécanismes pléiotropiques, et comment leurs actions sont intégrées dans différentes étapes du

développement pour affecter des décisions spécifiques. L'analyse de ces phénomènes devrait nous permettre non seulement de définir les processus biologiques fondamentaux, mais également de mettre en lumière les mécanismes liés aux pathologies humaines, notamment le cancer, qui correspond à l'incapacité des cellules à répondre de manière appropriée aux signaux lors d'un développement normal.

En utilisant la drosophile comme modèle expérimental, nous étudions une voie de signalisation fondamentale, conservée au cours de l'évolution : la voie Notch. Des mutations génétiques de la voie de signalisation Notch peuvent entraîner le développement anormal d'un éventail très large de structures chez les métazoaires. Entre autres, le fonctionnement anormal de la voie Notch chez l'Homme a été associé à de nombreuses pathologies, dont celles dites néo-plasiques. L'élément central de cette voie de signalisation est le récepteur de surface appelé Notch. La voie de signalisation Notch ne semble pas donner d'instructions très précises quant au devenir d'une lignée cellulaire. En effet, elle semble plutôt moduler la capacité d'une cellule non différenciée à recevoir et/ou interpréter des signaux aboutissant à des phénomènes aussi nombreux que variés, tels que la différenciation, la prolifération et l'apoptose. Ainsi, la voie Notch, qui est présente depuis le vers *C. elegans* jusqu'à l'homme est un régulateur fondamental des lignées cellulaires. La question centrale de notre travail est de comprendre comment les signaux Notch s'impliquent dans d'autres facteurs cellulaires pour affecter le développement et l'entretien des systèmes cellulaires.

Nous utilisons des approches génétiques et moléculaires pour étudier le mécanisme de signalisation du récepteur Notch et les divers éléments associés à la cascade d'éléments biochimiques définissant la voie. Une grande partie de notre travail concerne l'étude des rapports génétiques et moléculaires entre les éléments de la voie Notch et d'autres éléments cellulaires qui peuvent agir pour modifier les signaux Notch. Nous essayons de comprendre les circuits cellulaires dans lesquels Notch est intégré pendant les processus de développement normaux et pathologiques. Notre approche se fonde sur des techniques de génétique et de biochimie en utilisant la drosophile, la souris et des cultures cellulaires comme modèles expérimentaux. Depuis peu, nous utilisons aussi des approches dites « génomiques » afin d'étudier la voie Notch dans le cadre d'une approche plus systématique.

Dans l'avenir, nous poursuivrons ces travaux avec le projet d'ajouter quelques moyens technologiques à notre base expérimentale et méthodologique. Les fondements de notre projet résident dans les approches expérimentales décrites ci-dessous :

a) Nous poursuivons l'analyse et la dissection de la voie Notch chez la drosophile en utilisant des méthodes génétiques et moléculaires. Notre analyse génétique se fonde sur l'identification des « modificateurs » du signal Notch dans différents contextes du développement. En outre, notre approche génétique visant à identifier de nouveaux « interacteurs » de Notch se complète maintenant par l'analyse

moléculaire des complexes protéiques en utilisant la technique de chromatographie d'affinité suivie par analyse en spectrométrie de masse ainsi que la technique du double hybride chez la levure. Afin d'identifier les « modificateurs » de la voie Notch, nous effectuons aussi des criblages RNAi et des criblages de drogues, à haut débit. Plus particulièrement, nous tentons de comprendre les effets quantitatifs de la signalisation Notch sur la qualité du développement. En d'autres mots, nous tentons de répondre aux questions suivantes :

— La nature de la réponse en termes de développement dépend-elle de la quantité du signal Notch ?

— Comment les signaux Notch intègrent-ils leurs activités dans les divers contextes cellulaires qu'ils rencontrent pendant le développement ?

Ces questions sont essentielles pour appréhender les différents aspects de la voie Notch et sa pléiotropie. Répondre à ces questions nous permettrait également de comprendre la voie Notch en tant que système biologique et, par conséquent, de prendre toute la mesure de la complexité qui est la règle en biologie.

b) Nous avons traditionnellement employé des moyens génétiques pour disséquer les circuits dans lesquels la signalisation Notch est intégrée. Cependant, il est devenu clair qu'une compréhension complète des circuits Notch ne pourra se faire sans une cartographie complète des interactions entre protéines, dans la cellule. Cette carte physique est en train d'être réalisée dans le cadre d'un projet ambitieux que nous avons initié et qui associe trois laboratoires (Harvard, Berkeley et l'institut de TATA à Bangalore) ainsi qu'une entreprise de biotechnologies (Cellzome, Heidelberg). Le projet consiste à identifier toutes les interactions physiques dans lesquelles l'ensemble des protéines (le protéome) est impliqué. Notre approche comporte l'isolement biochimique des complexes de protéines par chromatographie d'affinité, à partir de lignées cellulaires et d'embryons de drosophile. Ensuite, les différents composants des complexes protéiques sont identifiés par analyse de spectrométrie de masse.

c) Les approches génétiques classiques, bien qu'efficaces pour la dissection et la compréhension de la voie Notch, sont parfois quelque peu limitées, par le besoin de générer et d'identifier les mutants. Notre laboratoire a aujourd'hui l'honneur d'être le « gardien » et le « distributeur » auprès de la communauté universitaire d'une collection très sophistiquée et unique de drosophiles, correspondant à des mutants par insertion, qui couvre ~ 50 % du génome (la collection de mutants d'Exelixis). La collection se compose de presque 20 000 souches différentes. D'une part, la collection joue le rôle de dépôt pour des mutations spécifiques qui sont caractérisées à l'échelle moléculaire. D'autre part, elle peut également être utilisée comme outil pour examiner de manière systématique et rapide les modifications éventuelles de phénotypes spécifiques. Nous tirons profit de cette ressource en effectuant des criblages génétiques à haut débit afin de trouver quels sont les éléments modificateurs de la voie Notch. D'ailleurs, notre capacité à effectuer des criblages à une vitesse sans précédent nous a incité à réexaminer quelques problèmes

classiques de la biologie du développement chez la drosophile, tels que la détermination et la régénération ainsi que leur rapport possible avec Notch, de manière systématique — encore impossible il y a peu de temps.

d) Un autre projet, que nous venons d'initier mais qui devrait se développer dans les années à venir, se concentre sur les aspects structuraux de Notch. En collaboration avec un collègue à Harvard (Tom Walz), nous avons lancé une étude qui vise à comprendre des aspects structuraux du récepteur Notch en utilisant la microscopie électronique. Tout d'abord, nous nous intéressons à l'état oligomère du récepteur et à ses interactions avec des facteurs intracellulaires et extracellulaires. À ce jour, rien n'est vraiment connu au sujet de ces aspects structuraux et leurs implications dans la fonction de Notch. En utilisant la microscopie électronique ainsi que l'analyse en microscopie optique : la technique du FRET, nous devrions pouvoir répondre à ces questions sur les aspects fondamentaux du processus de transduction du signal Notch.

e) Dans le cadre de nos études utilisant des systèmes mammifères, nous examinons, d'une part, comment la modulation des signaux Notch peut influencer le devenir et le potentiel de prolifération des cellules souches et nous essayons, d'autre part, d'analyser les situations pathologiques dans lesquelles Notch est impliqué. De nombreux travaux indiquent que Notch jouerait un rôle important dans divers aspects biologiques des cellules souches. Notre collaboration avec le laboratoire de Pr. Daniel Louvard à l'Institut Curie à Paris, consiste à examiner comment Notch peut affecter la différenciation de cellules souches, dans l'intestin, chez la souris. Nous poursuivons la caractérisation moléculaire d'un modèle mammaire de cancer que nous avons développé chez la souris, où nous pouvons induire une néoplasie non-invasive en régression qui se développe en adénocarcinome invasif. Nous utilisons des techniques génétiques et génomiques (puce à ADN) pour analyser les lésions qui contribuent à cette transition. Nous caractérisons également des lésions en régression et les comparons à des tumeurs induites par plusieurs oncogènes « classiques ». Notre analyse est également complétée par un projet en collaboration avec le laboratoire de Joan Brugge (Harvard) qui utilise un système tridimensionnel de culture de cellules mammaires.

Enfin, notre intérêt se porte aussi sur l'analyse et la compréhension de la base moléculaire des mutations associées aux syndromes de CADASIL et d'Alagille. Ces deux maladies sont des syndromes humains pléiotropiques dominants qui affectent le récepteur Notch et son ligand Jagged. On utilise des modèles transgéniques pour étudier ces problèmes.

Projet du laboratoire à l'Institut Curie

Dans le cadre du nouveau pôle de Biologie du développement, actuellement en cours de construction à l'Institut Curie, un laboratoire dédié à l'étude de la cancérogenèse va s'installer.

L'implication de la voie Notch dans l'oncogénèse

Le rôle de la voie Notch dans le développement comme dans tous les processus essentiels est pléiotropique, agissant à maintes reprises dans les différents contextes du développement. La dérégulation de Notch conduit à des déficiences dans chaque système biologique étudié, et par voie de conséquence à des maladies ; ce qui n'est pas surprenant compte tenu de l'importance du rôle fondamental de cette voie de signalisation.

Il a été démontré depuis longtemps la relation entre la dérégulation de Notch et la prolifération cellulaire. Mais de récents travaux ont insisté sur la possibilité que le rôle de Notch dans les maladies humaines pouvait être plus ordinaire qu'il ne semblait initialement. Il est donc apparu évident que la modulation du signal Notch pouvait être à la fois un paramètre important d'une maladie mais aussi une cible thérapeutique.

Objectifs

Par l'utilisation de souris transgéniques (déjà en notre possession), nous proposons

- 1) d'étudier les conséquences de l'activation du récepteur Notch dans la glande mammaire et l'épithélium intestinal ;
- 2) d'analyser des éléments génétiques comme cibles d'activation de Notch ;
- 3) d'examiner l'implication non autonome des signaux Notch dans les étapes de la prolifération et leur rôle potentiel sur les interactions épithélium-mésenchyme.

Programme de recherche

1) Nous avons établi des lignées de quatre souris transgéniques qui hébergent des formes activées «Floxed» de chacun des quatre récepteurs Notch 1, 2, 3, et 4 introduites dans le chromosome Rosa. Des croisements avec des lignées Cre appropriées nous permettent d'activer le signal Notch dans des tissus spécifiques et d'étudier pour la première fois et de manière systématique les différences quantitatives et qualitatives entre ces quatre récepteurs.

Cette analyse commencera par une évaluation détaillée de l'activation de Notch en utilisant MMTV Cre dans l'épithélium mammaire, et Villin Cre dans l'épithélium intestinal. Dans les deux cas, les résultats seront comparés aux modèles transgéniques, que nous avons développés en activant le récepteur Notch 1. Ces deux modèles ont fait l'objet de publications ; ils définissent notre base de travail pour ces expériences.

L'analyse phénotypique détaillée, utilisant des marqueurs immuno-cytochimiques et fluorescents requiert la disponibilité d'équipements d'imagerie optique spécifiques.

2) Nous avons développé un modèle de souris transgénique dans lequel l'activation du récepteur Notch 1 dans l'épithélium mammaire induit le développement rapide de néoplasmes dépendants de grossesse/lactation qui mettent en évidence une combinaison histopathologique caractéristique. L'ensemble de cellules activées par Notch conserve sa possibilité à répondre à des stimuli apoptotiques et régresse dès l'involution de la glande mammaire, mais semble faire apparaître dans les grossesses ultérieures des adénocarcinomes malins non-régressifs. Il est donc significatif que les tumeurs régressives, observées dans la glande de lactation présentent un exemple de dérégulation de la prolifération qui semble précéder un dérangement de la mort cellulaire. Les cellules dans ces tumeurs conservent leur aptitude à répondre aux signaux apoptotiques pendant l'involution et en conséquence régressent, bien que des événements mutagéniques secondaires entraînent une malignité qualifiée. Dans nos tentatives pour identifier ces événements secondaires, nous avons utilisé le CGH (Comparative Génomic Hybridization) pour comparer la régression avec la non-régression des tumeurs Notch. Nous allons suivre les phénomènes biologiques et moléculaires de quelques-unes de ces cibles et prévoyons de valider celles-ci sur des échantillons humains. En outre, nous avons démontré par notre analyse *in vivo* que dans l'épithélium mammaire, la Cyclin D1 est une cible *in vivo* des signaux Notch et que nous pouvons inhiber l'oncogenèse mammaire induite par Hras 1 dépendant de la cycline D1- en exprimant l'antagoniste Deltex de Notch.

Nous souhaitons utiliser le même modèle pour étudier et comparer les conséquences sur la glande mammaire de l'activation de Notch 2, 3, et 4 (voir ci-dessus, objectifs 1 et 3).

L'analyse, que nous avons poursuivie à la fois sur la drosophile et sur des cultures de cellules mammaires, démontre que les cellules exprimant l'activation de Notch 1 peuvent stimuler une activité mitotique chez leurs voisins cellulaires. Ce comportement cellulaire non autonome de Notch est le sujet d'une analyse systématique de notre laboratoire concernant la drosophile.

Nous proposons d'étendre notre étude aux souris en utilisant des xénotreffes. Cette approche expérimentale de notre analyse est fondée sur nos résultats se rapportant à une lignée cellulaire — (537M provenant de souris transgéniques MMTV) — capable d'induire des tumeurs greffées sur des « souris nues » lorsque celle-ci est mélangée à des cellules exprimant Notch activé tandis qu'elle n'induit pas la formation de tumeurs lorsqu'elle est mélangée à des cellules qui n'expriment pas Notch. Ce mélange de cellules qui inclut l'expression de cellules dans Notch activé provoque une réduction de la lactation (de près de 50 %) et accroît le niveau apparent de croissance des tumeurs. Une série d'expériences sont prévues pour tirer profit de ces observations afin d'étudier la capacité du signal Notch à agir sur divers types de cellules et aussi pour étudier en qualité et en quantité les différences sur les quatre récepteurs Notch.

Publications récentes

Hurlbut, G.D., Kankel, M.W., Lake, R.J., Artavanis-Tsakonas S. (2007). Crossing paths with Notch in the hyper-network. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 19 (2) : 166-175.

Kelly, D.F., Lake, R.J., Walz, T., Artavanis-Tsakonas S. (2007). Conformational variability of the intracellular domain of *Drosophila* Notch and its interaction with Suppressor of Hairless. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23 : 9591-6.

Arboleda-Velasquez, J.F., Zhou, Z., Shin, H.K., Louvi, A., Kim, H.H., Savitz, S.I., Liao, J.K., Salomone, S., Ayata, C., Moskowitz, M.A., Artavanis-Tsakonas, S. (2008). Linking Notch signaling to ischemic stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 25 ; 105 (12) : 4856-61.

Bentley, Anna M., Artavanis-Tsakonas, S., Stanford, J. (2008). Nanocourses : a Short Course Format as an Educational Tool in a Biological Sciences Graduate Curriculum. CBE-Life Sciences Education.

Fre, Silvia, Kshetrapal, Pallavi, Huyghe, Mathilde, Lae, Marick, Robine, Sylvie, Artavanis-Tsakonas, S. and Louvard, D. (2008). Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the mouse intestine, soumis à *Nature Medicine*.

Hurlbut, G., Kankel, M., Artavanis Tsakonas, S. Notch-Ras signal integration in *Drosophila* development : nodal points and complexity, Soumis à *Nature*.