

Fonction motogène du FGF et formation du système trachéal de la drosophile

Les bases moléculaires de la formation d'organes respiratoires tels que les poumons des vertébrés ou le système trachéal des insectes restent mal connues. Puisque très reproductibles, les branchements de ces épithéliums tubulaires doivent être contrôlés de manière stricte au cours du développement. Des expériences classiques effectuées chez les Vertébrés ont montré que la structure branchiale de l'épithélium pulmonaire dépend de signaux inducteurs provenant du mésenchyme environnant. Bien que la capacité inductrice de divers facteurs de croissance comme des FGF [1, 2], l'*epidermal growth factor* EGF ou encore le *scatter factor* SF, ait été ensuite montrée sur des tissus isolés, la nature des facteurs opérant au cours du développement reste à établir.

Des travaux récents chez la drosophile montrent que la synthèse localisée et transitoire de Branchless (Bnl), un facteur de croissance de la famille des FGF (*fibroblast growth factor*) et l'interaction avec son récepteur contrôlent successivement la migration des cellules trachéales lors de la formation des branches principales et la position des branches secondaires [3]. Le gène *bnl* est aussi requis pour l'expression de *pointed*, un gène codant pour un facteur de transcription à domaine ETS impliqué dans la formation des branches secondaires [4, 5] et de *pruned/D-SRF*, l'homologue du gène *SRF* (*serum responsive factor*) humain qui règle l'extension des branches terminales [6].

Morphogenèse du système trachéal

Le système trachéal de la drosophile constitue un système qui peut s'avérer particulièrement puissant pour identi-

fier les facteurs contrôlant la formation d'un épithélium arborisé au cours du développement. Outre l'apport essentiel d'une analyse génétique [5], le système trachéal a été très bien décrit au niveau cellulaire [7]. Il apparaît formé d'un épithélium tubulaire fortement ramifié, ouvert sur l'extérieur, qui permet le transport d'oxygène vers les tissus internes. La morphogenèse d'une telle structure soulève la question du contrôle de la position, de la longueur, et du degré de ramification de cet épithélium. Le réseau trachéal se forme à partir de petits groupes de cellules ectodermiques précurseurs présents dans chaque hémisegment de l'embryon (figure 1). Chacun de ces groupes de

cellules s'invagine pour former un sac épithélial comportant environ 80 cellules. La formation des branches primaires commence par la migration dans des directions définies d'une ou deux cellules originaires de 6 positions fixes de chaque sac. Un petit nombre de cellules suit ces cellules « initiatrices » et s'organise pour former un tube ou branche primaire. Quelques branches fusionnent avec les branches équivalentes élaborées dans les segments adjacents afin de former un réseau tubulaire continu parcourant l'embryon et ouvert sur l'extérieur au niveau des spiracles antérieurs et postérieurs. Par ailleurs, des branches secondaires se forment par allongement de cellules indivi-

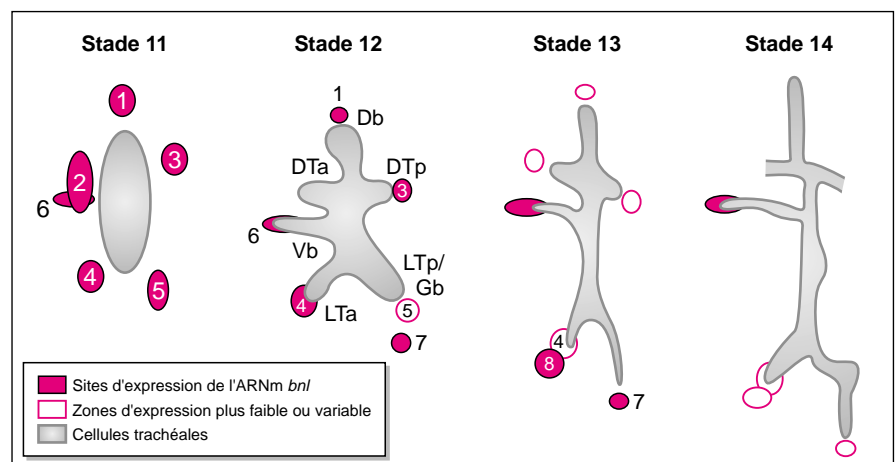


Figure 1. **L'expression de *bnl* induit et guide la formation des branches trachéales primaires.** Le gène *bnl* est exprimé dans des cellules avoisinant les cellules trachéales. Au stade 11, six sites d'expression de *bnl* (par hémisegment) induisent et guident la formation des branches primaires à partir du sac trachéal. L'expression ultérieure de *bnl* au niveau des sites 7 (stade 12) et 8 (stade 13) permet de rediriger la migration des branches LTa et LTp/Vb respectivement. (Db): branche dorsale; (DTp): tronc dorsal postérieur; (DTa): tronc dorsal antérieur; (Vb): branche viscérale; (DTa): tronc dorsal antérieur; (LTa/Gb): tronc dorsal antérieur/branche ganglionnaire. (D'après [3].)

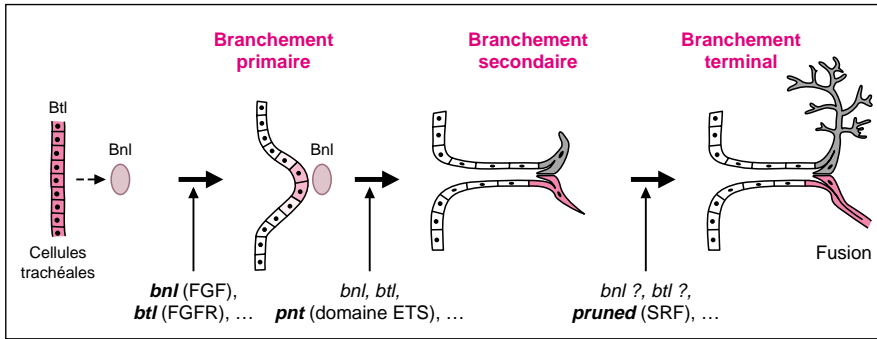


Figure 2. **Gènes impliqués dans les différentes étapes de l'arborisation trachéale.** Schéma de la morphogénèse de la branche dorsale. La formation séquentielle des branches primaires, secondaires, et terminales est précédée par l'expression de marqueurs généraux et/ou spécifiques de chaque étape. Les gènes *bnl* et *btl*, qui codent respectivement pour un homologue du FGF et de son récepteur, induisent la formation des branches primaires. Ces deux gènes sont également requis pour l'expression des facteurs de transcription *Pnt* (en rose) et *Pruned* (en gris), spécifiques des étapes de branchement secondaire et terminal. (D'après [5].)

duelles situées à, ou à proximité de l'extrémité des branches primaires en formation. Ces branches secondaires se ramifient à leur tour en un grand nombre de branches terminales qui sont de longues extensions cytoplasmiques (trachéoles) qui relient le système aux tissus internes et au niveau desquels s'effectuent les échanges gazeux.

Des marqueurs moléculaires spécifiques de chaque étape ont été identifiés (figure 2, voir [5]). Parmi eux, on trouve *Breathless* (*Btl*), un homologue chez la drosophile des récepteurs du FGF, synthétisé dans l'épithélium trachéal et nécessaire à la formation des trachées [8], et les facteurs de transcription *Pointed* et *Pruned*/*D-SRF*, respectivement requis pour la croissance des branches secondaires et l'extension des branches terminales [4-6]. Les mécanismes de contrôle du nombre et de la position des branches primaires et secondaires restaient cependant inconnus. L'identification génétique de *Branchless*, un facteur de la famille des FGF agissant comme le ligand de *Breathless*, comble cette lacune [3].

Bnl, un membre de la famille des FGF

Les facteurs de croissance de type FGF composent une famille de

14 gènes différents chez les mammifères avec 4 récepteurs de forte affinité [9]. Les FGF ont été décrits comme des facteurs mitogènes, trophiques, de différenciation et plus récemment de développement [10]. Le gène *branchless* (*bnl*) de la drosophile code pour une protéine possédant un domaine de 98 acides aminés qui présente une forte identité de séquence (31 %-39 %) avec les FGF 1, 2 et 9 humains. Au sein de ce domaine, 17 des 23 résidus conservés parmi l'ensemble des FGF vertébrés sont présents dans *Bnl*. En outre, deux introns interrompant le domaine FGF sont localisés au même endroit dans *Bnl* et les FGF vertébrés, permettant de conclure que *Bnl* est bien un nouveau membre de la famille FGF.

Fonction motogène de Bnl

Le gène *bnl* a été identifié lors d'une mutagenèse par insertion d'éléments transposables P marqués [3]. Dans les embryons homozygotes pour la mutation *bnlP1*, qui abolit vraisemblablement l'activité du gène, la formation des sacs d'épithélium trachéal est normale mais il y a absence de formation des trachées. Dans le cas d'une mutation plus faible (*bnlP2*) on observe des défauts sporadiques de croissance des branches primaires, secondaires et terminales.

Le profil d'expression de *bnl*, déterminé par hybridation *in situ*, montre une fine régulation spatiale et temporelle. Le gène *bnl* n'est pas exprimé dans l'ectoderme trachéal mais dans 6 groupes de cellules localisées à la périphérie du sac épithélial (figure 1). Ces sites d'expression définissent la direction de migration des cellules trachéales initiatrices de la formation des branches primaires. Cette première vague d'expression cesse dès que les cellules trachéales qui ont migré se sont organisées en structures tubulaires. Deux sites d'expression plus tardifs de *bnl* permettent de redéfinir les directions de croissance de 2 des 6 branches primaires. L'expression ectopique contrôlée de *bnl* (par le système *Gal4-UAS* [11]) dans des embryons dépourvus de *bnl* endogène provoque la formation et la croissance de branches primaires vers les positions où *bnl* est exprimé. Le profil d'expression et l'analyse phénotypique des mutations de *bnl* permettent de conclure qu'il agit comme un facteur d'induction et de guidage de la croissance des branches primaires. Cette fonction motogène de *bnl* intervient lorsque les cellules l'exprimant et les cellules trachéales sont en contact ou bien séparées d'une ou quelques cellules, suggérant que le signal *Bnl* peut diffuser.

L'action de Bnl dépend du récepteur Btl

Des travaux réalisés en 1991 avaient déjà montré que le gène *breathless* (*btl*), un homologue de drosophile des récepteurs du FGF (FGF-R), exprimé dans les cellules trachéales en cours de différenciation, était requis pour la formation du système trachéal [8]. La complémentarité des sites d'expression de *bnl* et *btl*, la similitude de leurs phénotypes mutants ainsi que la nature des protéines codées par ces deux gènes suggèrent donc que *Bnl* était un ligand de *Btl*. Cette hypothèse est maintenant étayée par plusieurs arguments génétiques et biochimiques [3]: (1) Une interaction fonctionnelle, sensible à la dose, entre *btl* et *bnl*. Ce type d'interaction entre deux gènes révèle généralement une participation à

une même voie de signalisation. (2) Un sauvetage partiel du phénotype mutant *bnl* par l'expression d'une forme constitutionnellement activée de Btl. (3) une activation « biochimique » (autophosphorylation sur les résidus tyrosine) *in vivo* du récepteur Btl par expression ectopique généralisée de *bnl* dans l'embryon.

Bnl et le programme de branchement secondaire et terminal

Le bourgeonnement des branches secondaires procède d'un changement de forme de cellules individuelles situées à l'extrémité et à quelques sites internes des branches primaires. Les branches terminales sont des longues extensions cytoplasmiques de certaines de ces cellules trachéales individuelles (cellules terminales). Ces trachéoles qui ressemblent à des projections axonales croissent en direction des tissus cibles du système trachéal et peuvent atteindre plus de 100 µm. Elles comportent un canal cytoplasmique qui transporte l'oxygène. Contrairement aux branchements primaires et secondaires, la position, le degré d'arborisation et la répartition des branchements terminaux ne sont pas strictement fixés génétiquement mais réglés au cours du développement en réponse au besoin d'oxygène des tissus internes [7]. Les sites d'expression de *bnl* et les défauts de branchements secondaires observés dans les embryons mutants *bnlP2* suggèrent que, outre son rôle de guidage des branches primaires, Bnl a la capacité de sélectionner les sites de bourgeonnement secondaire. Le gène *pointed* (*pnt*), requis pour la formation des branches secondaires est spécifiquement exprimé dans les cellules précurseurs de ces branches. Un autre facteur de transcription, Pruned/D-SRF, est spécifiquement produit dans les cellules terminales. Ni *pnt* ni *pruned* ne sont exprimés dans les cellules trachéales d'embryons dépourvus d'activité Bnl (*bnlP1*). Les auteurs proposent donc que l'expression persistante de *bnl* dans les cellules au voisinage du système trachéal en cours de formation induit la différenciation de ces cellules en trachées secondaires et, finalement, en tra-

chéoles. En effet, l'expression de *bnl* précède la formation des branches secondaires, ce qui exclut un rôle dans le guidage de ces branches. Bnl agirait donc d'abord comme un facteur motogène capable d'induire une migration cellulaire puis comme un facteur de différenciation activant l'expression de gènes régulateurs spécifiques. Cela met en lumière l'importance du caractère dynamique de l'expression de *bnl* et la pluralité de sa fonction.

Les « cibles » de *bnl*

Le gène *pointed* code pour un facteur de transcription présentant un domaine de liaison à l'ADN du type ETS retrouvé dans de nombreuses protéines des vertébrés [4]. Le produit du gène *pruned/D-SRF* est apparenté (degré d'identité supérieur à 90 %) au facteur de transcription mammifère SRF [12, 6]. L'étude extensive de SRF dans les cellules mammifères a montré qu'il participe avec des protéines à domaine-ETS à des complexes de transcription dits « ternaires », activés en réponse à divers facteurs de croissance et réglant l'expression de gènes tels que *c-fos* [13, 14]. Bien que la protéine SRF ait été impliquée dans la transduction de nombreux signaux extracellulaires dans des cellules en culture, sa fonction dans l'animal entier reste inconnue. L'analyse de mutants du gène *pruned*, ou encore de l'expression dans l'embryon de drosophile d'un facteur SRF constitutionnellement actif montrent que Pruned/SRF règle spécifiquement la formation des trachéoles. Des expériences complémentaires fondées sur la synthèse de formes, soit constitutionnellement active, soit dominante-négative, de Elk-1, une protéine associée à SRF au sein des complexes ternaires de mammifères, suggèrent que l'activation des gènes cibles de *pruned* passe par la formation d'un complexe ternaire activé [6]. L'origine et la nature du signal activant ce complexe ternaire et la (ou les) protéines de drosophile associées à Pruned restent cependant à définir. Une hypothèse séduisante serait que le signal FGF/FGF-R (Btl/Bnl) soit à l'origine de cette cascade de régula-

tion. Il est possible que Ras/Raf/MAPK interviennent dans cette cascade; en effet, l'expression ubiquitaire de formes activées de *D-ras* et de *D-raf-1* permet un sauvetage partiel du défaut de migration des cellules trachéales dans un embryon mutant *breathless* (*btl*), suggérant que l'activation de *btl* par son ligand Bnl active la cascade de transduction Ras/Raf/MAPK [15]. Le caractère partiel du sauvetage observé ne permet cependant pas de l'affirmer avec certitude.

Conservation évolutive ?

De même que le système trachéal de la drosophile, la formation de structures arborisées comme le poumon ou le système vasculaire des mammifères implique un programme de branchement complexe et reproductible. La production de FGF7 dans le mésenchyme du poumon en cours de formation et son implication dans la différenciation de l'épithélium pulmonaire chez la souris [1, 2] indiquent qu'au moins certains mécanismes contrôlant la formation d'un épithélium tubulaire ont été conservés entre vertébrés et invertébrés. La formation des branches trachéales terminales chez la drosophile et l'angiogenèse des mammifères présentent, par ailleurs, des analogies fonctionnelles et morphologiques remarquables. La forte conservation évolutive des facteurs impliqués dans l'ontogenèse du réseau trachéal de la drosophile suggère que des mécanismes analogues pourraient opérer chez les vertébrés. Cette hypothèse reste maintenant à vérifier au niveau moléculaire ■

RÉFÉRENCES

1. Peters K, Werner S, Liao X, Wert S, Whittsett J, Williams L. Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *EMBO J* 1994; 13: 3296-301.
2. Nogawa H, Ito T. Branching morphogenesis of embryonic mouse lung epithelium in mesenchyme-free culture. *Development* 1995; 121: 1015-22.
3. Sutherland D, Samakovlis C, Krasnow M. *branchless* encodes a drosophila FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 1996; 87: 1091-101.

RÉFÉRENCES

4. Klämbt C. The drosophila gene *pointed* encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development* 1993; 117: 163-76.
5. Samakovlis C, Hacohen N, Manning G, Sutherland DC, Guillemin K, Krasnow M. Development of the Drosophila tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development* 1996; 122: 1395-407.
6. Guillemin K, Groppe J, Dücker K, Treisman R, Hafen E, Affolter M, Krasnow M. The *pruned* gene encodes the drosophila serum response factor and regulates cytoplasmic outgrowth during terminal branching of the tracheal system. *Development* 1996; 122: 1353-62.
7. Manning G, Krasnow M. Development of the drosophila tracheal system. In: Martinez-Arias A, Bate M, eds. *The development of Drosophila*. Vol. 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1993: 609-85.
8. Glazer L, Shilo BZ. The drosophila FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension. *Genes Dev* 1991; 5: 697-705.
9. Birnbaum D, Goldfarb M, Lopez-Ferber M, Lovec H, Coulier F. Les FGF: une famille en croissance. *Med Sci* 1997; 13: 392-6.
10. Wassef M. FGF-8, un signal impliqué dans l'organisation du tube neural. *Med Sci* 1996; 12: 991-5.
11. Brand A, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 1993; 118: 401-15.
12. Affolter M, Montagne J, Walldorf U, Groppe J, Kloter U, LaRosa M, Gehring WJ. The drosophila SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a region required for tracheal development. *Development* 1994; 120: 743-53.
13. Treisman R. Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 96-101.
14. Blanchard J. Le proto-oncogène *c-fos*: un « entremetteur » moléculaire. *Med Sci* 1992; 8: 455-70.
15. Reichman-Fried M, Dickson B, Hafen E, Shilo BZ. Elucidation of the role of breathless, a Drosophila FGF receptor homolog, in tracheal cell migration. *Genes Dev* 1994; 8: 428-39.

Muriel Boubé
Alain Vincent

*Centre de Biologie du Développement,
UMR 5547 Cnrs/UPS, 118, route de Narbonne,
31062 Toulouse Cedex, France.*

TIRÉS À PART

M. Boubé.