

Mise en place de l'asymétrie droite-gauche : *Notch* et *Nodal* dans le nœud embryonnaire

Stéphane Vincent

École Normale Supérieure de Lyon, Cnrs UMR 5161, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.

Stephane.Vincent@ens-lyon.fr

Un des degrés de complexité des vertébrés supérieurs est l'asymétrie de leurs viscères. La mise en place de cette polarité droite-gauche (DG), chez la souris en particulier, se manifeste par la spécification du côté gauche dans l'embryon avant le début de l'organogenèse. Quatre étapes clés gouvernent ce processus (pour revue, voir [1] et Figure 1): (1) le premier événement est l'induction d'un signal asymétrique au niveau du nœud embryonnaire (centre organisateur localisé à l'extrémité apicale de la ligne primitive et responsable de l'organisation du tronc) probablement *via* le déclenchement d'un courant (flux nodal) orienté de la droite vers la gauche et créé par la rotation des cils des cellules ventrales du nœud; (2) ce signal se propage ensuite vers le mésoderme de la lame latérale gauche (MLL gauche); et (3) y active de façon transitoire une série de gènes conservés chez les vertébrés; (4) les produits de ces gènes permettent la traduction de ce signal asymétrique en différences morphologiques pendant l'organogenèse.

Quelles que soient les différences dans la mise en place de l'axe DG parmi les vertébrés, le gène *Nodal*, codant pour un membre de la super-famille des TGF- β (*transforming growth factor* β) occupe une place majeure et conservée. *Nodal*, connu depuis longtemps pour son rôle primordial dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur, est à l'origine de la cascade génique qui spécifie le côté gauche. Chez la souris, *Nodal* est le premier gène à être exprimé de façon asymétrique tout d'abord dans le nœud embryonnaire et ensuite dans le MLL gauche.

Trois études publiées récemment [2-4] démontrent une fonction précoce insoupçonnée de la voie de signalisation *Notch* dans la mise en place de l'axe DG. La voie *Notch*, conservée chez les eucaryotes supérieurs, est connue pour son rôle dans la médiation de nombreuses interactions cellulaires au cours du développement et en particulier dans la compartimentalisation de domaines spécifiques de l'aile de drosophile ou au cours de la somitogenèse chez les vertébrés. La particularité de la voie *Notch* est d'être impliquée dans la communication entre deux cellules voisines *via* l'interaction entre un ligand membranaire (membre de la famille DSL; *delta*, *ser-*

rata/jagged, *Lag2*) et un récepteur membranaire *Notch*. Cette interaction a pour conséquence le clivage de la partie cytoplasmique du récepteur *Notch* appelée NICD (*Notch intracellular domain*). Le NICD migre dans le noyau où il interagit avec les protéines CSL (CBF1/RBP-J κ , Su(H), Lag1). Les protéines CSL sont des répresseurs transcriptionnels qui interagissent avec une séquence spécifique d'ADN. L'interaction avec NICD a pour conséquence la conversion de ces répresseurs en activateurs transcriptionnels, permettant ainsi l'activation des gènes cibles (pour revue, voir [5]). La mutation de certains gènes codant pour des produits impliqués dans la voie

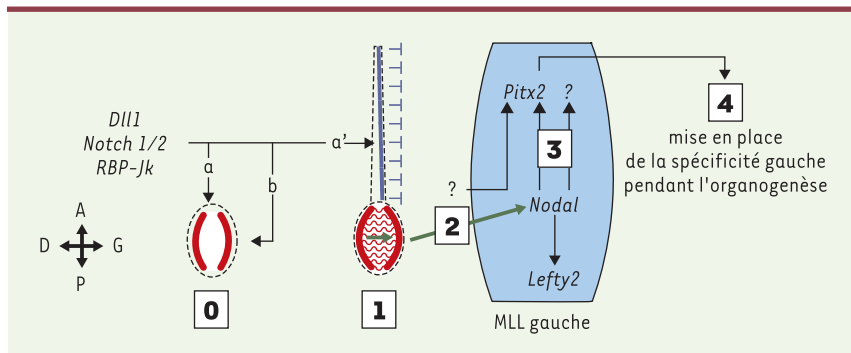


Figure 1. Mise en place de la polarité droite-gauche chez la souris. La spécification du côté gauche se fait en 4 étapes. **1.** Cassure de la symétrie: le flux nodal produit par les cellules ventrales du nœud embryonnaire modifie l'expression symétrique de *Nodal* (schématisée en rouge) qui devient plus intense du côté gauche. **2.** Transfert du signal asymétrique vers le mésoderme de la lame latérale gauche (MLL gauche): la nature de ce signal n'est pas établie, mais les protéines *Nodal* et *Fgf8* sont deux bons candidats. **3.** Activation de l'expression asymétrique de gènes (*Nodal*, *Lefty2*, *Pitx2*...). **4.** Conversion de l'expression génique en asymétrie morphologique pendant l'organogenèse. La voie *Notch* agit en amont de ces 4 étapes en activant l'expression de *Nodal* dans le nœud embryonnaire (0, a). Cette voie semble intervenir également dans la morphogenèse du nœud (0, b). De façon indirecte probablement *via* l'absence d'induction de *Nodal* dans le MLL gauche, la voie *Notch* enclenche les mécanismes indispensables à la mise en place de la barrière de la ligne médiane (0, a': expression de *Lefty1* schématisée en bleu).



Notch a pour conséquence la perturbation de la somitogenèse, mais elle affecte également la mise en place de l'axe DG [2-4]. La mutation du gène *delta 1* (*Dll1*) codant pour un ligand de Notch, entraîne un phénotype similaire à celui qui est associé à la perte de fonction de *Notch1* dans un contexte *Notch2* hypomorphe [4], ou de *RBP-Jκ* [4], effecteur principal du signal *Notch*. Au niveau moléculaire, l'expression des gènes spécifiques du côté gauche est affectée. En particulier, dans ces mutants, *Nodal* ne s'exprime pas dans le nœud (ce point est cependant controversé, G.K.Przemeck *et al.* ayant décrit que *Nodal* pouvait être détecté dans le nœud, ce que contestent L. Krebs *et al.* et A. Raya *et al.*); l'expression de l'antagoniste de *Nodal*, *Lefty1*, est absente dans le côté gauche du plancher neural suggérant l'absence de la barrière médiane. L'absence de *Nodal* dans le nœud des embryons *Dll1*^{-/-} explique l'absence d'activation des gènes en aval dans le MLL gauche, confirmant que l'expression de *Nodal* dans le nœud est cruciale pour la production du signal asymétrique, ce fait ayant déjà été démontré par l'analyse de deux allèles mutants du gène *Nodal* [6, 7]. La présence de cellules anormales perturbant la forme du nœud suggère que la voie *Notch* agit également

sur la morphogenèse du nœud [2]. La perte de l'expression de *Lefty1* pourrait être expliquée par la perturbation de la formation du plancher neural, structure dérivée du nœud embryonnaire, mais un travail récent suggère que c'est la conséquence de l'absence de *Nodal* dans le MLL gauche [8]. L'analyse de tous ces résultats et le fait que la perte de fonction de *Dll1* n'affecte pas le flux nodal [3] situent l'intervention de la voie *Notch* non pas dans la mise en place de la polarité DG, mais plutôt en amont, lors de l'activation de l'expression du gène clé *Nodal* (voir Figure 1, flèches a et b).

Le contrôle de l'expression de *Nodal* dans le nœud embryonnaire est assuré par un élément régulateur spécifique qui a été caractérisé par transgénèse [6, 9, 10] mais, jusqu'à présent, peu de données étaient disponibles quant à la nature des gènes impliqués dans l'activation de cet élément. J. Brennan *et al.* ont décrit des sites de fixation potentiels pour le facteur de transcription *Foxa2* impliqué dans la mise en place du nœud mais sans montrer la réalité de cette interaction [6]. Les auteurs des deux études publiées dans *Genes and Development* ont montré la présence de deux sites de fixation pour RBP-Jκ, actifs *in vivo*, démontrant le lien direct entre le contrôle de l'expression de *Nodal* et la voie de signalisation *Notch*.

Un autre aspect très intéressant de ces travaux est la démonstration que le gène *Pitx2*, effecteur de la spécification gauche et cible directe de *Nodal*, peut être induit en l'absence de *Nodal*, suggérant des mécanismes parallèles qui restent à décrire. Ceci remet en cause le dogme de l'unicité de *Nodal* en tant qu'activateur de la cascade génique spécifique du côté gauche dans le MLL. Les résultats de ces travaux soulèvent une question intéressante. En effet, les profils d'expression des membres de la voie *Notch* sont très caractéristiques: *Dll1* et *Notch1* sont exprimés en bordure du nœud et dans le mésoderme postérieur, alors que *Notch2* est exprimé dans le nœud ([2-4], Figure 2-1). Il est intéressant de noter que l'expression de *Nodal* n'est pas uniforme dans le nœud mais correspond à deux bandes de cellules en bordure du nœud (Figure 2-2). Comment expliquer alors que *Dll1*, *Notch1* et *Notch2*, qui sont exprimés de façon uniforme dans la bordure du nœud, y compris dans la partie postérieure, n'activent pas *Nodal* sur toute la bordure du nœud ? Ceci pourrait suggérer que d'autres facteurs entrent en jeu. Une hypothèse séduisante mais non testée serait l'implication de *lunatic fringe* (*Lnfg*) codant pour une glycosyltransférase. On sait en effet que *Lnfg* est capable de moduler l'interaction entre *Notch* et ses ligands; en particulier, chez la drosophile, *Fringe* potentialise l'interaction *Notch*-*Delta* au détriment de l'interaction *Notch*-*Serrata*. De façon remarquable, le profil d'expression de *Lnfg* dans la souris correspond à deux domaines latéraux partant de la bordure du nœud ([2-4], voir Figure 2-3). L'action de *Lnfg* pourrait être impliquée dans la régionalisation de l'activation de l'expression de *Nodal* dans le nœud embryonnaire, le domaine d'expression de *Nodal* se superposant à l'intersection des domaines d'expression de *Dll1*, *Notch1*, *Notch2* et *Lnfg*. La perte de fonction de *Lnfg* est létale à la naissance, mais aucun défaut de latéralité n'a été décrit jusqu'à présent [11]. Il est possible que *Lnfg* ne soit pas un facteur essentiel, mais il

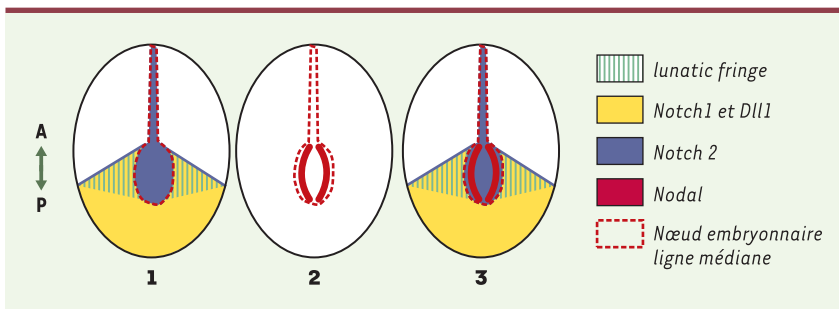


Figure 2. Profils d'expression des gènes *Notch1/2*, *Dll1*, *Lnfg* et *Nodal* au moment du déclenchement de l'expression de *Nodal* dans le nœud embryonnaire. 1. Profils d'expression des gènes *Notch1*, *Notch2*, *Dll1* et *Lnfg* à 7,5 jours post-coïtum. 2. Profils d'expression du gène *Nodal* au même stade de développement. 3. Superposition des profils d'expression montrant que le domaine d'expression de *Nodal* semble correspondre à l'intersection des profils d'expression de *Dll1*, *Notch1*, *Notch2* et *Lnfg* suggérant que ces 4 gènes participent à la régionalisation de l'expression de *Nodal*. Le gène codant pour RBP-Jκ, effecteur principal de la voie *Notch*, est exprimé de façon ubiquitaire. Les schémas représentent des embryons en vue ventrale.

serait intéressant d'étudier l'expression de *Nodal* dans les mutants *Lnfg* et de tester une éventuelle interaction génétique entre *Nodal* et *Lnfg*.

Si la philosophie de la mise en place de l'asymétrie DG est conservée chez les vertébrés, il y a des différences entre les espèces en particulier dans les mécanismes qui conduisent à l'expression de *Nodal* du côté gauche. A. Raya *et al.* ont montré que, chez le poisson zèbre, la voie *Notch* est aussi impliquée dans le contrôle de l'expression de *Nodal* et par conséquent dans la mise en place de l'asymétrie DG. Il est donc réconfortant de constater que l'évolution a conservé des mécanismes directement en amont de la détermination de la polarité DG.

Left-right asymmetry: Notch acts upstream of Nodal

RÉFÉRENCES

1. Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijoh Y. Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 103-13.
2. Przemeczek GK, Heinzmann U, Beckers J, Hrabe de Angelis M. Node and midline defects are associated with left-right development in Delta1 mutant embryos. *Development* 2003; 130: 3-13.
3. Krebs LT, Iwai N, Nonaka S, *et al.* Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. *Genes Dev* 2003; 17: 1207-12.
4. Raya A, Kawakami Y, Rodriguez-Esteban C, *et al.* Notch activity induces Nodal expression and mediates the establishment of left-right asymmetry in vertebrate embryos. *Genes Dev* 2003; 17: 1213-8.
5. Mumm JS, Kopan R. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* 2000; 228: 151-65.
6. Brennan J, Norris DP, Robertson EJ. Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. *Genes Dev* 2002; 16: 2339-44.
7. Saijoh Y, Oki S, Ohishi S, Hamada H. Left-right patterning of the mouse lateral plate requires nodal produced in the node. *Dev Biol* 2003; 256: 160-72.
8. Yamamoto M, Mine N, Mochida K, *et al.* Nodal signaling induces the midline barrier by activating Nodal expression in the lateral plate. *Development* 2003; 130: 1795-804.
9. Norris DP, Robertson EJ. Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. *Genes Dev* 1999; 13: 1575-88.
10. Adachi H, Saijoh Y, Mochida K, *et al.* Determination of left/right asymmetric expression of nodal by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a lefty-2 enhancer. *Genes Dev* 1999; 13: 1589-600.
11. Zhang N, Gridley T. Defects in somite formation in lunatic fringe-deficient mice. *Nature* 1998; 394: 374-7.

NOUVELLE

La résistance du moustique *Culex pipiens* aux insecticides

Mylène Weill, Olivier Duron, Pierryck Labbé, Arnaud Berthomieu, Michel Raymond

► Le moustique *Culex pipiens* est présent en zones tropicales et tempérées. Sa nuisance due aux piqûres et aux maladies qu'il véhicule (filariose, fièvre du Nil...) a poussé l'homme à le combattre activement dans de nombreux pays à l'aide d'insecticides. Au cours des dernières décennies, *Culex pipiens* a développé des résistances à une grande variété d'insecticides (DDT, pyréthrinoïdes, carbamates, organophosphorés, toxines de *Bacillus sphaericus*, etc.).

La résistance aux insecticides organophosphorés (OP) représente un excellent modèle d'étude de l'adaptation à un nouvel environnement. Ces insecticides inhibent l'acétylcholinestérase, enzyme res-

ponsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine dans les synapses cholinergiques (Figure 1). Cette inhibition prolonge la durée de l'influx nerveux, ce qui conduit rapidement à la mort du moustique. Développer une résistance à ces toxiques implique donc de supprimer ou de diminuer l'inhibition de l'acétylcholinestérase des synapses. L'étude des différents phénotypes de résistance et des changements génétiques qui leur sont associés permet d'appréhender finement comment se fait cette adaptation et comment elle se modifie au cours du temps [1].

Il est important de comprendre que le moustique ne mute pas pour résister aux

Institut des Sciences de l'Évolution, Génétique et Environnement, Université de Montpellier II (CC 065), 34095 Montpellier 05, France.
weill@isem.isem.univ-montp2.fr

insecticides ! De très nombreuses mutations pré-existent dans les immenses populations de moustiques. Lorsque des insecticides sont présents dans l'environnement, les moustiques qui ont des mutations favorables à leur survie se reproduisent et les transmettent ainsi à leurs descendants, alors que les moustiques sensibles aux toxiques meurent. Les mutations conférant aux moustiques la capacité de résister aux OP ne sont pas engendrées, mais sélectionnées par le milieu. Plus simplement, la fréquence des moustiques porteurs de ces mutations augmente dans un environnement toxique.

Les gènes impliqués dans la résistance aux OP chez *Culex pipiens*

Seuls trois locus sont responsables de résistances majeures, *Est-2*, *Est-3* et