

## Une augmentation du calcium intracellulaire contrôle l'expression d'une arginine N-méthyl-transférase impliquée dans la détermination neurale chez l'embryon d'amphibien

Isabelle Néant, Catherine Leclerc,  
Julie Batut, Laurence Vandel, Marc Moreau

La formation du système nerveux des vertébrés débute au moment de la gastrulation avec l'induction et la formation de la plaque neurale sur la face dorsale de l'embryon. C'est en fin de gastrulation, au sein de la plaque neurale que se différencieront les neurones primaires. Au stade *blastula* et jeune *gastrula* (7 à 9 heures après la fécondation), l'ectoderme de l'amphibien *Xenopus laevis* peut évoluer vers un destin épidermique ou neural. Les travaux de la dernière décennie ont montré que l'ectoderme se détermine en épiderme en réponse à l'activation de la voie de signalisation BMP4 et prend un destin neural lorsque cette voie est inhibée par des facteurs sécrétés par le mésoderme dorsal, tels que noggin, chordin ou follistatine. L'induction neurale se ferait donc selon un mécanisme « par défaut », qui ne nécessiterait que l'inhibition de la voie BMP4 et ne conduirait pas à l'activation d'une cascade de transduction spécifique [1]. Ce modèle, bien que largement admis, présente des limites. Il a été principalement établi à partir d'expériences réalisées sur des ectodermes isolés et jamais sur l'embryon entier. Le modèle d'induction neurale « par défaut » n'est pas généralisable à l'embryon de poulet ou d'ascidie où l'induction neurale nécessite un signal instructif faisant, entre

autres, intervenir la voie de signalisation FGF [2]. Des résultats récents obtenus sur l'embryon de xénope montrent que la répression de la voie de signalisation BMP4 est requise pour supprimer le destin épidermique mais qu'elle n'est pas suffisante pour induire le destin neural [3]. Nous nous intéressons aux voies de signalisation calcium-dépendantes qui contrôlent les phases précoces de la formation du système nerveux chez l'amphibien. Par des techniques d'imagerie calcique, associées à des approches de biologie cellulaire et moléculaire, nous avons montré que le calcium joue un rôle crucial dans la transduction du signal neuralisant via des canaux calciques potentiel-dépendants sensibles aux dihydropyridines (DHP) [4, 5]. Ainsi dans l'embryon de xénope, depuis le stade *blastula* (stade 8) jusqu'à la fin de la gastrulation (stade 13-14), il se produit des variations de calcium spontanées et transitoires [6, 7]. Ces variations sont restreintes à l'ectoderme dorsal et l'inhibition de ces variations transitoires, soit par le BAPTA (un chélateur de calcium), soit par un antagoniste des canaux  $Ca^{2+}$  sensibles aux DHP, perturbe l'induction neurale et inhibe l'expression

de gènes proneuraux comme *Zic3*. De plus, appliqué sur des ectodermes isolés, le facteur neuralisant noggin provoque une augmentation de calcium intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ) via l'activation de canaux  $Ca^{2+}$  sensibles aux DHP (figure 1C). Certains facteurs de transcription sont des cibles privilégiées du calcium. Ainsi le gène *c-fos* est activé pendant l'induction neurale, qu'elle soit déclenchée par noggin ou par une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  [8]. Deux gènes proneuraux, *XIPOU2* et *Zic3* (*Zinc finger protein of cerebellum 3*), sont également activés à la suite de la stimulation de l'ectoderme par noggin ou par une variation de  $[Ca^{2+}]_i$ , qu'elle soit induite par les DHP ou par la caféine. Inversement, le blocage des signaux calciques inhibe l'expression des gènes proneuraux [9, 10]. Nos résultats montrent que le calcium est nécessaire et suffisant pour déterminer les cellules de l'ectoderme dans la voie neurale. Nous avons recherché des gènes précoces de la détermination neurale contrôlés par le calcium. Grâce à une banque soustractive d'ADNc, réalisée

I. Néant, C. Leclerc, M. Moreau :  
GDR 2688 et Centre de Biologie du Développement,  
UMR 5547, Université Paul Sabatier,  
118, route de Narbonne,  
31062 Toulouse Cedex 04, France.  
L. Vandel : Centre de Biologie du Développement,  
UMR 5547, Université Paul Sabatier,  
118, route de Narbonne,  
31062 Toulouse Cedex 04, France.  
J. Batut : Laboratory of Developmental Signalling,  
Cancer Research UK, London Research Institute,  
Lincoln's Inn Fields Laboratories,  
44 Lincoln's Inn Fields,  
WC2A 3PX Londres, Royaume-Uni.  
[moreau@cict.fr](mailto:moreau@cict.fr)



à partir d'ectodermes isolés induits par une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  provoquée par la caféine *versus* non induits (Figure 1A), nous avons sélectionné une trentaine de gènes précoces contrôlés par le calcium et qui s'expriment dans les futurs territoires neuraux [11]. Nous avons plus particulièrement porté notre attention sur une arginine N-méthyl-transférase, *xPRMT1b*. Nos expériences ont été réalisées à la fois sur des ectodermes isolés et sur des embryons *in toto* [12].

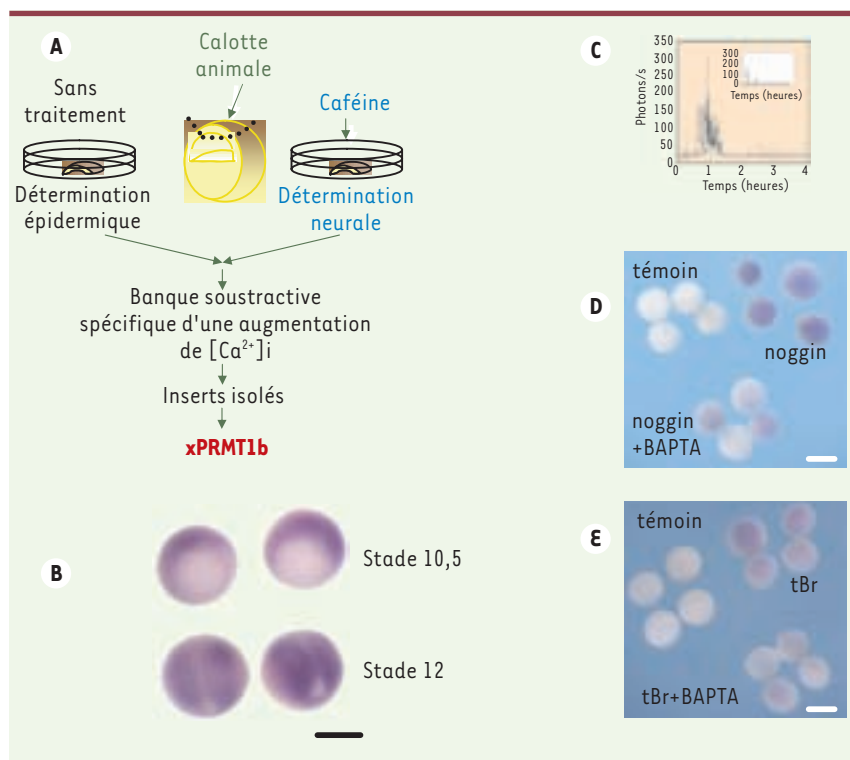
Sur les ectodermes isolés, l'expression de *xPRMT1b* est induite par une aug-

mentation de  $[Ca^{2+}]_i$  provoquée soit par la caféine, soit par l'inhibition de la signalisation BMP par noggin, soit par l'expression d'un récepteur BMP4 non fonctionnel (tBr). Dans ces deux derniers cas, elle est inhibée spécifiquement par le BAPTA (Figure 1D, E). Nous avons également montré que *xPRMT1b* est un gène de réponse directe à l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  car son expression en présence de caféine ne nécessite pas de synthèse de protéines *de novo*.

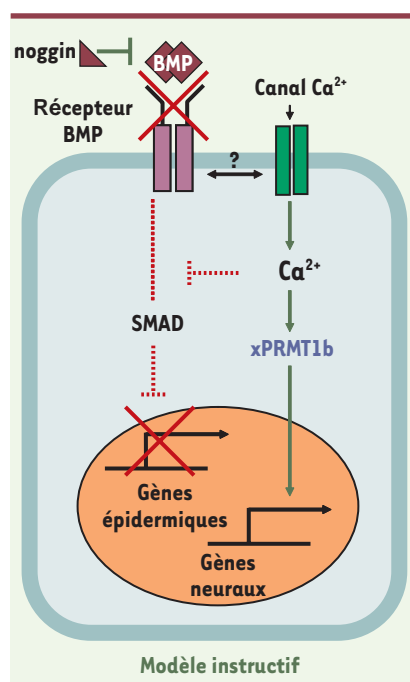
Par hybridation *in situ*, nous avons suivi dans l'embryon *in toto* le profil d'expres-

sion spatio-temporel de *xPRMT1b*. L'ARN messager de *xPRMT1b* est détecté dès le début de la gastrulation, dans tout l'ectoderme ainsi que dans le mésoderme dorsal. Son expression est ensuite restreinte aux territoires neuraux dans les stades plus tardifs (Figure 1B). Les antagonistes des canaux  $Ca^{2+}$  sensibles aux DHP inhibent l'expression de *xPRMT1b*. L'expression de *xPRMT1b* dans l'embryon résulte donc d'une entrée de calcium par les canaux  $Ca^{2+}$  sensibles aux DHP.

Le rôle de *xPRMT1b* au cours de l'induction neurale a été abordé par gain (surexpression de l'ARN messager) et perte de



**Figure 1. Identification du gène codant pour une arginine N-méthyl-transférase de type I, *xPRMT1b*, à partir d'une banque soustractive réalisée entre des ectodermes induits par une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  provoquée par la caféine et des ectodermes non induits.** **A.** Principe de l'expérience : l'ectoderme ou calotte animale est prélevé au stade blastula. **B.** Expression de *xPRMT1b* détectée par hybridation *in situ* en début de gastrulation (stade 10,5, l'encoche blastoporale est vers le haut) et en fin de gastrulation (stade 12, partie antérieure vers le haut). À ce stade, l'expression de *xPRMT1b* est restreinte à la plaque neurale (échelle 0,5 mm). **C.** L'inducteur neural noggin provoque une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  inhibée par la nifédipine, antagoniste des canaux calciques sensibles aux dihydropyridines (encart). **D.** noggin induit l'expression de *xPRMT1b* selon un mécanisme calcium-dépendant : le BAPTA (chélateur de calcium) réduit fortement cette expression. **E.** La surexpression dans les cellules de l'ectoderme d'un récepteur non fonctionnel de BMP4 (tBr), conduit à l'inhibition de la voie de détermination épidermique et oriente les cellules vers un destin neural. L'expression de *xPRMT1b* induite dans ces conditions est réduite en présence de BAPTA (échelle D, E : 0,2 mm).



**Figure 2. Modèle instructif d'induction neurale.**

L'inactivation de la voie de signalisation du facteur BMP4 par noggin est requise pour orienter les cellules de l'ectoderme vers un destin neural. Cependant dans l'embryon cette inhibition n'est pas suffisante. Une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  est nécessaire pour induire l'expression de *xPRMT1b* et activer des gènes neuraux précoces comme *Zic3* ou *XIPOU2* [6]. Le calcium entre par des canaux membranaires sensibles aux dihydropyridines et pourrait aussi agir en réprimant la voie de transduction de BMP4. Les relations entre les récepteurs de BMP4 et le canal calcique sont encore inconnues

fonction (approche morpholino) [13]. Le messenger de *xPRMT1b* est injecté dans l'embryon au stade 2 cellules, puis l'ectoderme est isolé au stade *blastula* et l'expression de marqueurs neuraux est analysée par RT-PCR. *xPRMT1b* induit l'expression de gènes précoces impliqués dans la détermination neurale de l'ectoderme (*Zic3* et *Neurogenine*) ainsi que de marqueurs de détermination (*Engrailed2* et *N-CAM*) et de différenciation neurale (*N-tubuline*). En présence de cycloheximide, l'expression de *Zic3* est maintenue, tandis que l'expression d'*Engrailed2* est inhibée. Cela démontre que *Zic3* est une cible directe de *xPRMT1b*, alors que l'expression d'*Engrailed2* nécessite une synthèse protéique. L'expression des marqueurs neuraux induite par une augmentation [ $Ca^{2+}$ ]i est fortement réduite dans les ectodermes isolés à partir d'embryons injectés avec un morpholino contre *xPRMT1b*. Dans l'embryon, la perte de fonction de *xPRMT1b* par injection de morpholino contre *xPRMT1b* bloque le développement de la partie antérieure du système nerveux. Ces résultats

suggèrent que l'enzyme *xPRMT1b* est un lien direct entre l'augmentation de calcium intracellulaire et les événements en aval de l'induction neurale.

Nos travaux permettent de donner la première évidence de l'expression tissulaire spécifique d'une arginine N-méthyltransférase dans un système intégré et de moduler le concept d'induction neurale par défaut (Figure 2). Nous suggérons qu'un mécanisme instructif dépendant du calcium est nécessaire pour orienter les cellules de l'ectoderme vers un destin neural [4]. ♦

### An increase in intracellular free calcium controls the expression of an arginine N-methyl-transferase involved in neural determination in amphibian embryo

#### RÉFÉRENCES

1. Weinstein DC, Hemmati-Brivanlou A. Neural induction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 411-33.
2. Stern CD. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development* 2005; 132: 2007-21.

3. Delaune E, Lemaire P, Kodjabachian L. Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development* 2005; 132: 299-310.
4. Moreau M, Leclerc C. The choice between epidermal and neural fate: a matter of calcium. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 75-84.
5. Moreau M, Leclerc C, Gualandris-Pariset L, et al. Increased internal  $Ca^{2+}$  mediates neural induction in the amphibian embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12639-43.
6. Leclerc C, Webb SE, Daguzan C, et al. Imaging patterns of calcium transients during neural induction in *Xenopus laevis* embryos. *J Cell Sci* 2000; 113: 3519-29.
7. Webb SE, Moreau M, Leclerc C, et al. Calcium transients and neural induction in vertebrates. *Cell Calcium* 2005; 37: 375-85.
8. Leclerc C, Duprat AM, Moreau M. Noggin upregulates Fos expression by a calcium-mediated pathway in amphibian embryos. *Dev Growth Differ* 1999; 41: 227-38.
9. Leclerc C, Lee M, Webb SE, et al. Calcium transients triggered by planar signals induce the expression of *ZIC3* gene during neural induction in *Xenopus*. *Dev Biol* 2003; 261: 381-90.
10. Leclerc C, Rizzo C, Daguzan C, et al. Neural determination in *Xenopus laevis* embryos: control of early neural gene expression by calcium. *J Soc Biol* 2001; 195: 327-37.
11. Batut J, Neant I, Leclerc C, et al. xMLP is an early response calcium target gene in neural determination in *Xenopus laevis*. *J Soc Biol* 2003; 197: 283-9.
12. Batut J, Vandel L, Leclerc C, et al. The  $Ca^{2+}$ -induced methyltransferase *xPRMT1b* controls neural fate in amphibian embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 15128-33.
13. Heasman J. Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol* 2002; 243: 209-14.

## NOUVELLE

### Du cancer au traitement du diabète Le suppresseur de tumeur LKB1 comme nouvelle cible pharmacologique

Marc Foretz, Bruno Guigas, Benoît Viollet

> Le maintien du taux de glucose sanguin dans des valeurs étroites est une nécessité physiologique comme le soulignent les complications sévères liées au diabète. L'homéostasie glucidique résulte de l'action conjointe de plusieurs organes qui équilibrent leurs capacités à produire ou à utiliser du glucose. Parmi ces organes, le foie joue un rôle impor-

tant dans cet équilibre car il représente une source essentielle de glucose au cours du jeûne. Afin de réduire la glycémie excessive des patients diabétiques de type 2, la metformine (Glucophage®), une molécule de la famille des biguanides, est utilisée couramment depuis plusieurs dizaines d'années sans que l'on connaisse encore aujourd'hui son

M. Foretz, B. Viollet : Institut Cochin, Département Endocrinologie, Métabolisme et Cancer, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

[foretz@cochin.inserm.fr](mailto:foretz@cochin.inserm.fr)

[viollet@cochin.inserm.fr](mailto:viollet@cochin.inserm.fr)

B. Guigas : Unité Hormones et Métabolisme, Institut Christian de Duve de Pathologie Cellulaire, 75, avenue Hippocrate, B-1200 Bruxelles, Belgique.

[Bruno.Guigas@horm.ucl.ac.be](mailto:Bruno.Guigas@horm.ucl.ac.be)