RÉFÉRENCES

1. Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1952 ; 38 : 455-63.
2. Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958 ; 182 : 64-5.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 ; 126 : 663-76.
4. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861-72.
5. Tiscornia G, Vivas EL, Izpisua Belmonte JC. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nat Med* 2011 ; 17 : 1570-6.
6. Papp B, Plath K. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Res* 2011 ; 21 : 486-501.
7. Liu GH, Barkho BZ, Ruiz S, et al. Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2011 ; 472 : 221-5.
8. Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 2010 ; 143 : 527-39.
9. Liu GH, Qu J, Suzuki K, et al. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature* 2012 ; 491 : 603-7.
10. Winner B, Melrose HL, Zhao C, et al. Adult neurogenesis and neurite outgrowth are impaired in LRRK2 G2019S mice. *Neurobiol Dis* 2011 ; 41 : 706-16.
11. Coulombel L. Reprogrammation nucléaire d'une cellule différenciée : on efface tout et on recommence. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 667-70.
12. Maury Y, Gauthier M, Peschanski M, Martinat C. Human pluripotent stem cells: opening key for pathological modeling. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 443-6.
13. Laustriat D, Gide J, Héchar C, Peschanski M. Les cellules souches embryonnaires et le pharmacologue. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 (suppl 2) : 32-8.

NOUVELLE

Une avancée technique pour comprendre la dynamique de l'horloge de segmentation

Emilie A. Delaune¹, Paul François², Nathan P. Shih³, Sharon L. Amacher⁴

¹ Laboratoire de biologie moléculaire de la cellule (LBMC), UMR5239, CNRS/UCBL/ENS de Lyon, 46, allée d'Italie, 69007 Lyon, France ;

² McGill university, Montreal, Québec, Canada ;

³ University of California at Berkeley, Berkeley, États-Unis ;

⁴ The Ohio state university, Columbus, États-Unis.

emilie.delaune-henry@ens-lyon.fr

► Chez les vertébrés, certains éléments du corps, tels que les vertèbres et les muscles axiaux, sont répétés le long de l'axe antéropostérieur. Cette métamérie prend naissance pendant le développement embryonnaire lors de la segmentation du mésoderme présomitique. Ce dernier s'étend longitudinalement de part et d'autre du plan médian de l'embryon (Figure 1A). Au fur et à mesure que le mésoderme présomitique s'allonge grâce à l'arrivée de nouvelles cellules à son extrémité postérieure, les cellules les plus antérieures se séparent périodiquement du mésoderme présomitique et forment des blocs de cellules épithéliales, appelés somites. La somitogenèse constitue un magnifique exemple de structuration d'un tissu au cours du développement, qui frappe par son extraordinaire périodicité, à la fois spatiale et temporelle. Comment cette périodicité est-elle contrôlée ?

Analyse par un système rapporteur des oscillations de l'horloge au cours de la somitogenèse

La somitogenèse est régie par un oscillateur moléculaire, l'horloge de segmen-

tation, dont l'existence est révélée par la transcription périodique de gènes « cycliques » dans le mésoderme présomitique [1]. Des vagues d'expression de ces gènes cycliques sont générées dans le mésoderme présomitique postérieur avec une période identique à la celle de la somitogenèse et se propagent antérieurement (Figure 1A). L'horloge de segmentation reposerait sur un réseau complexe d'interactions génétiques et biochimiques, dont la nature n'est pas encore bien comprise, et qui implique une coordination de la multitude d'oscillateurs individuels que sont les cellules du mésoderme présomitique.

La dynamique de l'horloge a été abordée par diverses approches [2] : analyse du profil d'expression des gènes cycliques dans des cohortes d'embryons fixés, comparaison de ce profil entre des moitiés d'embryon dont le développement est à un stade d'avancement différent, marquage à haute résolution permettant de distinguer les transcrits naissants (nucléaires) des transcrits tardifs (cytoplasmiques) et, plus récemment, imagerie directe en temps réel de rapporteurs

permettant de visualiser l'expression de gènes cycliques chez la souris. Pour comprendre les mécanismes qui génèrent et synchronisent les oscillations, il est essentiel de visualiser l'activité de l'horloge au niveau cellulaire. Visualiser un processus aussi dynamique grâce à un système rapporteur est délicat car : (1) le rapporteur doit être produit et dégradé dans le court temps d'un cycle de l'horloge (2 h chez la souris, 30 min chez le poisson zèbre), (2) le rapporteur doit rester détectable malgré sa grande instabilité, et (3) l'activité de l'horloge endogène ne doit pas être affectée par le rapporteur [2]. Les premiers rapporteurs de l'horloge développés chez la souris ont permis de visualiser les vagues d'expression de gènes cycliques au niveau tissulaire [3-5]. Afin d'atteindre un niveau de résolution cellulaire, nous nous sommes tournés vers le modèle du poisson zèbre, dont la transparence et le développement externe sont des atouts pour l'imagerie à haute résolution. Dans un travail publié récemment dans *Developmental Cell*, nous avons développé un système rapporteur très dynamique de l'horloge,

ainsi que des outils essentiels de mesure des oscillations, et nous avons analysé les mécanismes de synchronisation des cellules du mésoderme présomitique [6].

Utilisation du rapporteur Her1-Venus et mesure des oscillations de l'horloge à l'échelle cellulaire

Notre système rapporteur est basé sur les séquences régulatrices (promoteur et 3' UTR) du gène cyclique *her1* (*hairy/enhancer of split-related gene*) [7]. Lorsque la séquence codante pour la protéine GFP (*green fluorescent protein*) est placée sous le contrôle du promoteur *her1*, elle est transcrite de manière cyclique, mais produit un signal uniforme en raison de sa grande stabilité [7]. Nous avons utilisé Venus, une protéine dérivée de la GFP dont la maturation est rapide, et nous avons testé plusieurs stratégies pour en diminuer la demi-vie. En fusionnant Venus avec une séquence PEST (séquence riche en proline [P], acide glutamique [E], sérine [S], et thréonine [T]) ou un motif bi-ubiquitine, deux signaux de dégradation protéique utilisés l'un et l'autre avec succès pour générer des rapporteurs de l'horloge chez la souris [3, 4], nous avons obtenu des rapporteurs soit trop stables (motif PEST), soit au contraire trop instables pour être détectés en temps réel (motif bi-ubiquitine). En revanche, nous avons observé des oscillations en fusionnant Venus avec la séquence codante de la protéine Her1, elle-même instable (Figure 1B). Nous avons établi une lignée transgénique de poissons zèbre exprimant Her1-Venus et montré que l'impact du rapporteur sur l'horloge endogène est minime dans des embryons hétérozygotes. Pour mesurer l'évolution du signal Her1-Venus dans des cellules du mésoderme présomitique, nous avons filmé en microscopie confocale des embryons exprimant non seulement le rapporteur, mais aussi des marqueurs membranaire et nucléaire des cellules (Figure 1C). Nous avons développé un programme pour délimiter les cellules dans les trois dimensions, les suivre au cours du temps et quantifier à chaque instant le signal

Figure 1. Stratégie de visualisation en temps réel de l'activité de l'horloge de segmentation.

A. Modèle de somitogenèse. Le mésoderme présomitique (PSM) et les somites sont schématisés en vue dorsale. Les flèches grises représentent l'arrivée continue de nouvelles cellules dans le mésoderme présomitique postérieur, et le point noir, une de ces cellules. Au fur et à mesure de la segmentation, cette cellule devient de plus en plus antérieure au sein du mésoderme présomitique, alors que sa position absolue par rapport à l'axe antéro-postérieur de l'embryon varie peu. La transcription d'un gène cyclique typique au cours d'un cycle de segmentation est figurée en vert. **B.** Rapporteur de l'horloge, basé sur les séquences codante et régulatrices du gène cyclique *her1*. **C.** Image en microscopie confocale du mésoderme présomitique (vue latérale) dans un embryon exprimant le rapporteur de l'horloge Her1-Venus (vert), ainsi que des marqueurs membranaire (rouge) et nucléaire (bleu). Le signal nucléaire Her1-Venus est détecté avec un niveau de résolution cellulaire.

Her1-Venus nucléaire. Les paramètres des oscillations ont été extraits des courbes de mesure brutes à l'aide d'un algorithme validé empiriquement. En

particulier, nous avons mesuré dans quelle phase du cycle d'oscillation se trouve chaque cellule à un instant donné.

Figure 2. Impact de la voie de signalisation Notch et de la mitose sur la synchronisation de cellules voisines. **A.** Image de cellules du mésoderme présomitique (en vue latérale, antérieure à droite) dont les noyaux sont colorés en fonction de leur phase d'oscillation. Dans cet embryon exprimant Her1-Venus en contexte sauvage, les cellules présentent une transition de phase progressive le long de l'axe antéro-postérieur, indiquant que leurs oscillations sont finement coordonnées. **B.** Bilan schématisé de nos résultats. Un groupe de cellules voisines oscillent de manière synchrone dans des embryons exprimant Her1-Venus en contexte sauvage. Elles oscillent encore, mais de manière désynchronisée, dans des mutants de la voie Notch. Dans des contextes sauvage ou mutant de la voie Notch, la division cellulaire perturbe les oscillations et génère deux cellules filles parfaitement synchronisées (qui se resynchronisent ensuite progressivement avec leurs voisines dans les embryons sauvages).

Importance de la voie Notch pour la synchronisation des oscillations

La coloration virtuelle des noyaux en fonction de la phase des cellules permet de visualiser directement un ralentissement des oscillations le long de l'axe antéro-postérieur, caractéristique des vagues d'expression des gènes cycliques (Figure 2A). Le caractère progressif de cette transition de phase indique que les cellules voisines oscillent de manière synchronisée, ce que nous avons pu

quantifier en calculant la différence de phase sur un grand nombre de couples de cellules voisines. Comme la segmentation est très perturbée dans les mutants de la voie de signalisation Notch, et que les gènes cycliques présentent un profil d'expression erratique dans le mésoderme présomitique d'embryons fixés, il a été suggéré en 2000 que les cellules oscillent de manière désynchronisée en l'absence de signalisation Notch [8]. En mesurant l'activité de Her1-Venus dans

divers mutants de la voie Notch, nous avons pu confirmer cette interprétation au moyen d'une démonstration directe (Figure 2B).

Impact de la mitose sur les oscillations de l'horloge

Le maintien de la synchronisation est essentiel pour lutter contre des perturbations d'oscillations qui peuvent survenir notamment lors de la division cellulaire [9]. Nous avons observé un arrêt temporaire des oscillations dans la plupart des cas de mitose. À la reprise des oscillations, les cellules sœurs issues d'une même mitose sont généralement déphasées par rapport à leurs voisines mais, de manière surprenante, elles restent extrêmement synchronisées entre elles, que ce soit dans des contextes sauvage ou mutant de la voie Notch (Figure 2B). Ceci suggère que chaque cellule hériterait d'un ensemble de facteurs suffisants pour déterminer le démarrage de plusieurs oscillations, et souligne la robustesse d'un mécanisme intracellulaire et indépendant de Notch qui génère et/ou entretient les oscillations. Enfin, nous avons observé que les mitoses surviennent préférentiellement lorsque le groupe de cellules environnantes se trouve dans une certaine phase du cycle d'oscillation. Ainsi, l'horloge serait possiblement liée au cycle cellulaire via des mécanismes qui restent à élucider.

Conclusions et perspectives

Notre travail ouvre la porte à une nouvelle approche pour étudier les mécanismes de l'horloge. Bien que Her1-Venus présente certaines limitations, telles qu'un signal dans le mésoderme présomitique postérieur trop faible pour analyser les mécanismes d'initiation et de synchronisation des cellules dans cette région, il est possible d'obtenir un système rapporteur à la fois hautement instable et détectable chez le poisson zèbre. Les progrès réalisés dans la synthèse de protéines fluorescentes dont la maturation est rapide, ainsi que dans

la sensibilité des techniques d'imagerie, permettront de continuer à développer de nouveaux rapporteurs. En outre, les outils de détection et de suivi des cellules, ainsi que l'analyse des oscillations permettront de développer le même type d'approche chez d'autres vertébrés. ♦

A technical breakthrough for understanding segmentation clock dynamics and synchrony

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Pourquie O. Vertebrate segmentation: from cyclic gene networks to scoliosis. *Cell* 2011 ; 145 : 650–63.
2. Soroldoni D, Oates AC. Live transgenic reporters of the vertebrate embryo's segmentation clock. *Curr Opin Genet Dev* 2011 ; 21 : 600–5.
3. Masamizu Y, Ohtsuka T, Takashima Y, et al. Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 1313–8.
4. Aulehla A, Wiegand W, Baubet V, et al. A beta-catenin gradient links the clock and wavefront systems in mouse embryo segmentation. *Nat Cell Biol* 2008 ; 10 : 186–93.
5. Takashima Y, Ohtsuka T, Gonzalez A, et al. Intronic delay is essential for oscillatory expression in the segmentation clock. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 3300–5.
6. Delaune EA, François P, Shih NP, Amacher SL. Single-cell-resolution imaging of the impact of Notch signaling and mitosis on segmentation clock dynamics. *Dev Cell* 2012 ; 23 : 995–1005.
7. Gajewski M, Sieger D, Alt B, et al. Anterior and posterior waves of cyclic *her1* gene expression are differentially regulated in the presomitic mesoderm of zebrafish. *Development* 2003 ; 130 : 4269–78.
8. Jiang YJ, Aerns BL, Smithers L, et al. Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. *Nature* 2000 ; 408 : 475–9.
9. Horikawa K, Ishimatsu K, Yoshimoto E, et al. Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature* 2006 ; 441 : 719–23.

NOUVELLE

Évolution et cancer

Expansion des familles de gènes dangereux par duplication du génome

Séverine Affeldt^{1*}, Param Priya Singh^{1*}, Ilaria Cascone², Rasim Selimoglu², Jacques Camonis², Hervé Isambert¹

¹CNRS-UPMC UMR168, ²Inserm U830, Institut Curie, Centre de recherche, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris, France.

*Contribution égale des auteurs
herve.isambert@curie.fr

► Si la conservation des gènes essentiels à la vie des organismes se conçoit intuitivement bien, à l'inverse, l'étonnante expansion des familles de gènes à l'origine des cancers ou d'autres maladies génétiques chez les vertébrés pose question. Alors qu'on pourrait supposer que la multiplication de ces gènes « dangereux » confère malgré tout un avantage sélectif, nos travaux récents [1] suggèrent en fait que ces gènes ont été multipliés et conservés en raison de leur dangerosité à la suite de deux accidents génétiques majeurs correspondant à des duplications globales de génome.

De l'expansion des familles de gènes dangereux chez les vertébrés

Pour comprendre l'origine de l'expansion des familles de gènes dangereux chez les vertébrés, il faut remonter à l'ancêtre commun de tous les vertébrés, il y a quelque 500 millions d'années. Par un mécanisme presque toujours létal,

mais qui a joué un rôle essentiel au cours de l'évolution, notre lignée encore invertébrée a entièrement dupliqué son génome deux fois de suite et a survécu à ces deux accidents génétiques majeurs. Ces deux duplications globales du génome ont conduit à l'émergence et à la complexification des vertébrés dont certains gènes ont conservés jusqu'à quatre copies. Au total, un quart à un tiers de nos gènes serait directement issu de ces deux duplications de génome à l'origine des vertébrés [2]. Ces gènes sont appelés gènes ohnologues en l'honneur du généticien Susumu Ohno qui fut le premier à avancer l'hypothèse de ces duplications globales du génome chez les vertébrés [3].

Après une duplication globale du génome, les organismes perdent généralement près de 80 à 90 % des gènes dupliqués, ce qui entraîne une expansion hétérogène de leurs voies de signalisation (Figure 1) et de leurs réseaux

de gènes [4–6]. Cependant, de façon surprenante, on constate que les copies ohnologues retenues dans le génome humain comportent un nombre élevé de gènes dangereux, c'est-à-dire présentant une forte susceptibilité aux mutations délétères dominantes comme les oncogènes notamment. Certains de ces gènes dangereux ont même gardé leurs quatre copies depuis l'origine des vertébrés ! C'est le cas par exemple des gènes *RalGEF* (*Ral guanine-nucleotide exchange factor*) (Figure 1) qui activent les voies Ras-Ral impliquées dans la migration et la prolifération cellulaires dans des tumeurs [7]. De même, le gène *Ras*, qu'on retrouve en un seul exemplaire chez les invertébrés comme la drosophile (Figure 1), a conservé chez la plupart des vertébrés trois ohnologues proto-oncogéniques (*KRas*, *HRas* et *NRas*) (Figure 1) qui présentent des mutations constitutivement actives dans plus de 25 % des cas de cancer chez l'homme.