

Brachyury, un gène essentiel pour la gastrulation et la formation du mésoderme chez les vertébrés

Il existe chez la souris de nombreuses mutations qui entraînent des anomalies variées du développement. Ces mutations, spontanées ou induites par des agents mutagènes, sont potentiellement très intéressantes pour tenter de comprendre les mécanismes qui président au développement embryonnaire normal et, notamment, pour isoler et caractériser les gènes qui interviennent dans ces mécanismes. Dans cet article, nous décrivons le cas de la mutation *T*, une mutation de la souris connue de longue date par les embryologistes et qui a conduit à l'isolement d'un gène, *Brachyury*, dont l'activité apparaît essentielle au bon déroulement de la gastrulation et à la formation de différents dérivés du mésoderme.

La mutation *Brachyury* (*T*)

L'histoire de la mutation *Brachyury* (du grec : queue courte) ou mutation *T* remonte à l'année 1927 lorsque Dobrovolskaïa-Zavadskaïa [1] décrit des souris ayant une queue anormalement courte. L'analyse génétique permit de montrer que ce phénotype était lié à une mutation dominante et que les embryons porteurs de la mutation à l'état homozygote (embryons *T/T*) mouraient aux alentours de la moitié de la gestation (environ jour 10 du développement embryonnaire). Depuis cette date et jusqu'au clonage récent du gène *Brachyury*, de nombreuses études ont permis de préciser le phénotype létal de ces embryons (pour des références voir [2]).

Rappelons que l'embryon des souris, vers le 6^e jour du développement, est constitué d'un cylindre, « l'œuf-cylindre » ou *egg-cylinder*, comportant deux couches concentriques, l'une, interne, appelée épiblaste ou ectoderme primitif qui donnera l'embryon lui-même et l'autre, externe, appelée endoderme viscéral qui ne participe pas à la formation de l'embryon. L'œuf cylindre est lui-

même entouré par le sac vitellin, une annexe embryonnaire, au sein de laquelle l'embryon continue son développement. Vers le début du 7^e jour se produit la gastrulation, au cours de laquelle les cellules de l'ectoderme primitif s'invaginent et s'insèrent entre les deux couches ectodermique et endodermique de l'œuf cylindre à partir d'un point qui définit la future partie postérieure de l'embryon. L'invagination des cellules de l'ectoderme entraîne la formation d'une sorte de sillon, la ligne primitive, qui prend naissance dans la partie postérieure de l'embryon et qui s'étend progressivement vers son extrémité antérieure. L'extension de la ligne primitive définit ainsi l'axe embryonnaire antéropostérieur. La migration des cellules à travers la ligne primitive aboutit à la formation du feuillet mésodermique dont les cellules constitueront le mésoderme paraxial (les futurs somites) et latéral. Enfin aux deux extrémités antérieure et postérieure de la ligne primitive, se différencient également deux dérivés mésodermiques, respectivement la notochorde, constituée de cellules qui restent dans l'axe médian de l'embryon, et l'allantoïde, constituée d'un tissu qui traverse la cavité exocœlomique pour contribuer à la formation du placenta.

Chez les embryons *T/T*, les premières anomalies apparaissent vers le milieu de la gastrulation où l'on observe notamment un épaississement anormal de la ligne primitive. Plus tard, une série de graves malformations se manifestent qui concernent particulièrement des dérivés du mésoderme : l'allantoïde est réduite en taille et ne traverse pas la cavité exocœlomique, ce qui compromet la formation du placenta chorio-allantoïdien et constitue sans doute la cause immédiate de la mort des embryons (vers le dixième jour de la gestation) ; la notochorde est absente ou grossièrement anormale, ce qui est

probablement à l'origine d'autres anomalies observées de manière constante dans la morphogénèse des régions de l'embryon situées postérieurement aux membres antérieurs : malformation du tube neural et somites anormaux ou absence de somites. En effet, nombre d'expériences suggèrent fortement que la notochorde joue un rôle important dans la morphogénèse du tube neural et des somites (pour des références voir [2]). Pour terminer ce tableau des propriétés de la mutation *T*, il est intéressant de noter deux séries d'observations supplémentaires : tout d'abord, différentes expériences d'explantation *in vitro* ou de transplantation *in vivo* ont montré que les capacités de différenciation des cellules embryonnaires *T/T* ne différaient pas essentiellement de cellules provenant d'embryons sauvages [2]. Ces résultats suggèrent que les anomalies de développement des embryons *T/T* sont la conséquence d'un défaut d'organisation plutôt que d'une incapacité *per se* des cellules *T/T* à suivre telle ou telle voie de différenciation. L'autre série d'observations repose sur la découverte d'autres allèles *T* : en effet, ces allèles tombent dans deux catégories : certains d'entre eux, comme *T^{2j}*, sont des délétions (donc des mutations nulles) et présentent un phénotype identique à la mutation originelle *T* ; d'autres, comme *T^{Wis}* ou *T^c*, en revanche, entraînent la formation d'un produit anormal, et ont un phénotype plus sévère que la mutation de type délétion qui se manifeste en particulier par des anomalies qui commencent dans une partie plus rostrale de l'embryon. Ainsi, par exemple, les hétérozygotes *T/+* ont la queue courte alors que les hétérozygotes *T^c/+* n'ont pas de queue du tout. De même, les embryons homozygotes *T^c/T^c* n'ont pas de somites du tout alors que les embryons *T/T* possèdent les sept premiers somites. Il

est donc probable que l'activité du gène *Brachyury* (T^+) dépend d'un dosage génique, les mutations T^{wis} ou T^c agissant comme des mutations dominantes négatives ; le « gradient » phénotypique qui se manifeste par des effets plus rostraux lorsque la mutation est plus sévère pourrait signifier que la demande de produit T est plus grande dans les régions plus caudales de l'embryon [2, 3].

Le phénotype des mutants T est lié au dysfonctionnement d'un seul gène. Le clonage du gène *Brachyury* (T^+)

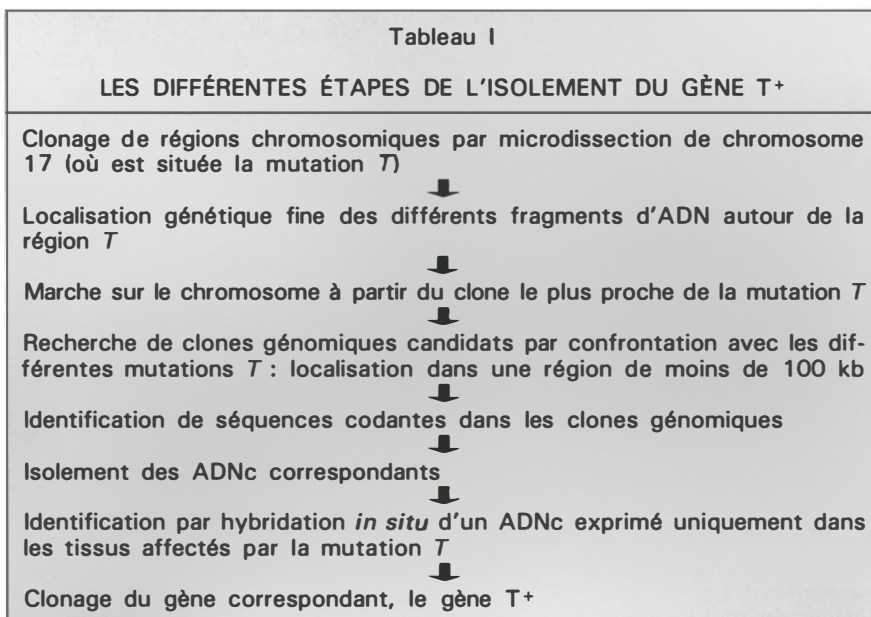
Nous avons schématisé dans le *Tableau I* les différentes étapes qui ont permis d'aboutir au clonage d'un gène candidat dont la mutation entraînerait à elle seule le phénotype complexe que nous avons décrit plus haut. Soulignons que le clonage de ce gène candidat, qui s'est avéré être le gène *Brachyury* (T^+), représentait chez la souris le premier exemple couronné de succès de la mise en œuvre d'une stratégie dite maintenant de « clonage positionnel » et qui combine de manière particulièrement élégante l'approche génétique et l'analyse moléculaire ([3] et *m/s* n° 6, vol. 6, p. 574). Trois séries d'expériences ont été réalisées dont les résultats mis ensemble constituent une preuve définitive de l'identité du

gène candidat et du gène T^+ : (a) le clonage de la région génomique T d'un autre mutant, T^{wis} , ayant un phénotype similaire, a montré que chez celui-ci l'unité de transcription du gène candidat était interrompue par l'insertion d'un élément transposable et donc devait donner naissance à un produit anormal [3] ; (b) l'analyse de l'expression du gène candidat par hybridation *in situ* sur des coupes d'embryons a montré que celui-ci était exprimé dans les tissus embryonnaires les plus affectés par la mutation T [4]. Ainsi l'expression de ce gène a été mise en évidence pendant le déroulement de la gastrulation, du jour 7 au jour 9 du développement embryonnaire, au voisinage de la ligne primitive, dans les cellules de l'ectoderme primitif et du mésoderme naissant, mais pas dans le mésoderme paraxial ou latéral. Par ailleurs, ce gène s'exprime dans la plaque notochordale (un autre dérivé du mésoderme) des embryons de 8,5 jours, puis dans la notochorde définitive des embryons de 9,5 jours. Après la gastrulation, les seuls sites d'expression sont la notochorde et le bourgeon caudal (*figure 1*), puis plus tardivement dans les seules cellules qui échappent à la dégénérescence du tissu notochordal, à savoir les cellules muqueuses des disques intervertébraux ; (c) enfin, pour éprouver

l'activité fonctionnelle du gène candidat, une souris transgénique a été construite possédant une copie supplémentaire (transgénique) complète de ce gène [5]. La souris transgénique a été ensuite croisée avec des souris $T/+$ (à queue courte) ou $T^c/+$ (sans queue) de manière à obtenir des souris porteuses du transgène et de l'une ou l'autre mutation. Dans les deux cas, un résultat remarquable a été obtenu puisque les souris transgéniques $T/+$ avaient une queue de longueur normale et les souris transgéniques $T^c/+$ avaient une queue nettement plus longue que celle des souris $T^c/+$. Une telle expérience démontre de manière directe la relation entre l'expression du gène candidat et le phénotype observé, à savoir l'extension plus ou moins importante de la partie caudale. Notons que cette expérience est par ailleurs en accord avec les observations génétiques : en effet, du fait que la mutation T est une délétion (donc une mutation nulle), le phénotype des souris $T/+$ (le raccourcissement de la queue) doit résulter d'une « insuffisance haploïde ». La fonction normale de T^+ dépend donc d'un dosage génique (voir plus haut). A cet égard, l'effet phénotypique lié à la présence du transgène décrit-ci dessus rappelle celui observé avec certaines duplications de la région chromosomique T qui permettent de compenser le phénotype mutant chez des souris porteuses d'une mutation T [6, 7].

Le gène *Brachyury* (T^+)

Le clonage du gène *Brachyury* a permis de connaître sa phase codante et donc de déduire la séquence de la protéine pour laquelle il code. Celle-ci comprend 436 acides aminés et, bien qu'elle ne ressemble à aucune protéine connue, des résultats récents [8] ont montré qu'il s'agissait d'une protéine se liant de manière spécifique à une séquence particulière d'ADN de type palindromique. En outre, il faut noter que les homologues du gène T^+ ont été retrouvés chez le xénope et le poisson-zèbre et que les protéines pour lesquelles ils codent sont très similaires [9, 10]. Le domaine de liaison à l'ADN de la protéine T^+ est particulièrement



E
D
O
I
X
E
T

étendu et couvre les 224 acides aminés N-terminaux. La propriété de liaison de la protéine T^+ à l'ADN, ajoutée au fait qu'elle est localisée dans le noyau, suggère très fortement qu'il s'agit d'un facteur de transcription. Dans ce cas, la partie C-terminale devrait comporter un domaine d'activation de la transcription. Une telle hypothèse permettrait de rendre compte des propriétés particulières des allèles T^c et T^{wis} que nous avons décrits plus haut. Ces mutations, contrairement à la mutation T qui est un allèle nul, entraînent la production d'une protéine, tronquée dans sa partie C-terminale et se manifestent chez les embryons hétérozygotes par un phénotype plus sévère que celui des embryons hétérozygotes $T/+$. De plus, il a été établi que les embryons T^c/T ont un phénotype moins sévère que les embryons T^c/T^c ; comme T est une délétion, cela ne peut pas être dû à la présence d'une protéine T^+ moins active dans les embryons T^c/T . L'ensemble de ces résultats suggère donc que la protéine T^+ agit comme facteur de transcription en combinaison avec le produit d'un autre gène. Les protéines T^c et T^{wis} pourraient former cette combinaison mais du fait qu'elles ne possèdent pas le domaine d'activation de la transcription (situé par hypothèse dans la partie C-terminale de la protéine T^+), le complexe serait incapable d'assurer une fonction normale. Tout se passe donc comme si la présence des protéines T^c et T^{wis} réduisait la quantité de protéine fonctionnelle dans les cellules. Cela s'expliquerait très bien si l'on admet que les protéines mutantes sont dépourvues du domaine d'activation de la transcription mais entrent en compétition avec la protéine normale car elles ont conservé intacte leur capacité à se lier à l'ADN [3, 8]. L'analyse de la mutation T^{wis} apporte une information supplémentaire intéressante : en effet l'expression de la protéine tronquée a lieu normalement au début de la gastrulation mais diminue ensuite rapidement dès le huitième jour de développement dans les sites où la protéine T^+ est normalement exprimée. Cette observation suggère que le produit du gène T^+ est impliqué, de manière directe ou indirecte, dans la régulation de sa propre expression [11].

Étude du rôle du gène T^+ à l'aide de chimères

L'expression du gène T^+ au niveau de la ligne primitive et dans la notochorde suggère que les anomalies observées dans ces tissus chez les embryons T/T sont la cause première du phénotype, tandis que celles observées dans d'autres tissus, comme les somites, le tube neural ou l'allantoïde seraient des effets secondaires. Ces derniers pourraient résulter de l'interaction avec des cellules T/T anormales ou d'un défaut d'expression du gène T^+ dans les cellules souches de ces tissus. De ce point de vue, la création de chimères contenant des cellules $T/+$ ou T/T et des cellules normales constitue un outil puissant pour déterminer si les anomalies observées sont d'origine cellulaire autonome (*cell autonomous*), ou si elles résultent d'interactions cellulaires défectueuses. De telles chimères ont pu être créées grâce à l'isolement de cellules embryonnaires souches obtenues à partir de blastocystes issus d'un croisement entre des souris $T/+$ [2, 12, 13]. Le génotype des cellules ES a pu alors être déterminé par une simple analyse en *Southern blot*. Ainsi des lignées de cellules ES $T/+$ et T/T ont été isolées et les chimères $T/+ <--> +/+$ ou $T/T <--> +/+$ créées par injec-

tion de ces cellules dans la cavité d'un blastocyste $+/+$ suivie de la réimplantation dans une mère adoptive (*m/s n° 3, vol. 8, p. 268*). La contribution relative des cellules $T/+$, ou T/T et $+/+$ dans les chimères peut alors être déterminée grâce à la présence d'allozymes différents de la glucose-phosphate-isomérase dans les cellules $T/+$, ou T/T et les cellules $+/+$. Nous retiendrons les points principaux qui ressortent de ces études. L'analyse des chimères $T/T <--> +/+$ aux jours 9 et 10 de développement a montré que leur phénotype était anormal : lorsque la contribution des cellules T/T était élevée, les chimères avaient une morphologie pratiquement identique à celle d'embryons T/T . Dans le cas des chimères avec une participation plus faible des cellules T/T , on observe néanmoins de manière systématique des anomalies de la ligne primitive, de la notochorde et de l'allantoïde. Ces résultats indiquent que la présence de cellules normales n'empêche pas les anomalies de type T/T de se manifester. La mutation T se comporte donc comme une mutation à effet cellulaire autonome, en tout cas dans ces trois derniers tissus. L'examen des chimères à un stade plus avancé (jours 11 et 12 de gestation), outre les anomalies consta-

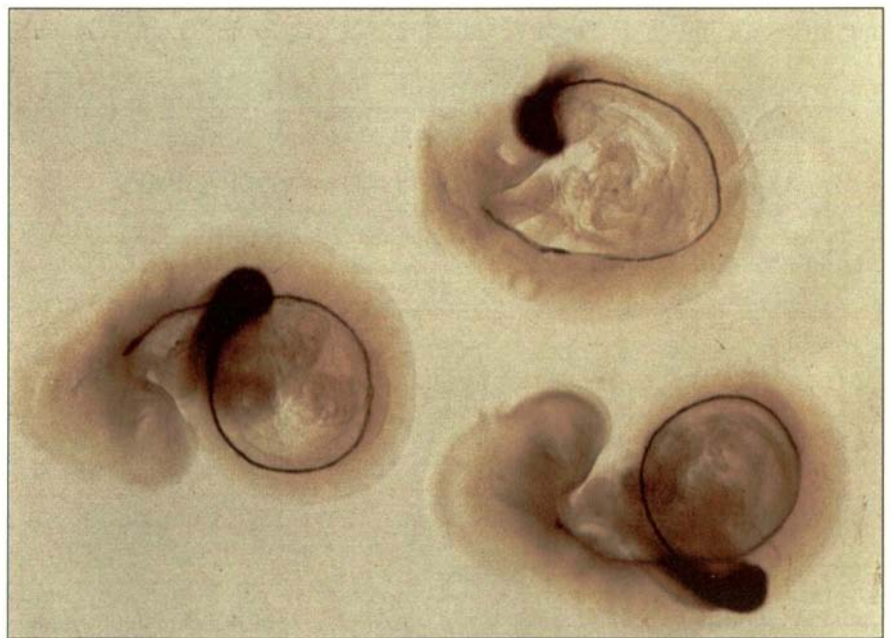


Figure 1. Expression du gène T , révélée par hybridation *in situ* avec l'ARN messager T . Embryon âgé de 9,5 jours : le marquage brun foncé apparaît tout le long de la notochorde et dans le bourgeon caudal.

tées précédemment, a permis de faire une observation particulièrement intéressante : en effet, il s'est avéré que la colonisation des cellules *T/T* dans les embryons chimériques n'était pas uniforme mais augmentait de manière importante de la région rostrale vers la région caudale. En outre, l'analyse a permis de montrer que les cellules *T/T* colonisaient plus largement le tube neural et l'ectoderme que le mésoderme somitique. Ces deux observations suggèrent fortement que le principal effet de la mutation *T* est de compromettre la migration des cellules *T/T*. En effet, celles-ci après être passées par la lignée primitive auraient tendance à s'accumuler au lieu de migrer normalement ; dans la mesure où l'invagination commence plus tôt dans la partie postérieure de l'embryon, avec le temps les cellules *T/T* s'accumuleraient en plus grande quantité dans la partie postérieure de l'embryon. De même, la colonisation plus importante des tissus d'origine ectodermique que des tissus d'origine mésodermique par les cellules *T/T* s'expliquerait, dans ce scénario, par le fait que les premiers ne s'invaginent pas lors de la gastrulation comme doivent le faire les cellules à l'origine des tissus mésodermiques en traversant la ligne primitive. En ce qui concerne l'allantoïde, les anomalies observées chez les chimères âgées de 9 et 10 jours sont toujours accompagnées d'une colonisation de ce tissu par les cellules *T/T*. En revanche, dans les chimères plus âgées (jours 11 et 12), le chimérisme est plus faible et parfois même absent des allantoïdes anormales. Il est donc probable que les cellules *T/T* qui colonisent tout d'abord ce tissu subissent une mort sélective. D'autre part, le fait que ce tissu n'exprime pas le gène *T⁺* dans les embryons normaux suggère que son déploiement et sa différenciation requièrent la protéine Brachyury à une étape antérieure de la formation de ce tissu. Enfin l'importance du produit du gène *T* dans la formation et l'élongation de la queue est attestée par le fait que, dans la grande majorité des cas, le chimérisme dans cette partie de l'embryon s'accompagne d'anomalies. En particulier pour plusieurs chimères ne présentant d'anomalies que

dans la queue, le chimérisme n'a été détectable que dans cette région. De plus, comme nous l'avons vu plus haut, la colonisation par les cellules *T/T* tend à être de plus en plus élevée dans la région caudale des embryons chimériques. De ce fait, le bourgeon caudal (*tail bud*), qui est formé des dernières cellules à migrer à travers la ligne primitive dans la région postérieure de l'embryon, est anormalement riche en cellules *T/T*. Comme c'est à partir de ce bourgeon caudal que se produit l'élongation de la queue ainsi que la formation des somites postérieurs, il est très probable que les anomalies de la queue trouvent leur origine directe dans un défaut d'expression cellulaire de la protéine Brachyury. Cette interprétation est d'ailleurs confortée par l'observation d'une expression importante du gène *T⁺* dans le bourgeon caudal des embryons *+/+* (figure 1).

Conclusion

L'existence des souris mutantes *T* a permis d'isoler et de caractériser un gène dont la mutation est à l'origine du phénotype léthal observé chez les embryons homozygotes pour cette mutation. L'analyse de l'expression de ce gène et des anomalies induites par sa mutation ou son inactivation démontrent qu'il s'agit d'un gène clé dans la gastrulation et la formation du mésoderme chez l'embryon. Le fait qu'il soit très conservé et qu'il agisse de manière probablement similaire chez différentes espèces de vertébrés [3, 9, 10, 14] souligne encore son importance. Il semble clair qu'une composante importante du phénotype mutant est liée à un défaut de migration des cellules *T/T*. De ce point de vue, on peut s'attendre à ce que la protéine Brachyury qui a des propriétés de liaison spécifique à l'ADN contrôle l'expression de gènes impliqués dans la motilité ou l'adhérence cellulaires. Cependant, il est probable que d'autres mécanismes d'action soient également à l'œuvre, notamment dans des tissus comme la notochorde ou l'allantoïde. Quoi qu'il en soit, il est clair que l'analyse plus approfondie du fonctionnement du gène Brachyury permettra de progresser dans la compréhension de la morphogenèse de l'embryon des vertébrés.

RÉFÉRENCES

1. Dobrovol'skaïa-Zavad'skaïa N. Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouveau-née et sur l'existence d'un caractère (facteur) héréditaire « non viable ». *CR Séanc Soc Biol* 1927 ; 97 : 114-6
2. Beddington RPS, Rashbass P, Wilson V. Brachyury - a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Development* 1992 ; suppl : 157-65
3. Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR, Lehrach H. Cloning of the *T* gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 1990 ; 343 : 617-22
4. Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG. Expression pattern of the mouse *T* gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 1990 ; 343 : 657-9
5. Stott D, Kispert A, Herrmann BG. Rescue of the tail defect of *Brachyury* mice. *Genes Dev* 1993 ; 7 : 197-203
6. MacMurray A, Shin HS. The antimorphic nature of the *T^C* allele at the mouse locus *T*. *Genetics* 1988 ; 120 : 545-50
7. Winking H, Silver LM. Characterization of a recombinant mouse *t* haplotype that expresses a dominant lethal maternal effect. *Genetics* 1974 ; 108 : 1013-20
8. Kispert A, Herrmann BG. The *Brachyury* gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J* 1993 ; 12 : 3211-20
9. Smith JC, Price BMJ, Green JBA, Weigel D, Herrmann BG. Expression of a *Xenopus* homolog of *Brachyury* (*T*) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 1991 ; 67 : 79-87
10. Schulte-Merker S, Ho RK, Herrmann BG, Nüsslein-Volhard C. The protein product of the zebrafish homologue of the mouse *T* gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development* 1991 ; 116 : 1021-32
11. Herrmann BG. Expression pattern of the *Brachyury* gene in whole-mount *T^{WIS}/T^{WIS}* mutant embryos. *Development* 1991 ; 113 : 913-7
12. Rashbass P, Cooke LA, Herrmann BG. A cell autonomous function of *Brachyury* in *T/T* embryonic stem cell chimaeras. *Nature* 1991 ; 353 : 348-51
13. Wilson V, Rashbass P, Beddington RPS. Chimeric analysis of *T* (*Brachyury*) gene function. *Development* 1993 ; 117 : 1321-33
14. Cunliffe V, Smith JC. Ectopic mesoderm formation in *Xenopus* embryos caused by widespread expression of *Brachyury* homologue. *Nature* 1992 ; 358 : 427-30

Anne Camus
Charles Babinet

Unité de génétique des mammifères, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75724, Paris Cedex 13, France.

TIRÉS A PART

C. Babinet.