Journal de la Société de Biologie, 193 (4), 347-354 (1999)

L'inducteur céphalique Cerberus est un inhibiteur multivalent extracellulaire

Par Eric Agius[1], Stefano Piccolo[2] & E. M. De Robertis[1]

[1]Howard Hughes Medical Institute and Department of Biological Chemistry, University of California, Los Angeles, California 90095-1662, USA. [2]Instituto di Istologia ed Embriologia, Università di Padova, 35100 Padova, Italy.

Reçu le 16 juin 1999

RÉSUMÉ

Le gène *cerberus* code pour un facteur sécrété qui, lorsqu'il est surexprimé dans la région ventrale d'embryons de Xénope induit la différenciation d'une tête surnuméraire en l'absence complète de tronc (Bouwmeester *et al.*, 1996). Nous avons montré récemment que Cerberus peut se lier à BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein-4), Xnr-1 (*Xenopus* Nodal-related 1) et Xwnt-8 dans l'espace extracellulaire (Piccolo *et al.*, 1999). Nous présentons ici une étude qui montre que Cerberus ne possède pas de récepteur ni de voie de transduction propres mais agit plutôt comme un inhibiteur extracellulaire. Nos résultats suggèrent que l'activité de Cerberus dans l'induction de la tête peut être expliquée par une action inhibitrice en amont des récepteurs à Xnr-1 et à BMP-4. De plus, en utilisant des mutants dominants négatifs des récepteurs, qui entraînent le blocage simultané des voies de transduction de Nodal-related et de BMP-4, nous avons montré que la double inhibition de ces deux voies de transduction est suffisante pour entraîner l'induction de têtes dans des explants de mésoderme ventral.

SUMMARY **The head inducer Cerberus is a multivalent extracellular inhibitor**

***Cerberus* encodes for a secreted protein which when overexpressed ventrally in a *Xenopus* embryo induces head differentiation without trunk (Bouwmeester *et al.*, 1996). We have recently shown that Cerberus can bind BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein-4), Xnr-1 (Xenopus Nodal-related 1) and Xwnt-8 in the extracellular space (Piccolo *et al.*, 1999). We present here studies showing that Cerberus does not have a receptor nor a dedicated transduction pathway but rather acts as an extracellular inhibitor. Our results suggest that the action of Cerberus in head induction can be explained by an inhibitory activity upstream of the Nodal-related and BMP-4 receptors. In addition, using dominant negative receptor mutants which block both the Xnr-1 and BMP-4 transduction pathways, we show that this double inhibition is sufficient for head induction in ventral mesoderm explants.**

INTRODUCTION

Le développement embryonnaire précoce fait intervenir de nombreuses interactions cellulaires qui vont permettre la détermination des différents feuillets embryonnaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme (Heasman, 1997). Ces trois feuillets se mettent en place au cours de la gastrulation, puis interagissent pour former les différents organes de l'embryon (Harland & Gerhart, 1997). C'est l'expérience de Spemann (Spemann & Mangold, 1924) qui est à l'origine de la mise en évidence de ces interactions. En effet, lorsque la lèvre dorsale du blastopore d'un embryon d'amphibien est greffée dans la région ventrale chez un autre embryon, elle induit la formation d'un second axe embryonnaire (embryon siamois) contenant un système nerveux, une

notochorde (mésoderme axial) et un tube digestif. Ces organes surnuméraires sont en majeure partie constitués par des cellules de l'hôte, ce qui démontre que le tissu greffé est capable d'induire la différenciation des cellules de l'embryon hôte. Dès lors, de nombreux groupes ont tenté de caractériser les mécanismes moléculaires responsables de l'activité de l'organisateur de Spemann. Diverses molécules exprimées au niveau de l'organisateur de Spemann ont été identifiées, par exemple des facteurs de transcription tels que Goosecoid (Cho *et al.*, 1991), des molécules sécrétées telles que Noggin (Smith *et al.*, 1993), Chordin (Sasai *et al.*, 1994) ou Cerberus (Bouwmeester *et al.*, 1996) ainsi que beaucoup d'autres (Harland & Gerhart, 1997).

Le gène *cerberus* code pour une protéine sécrétée dont le nom vient du chien à trois têtes qui garde, dans la mythologie grecque, l'entrée du royaume d'Hades, empêchant les vivants de visiter le royaume des morts. Des ARNm codant pour *cerberus*, injectés ventralement dans des embryons de Xénope, ont la propriété remarquable d'induire la différenciation d'une tête surnuméraire en l'absence complète de tronc. Ce phénotype peut être divisé expérimentalement en deux activités distinctes : *i*) l'injection de *cerberus* dans des calottes animales provoque la différenciation de structures neurales ; *ii*) la surexpression de *cerberus* inhibe la formation du mésoderme du tronc (Bouwmeester *et al.*, 1996).

L'expression exclusive de *cerberus* dans l'endoderme antérieur a permis de souligner l'importance de ce tissu dans la mise en place des structures antérieures de l'embryon chez les Vertébrés. Chez la Souris, de nombreux résultats indiquent que l'endoderme viscéral antérieur (EVA) a un rôle très important dans l'induction de la tête (Beddington & Robertson, 1999 ; (Thomas, Bouwmeester & Leyns, 1997 ; Thomas & Beddington, 1996 ; Thomas *et al.*, 1998).

Dans une étude récente, nous avons montré que Cerberus peut lier dans l'espace extracellulaire plusieurs facteurs de croissance, en particulier deux membres de la famille des TGFβ (Transforming Growth Factor β) : BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein-4) et Xnr-1 (Xenopus-Nodal-Related-1, homologue de *Nodal*, impliqué chez la Souris dans l'induction du mésoderme) ainsi que Xwnt-8 (Piccolo *et al.*, 1999). Ces facteurs de croissance vont interagir avec des récepteurs cellulaires, activer des voies de transduction et induire l'activation ou l'inhibition de facteurs de transcription. Ainsi, par exemple, les TGFβ vont se lier à des récepteurs de la famille des récepteurs à sérine-thréonine kinases et activer la voie de transduction des protéines SMADs (Chen *et al.*, 1998 ; Kretzschmar & Massague, 1998 ; Massague, 1998).

Nous présentons ici une série d'études épistatiques qui montrent que Cerberus ne possède pas de récepteur, ni de voie de transduction propre. Nos résultats suggèrent que l'activité de Cerberus dans l'induction de la tête peut être expliquée par une action inhibitrice dans l'espace extracellulaire. Cette inhibition est située en amont des récepteurs à Xnr-1 et à BMP-4, puisqu'elle disparaît lors de l'utilisation de récepteurs activés constitutivement appelés CA-ALK4 (récepteur putatif de Xnr-1) et CA-BMPR (récepteur de BMP-4). De plus, en utilisant des formes tronquées des récepteurs à Xnr-1 et à BMP-4 qui agissent comme des récepteurs dominants négatifs, nous avons montré que le blocage simultané des voies de signalisation de ces deux facteurs, pendant la gastrulation, est suffisant pour induire la formation de la tête dans le mésoderme ventral.

ANIMAUX, MATÉRIELS ET MÉTHODES

Manipulation des embryons et des explants

Les embryons ont été obtenus par fécondation artificielle. Les ARNm ont été injectés dans les embryons aux stades 4 ou 8 cellules dans une solution 1 × MBS (Kay & Peng, 1991). Après 30 minutes, les embryons ont été transférés dans une solution 0,1 × MBS. Les explants de zone marginale ventrale ont été prélevés au stade 10,5 à l'opposé de la lèvre dorsale du blastopore. Les explants ont été ensuite mis en culture dans une solution 0,5 × MMR (Kay & Peng, 1991) jusqu'au stade 40. Les explants de calottes animales ont été prélevés au stade 9 et mis en culture dans une solution de 0,3 × MBS jusqu'au stade indiqué dans les figures.

Préparation des ARNs

Les ARNm ont été préparés en utilisant le kit Megascript (Ambion). L'ARNm codant pour Cerberus est préparé à partir du plasmide *pCS2-Cerberus* linéarisé avec Not I et transcrit avec ARN polymérase SP6. L'ARNm codant pour CA-ALK4 est préparé à partir du plasmide *pSP64-CA-ALK4* (Chang *et al.*, 1997) linéarisé avec Xba I et transcrit avec la polymérase SP6. L'ARNm codant pour CA-BR est préparé à partir du plasmide *pCS2-CABMPR* (généreusement fourni par le Dr. Ueno) linéarisé avec Not I et transcrit avec la polymérase SP6. L'ARNm codant pour t-XAR-1 est préparé à partir du plasmide *pCS2-ΔXAR-1*, construit pour cette étude, linéarisé avec Not I et transcrit avec la polymérase SP6. L'ARNm codant pour tALK-4 est préparé à partir du plasmide *pCS2- hΔALK4*, construit pour cette étude, linéarisé avec Not I et transcrit avec la polymérase SP6. L'ARNm codant pour t-BMPR est préparé à partir du plasmide *pSP64-XtBR* (généreusement fourni par le Dr. Ueno) linéarisé avec Eco RI et transcrit avec la polymérase SP6.

RT-PCR

Les ARNm des explants de calottes animales ou de zones marginales ventrales sont préparés selon la méthode phénol-guanidine-thiocyanate en utilisant le produit RNA STAT-60 (TEL-TEST, Inc.). La RT-PCR quantitative est effectuée suivant le protocole de Niehrs *et al.* (1994). Pour la détection des marqueurs indiqués, les amorces suivantes ont été utilisées : Xbra: 5'- GCT GGA AGT ATG TGA ATG GA GAT -3' et 5'-TTT AAG TCG TGT AAT CTC TTC A -3' (318 bp, 25 cy-

cles); α-actine : 5'-TCC CTG TAC GCT TCT GGT CGT A -3' et 5'-TCT CAA AGT CCA AAG CCA CAT A -3' (252 bp, 20 cycles); EF1-α : 5'-CCT GAA TCA CCC AAG CCA GAT TGG GTG-3' et 5'-GAG GGT AGT CTG AGA AGC TCT CCA CG-3' (221 bp, 20 cycles); α-globine : 5'-TTG CTG TCT CAC ACC ATC CAG G-3' et 5'-TCT GTA CTT GGA GGT GAG GAC G-3' (126 bp, 20 cycles); N-CAM : 5'-GCG GGT ACC TTC TAA TAG TCA C-3' et 5'-GGC TTG GCT GTG GTT CTG AAG G-3' (138 bp, 25 cycles).

RÉSULTATS

Cerberus est un inhibiteur extracellulaire qui agit en amont des récepteurs à Xnr-1 et à BMP-4

Cerberus est capable de se lier à BMP-4 et à Xnr-1 et d'inhiber leur fonction (Piccolo *et al.*, 1999). Ces résultats expliquent les deux activités principales de Cerberus : *i*) l'inhibition de BMP-4 entraîne la différenciation de structures neurales dans des explants de calottes animales et *ii*) l'inhibition de Nodal-related conduit à l'inhibition du mésoderme (Bouwmeester et al., 1996). *Cerberus* code pour une protéine sécrétée de 270 acides aminés contenant dans sa partie carboxy-terminale un domaine à nœud cystéique. Cette structure particulière est présente dans de nombreuses molécules possédant un récepteur et une voie de transduction propre (Isaacs, 1995; McDonald & Hendrickson, 1993; Meitinger *et al.*, 1993). Par conséquent, il est possible qu'en plus des capacités d'interactions directes avec divers ligands, Cerberus agisse en se liant sur un récepteur et en activant sa voie de transduction propre. Pour tester cette possibilité, nous avons mené une analyse épistatique de l'activité de Cerberus modélisée dans la Figure 1. Une molécule inhibitrice sécrétée comme Cerberus peut agir en se liant sur un ligand. Cette interaction empêche le ligand d'activer le récepteur, inhibant ainsi sa voie de transduction (Fig. 1A). Une molécule sécrétée peut aussi agir comme un ligand, se lier sur un récepteur, activer une voie de transduction et ainsi inhiber une autre voie de signalisation au niveau intracellulaire (Fig. 1B). Pour différencier ces deux possibilités la molécule inhibitrice est exprimée de manière concomitante avec le ligand ou un récepteur activé de manière constitutive. Si la molécule inhibitrice agit directement sur le ligand, elle va inhiber le ligand (Fig. 1A) mais n'aura aucune activité contre le récepteur activé (Fig. 1C). Si la molécule inhibitrice agit *via* sa propre voie de signalisation, elle va inhiber à la fois le ligand (Fig. 1B) et le récepteur activé (Fig. 1D). Nous avons donc comparé l'effet de Cerberus en présence du ligand (BMP-4 ou Xnr-1) ou en présence du récepteur activé à ces deux molécules. Pour cela nous avons utilisé des récepteurs activés de manière constitutive pour BMP-4 appelés CA-BMPR et pour Xnr-1 appelés CA-ALK4. Ces récepteurs entraînent une réponse constitutive en l'absence de ligand. L'activation constitutive du récepteur est induite par la mutation d'un acide aminé unique dans le domaine intracellulaire GS des récepteurs de type I, ce qui mime la phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II et induit son activation constitutive (Armes & Smith, 1997; Attisano & Wrana, 1996; Hoodless *et al.*, 1996; Wieser *et al.*, 1995).

L'injection d'ARNm codant pour *Xnr-1* (100 pg) ou *CA-ALK-4* (500 pg) entraîne l'activation de la voie de transduction de Xnr-1 et induit l'expression du marqueur mésodermique *Xbra* dans des calottes animales (Fig. 2A, ligne 2 et 3). La coexpression de *Xnr-1* (100 pg) et de *cerberus* (150 pg) empêche l'expression de *Xbra* par les cellules de calottes animales (Fig. 2A, ligne 5). Par contre, les cellules de calottes animales coexprimant *CA-ALK-4* (500 pg) et *cerberus* (150 pg) vont avoir un niveau d'expression de *Xbra* similaire aux niveaux obtenus par l'expression unique de *CA-ALK-4* (Fig. 2A, comparer lignes 3 et 6). Ces résultats permettent de conclure que l'activité de Cerberus s'exerce uniquement en amont du récepteur à Xnr-1 (Fig. 1C).

De manière similaire, des calottes animales, dans lesquelles la voie de signalisation de BMP-4 est activée par des ARNm codant pour *BMP-4* (300 pg) ou *CA-BMPR* (300 pg), vont se différencier en épiderme atypique. Remarquer, que dans le cas de BMP-4, le marqueur de mésoderme ventral *α-globine* est induit (Fig. 2B, lignes 2 et 3), ce qui correspond à une activation importante de la voie de signalisation de BMP4 (Dale *et al.*, 1992; Wilson & Hemmati-Brivanlou, 1995). En présence d'ARNm codant pour *cerberus* (150 pg), les calottes animales expriment le marqueur neuronal NCAM (Fig. 2B, ligne 4). Les ARNm codant pour le récepteur activé *CA-BMPR* mais pas les ARNm codant pour le facteur sécrété *BMP-4* suppriment complètement l'induction du marqueur neuronal *N-CAM* par les ARNm codant pour *cerberus* (Fig. 2B, comparer les lignes 5 et 6). Ces résultats permettent de conclure que Cerberus agit uniquement en amont du récepteur à BMP-4 dans l'espace extracellulaire, comme indiqué dans le modèle de Fig. 1A.

L'inhibition simultanée des voies de transduction de BMP4 et Xnr-1 induit la formation de structures antérieures

La caractéristique principale de *cerberus* est l'induction de têtes lorsque des ARNm sont injectés dans des blastomères ventraux (Bouwmeester *et al.*, 1996). Il est important de noter que les têtes ainsi formées se développent en l'absence totale de tronc (Fig. 3A, noter la présence d'un œil et d'une glande adhésive). Les récepteurs à sérine-thréonine kinase amputés de leur région cytoplasmique vont agir comme des récepteurs négatifs dominants (Hemmati-Brivanlou & Melton, 1992; Armes & Smith, 1997; Attisano & Wrana, 1996; Hoodless *et al.*, 1996; Wieser *et al.*, 1995). Ainsi, t-XAR-1, une forme tronquée du récepteur XAR-1 (un récepteur à l'activine de type II, appelé aussi XActRIIB) est capable de bloquer l'induction mésodermique et d'entraîner la différenciation neurale de calottes animales (Hemmati-Brivanlou & Melton, 1992 et 1994; Schulte-Merker *et al.*, 1994). Cette double activité est donc semblable à celle

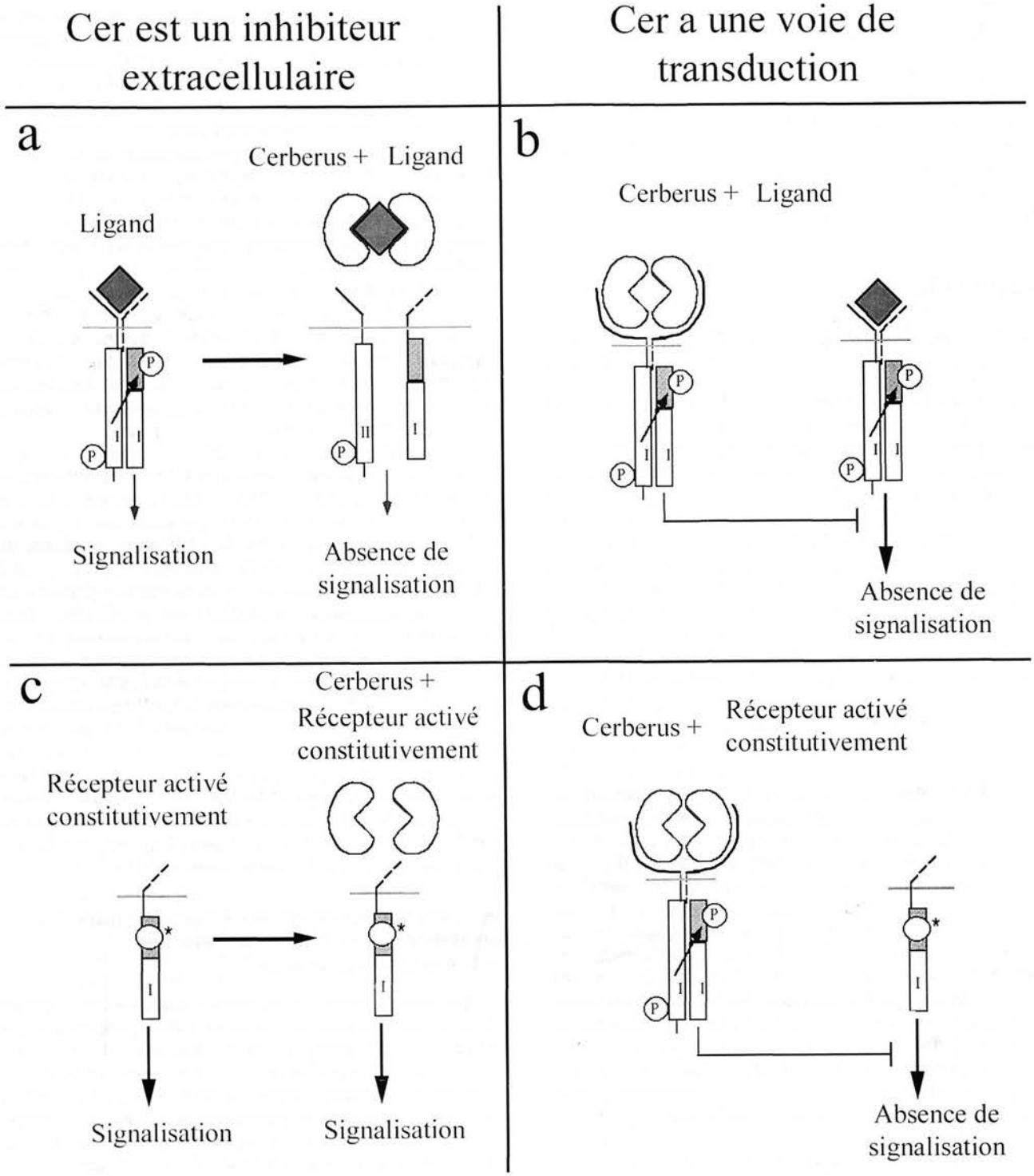

FIG. 1. – Diagramme expliquant l'analyse épistatique de la fonction d'une molécule sécrétée inhibitrice.

A) Modèle d'une molécule sécrétée agissant comme un inhibiteur extracellulaire. La molécule se lie à un ligand empêchant l'activation du récepteur, inhibant ainsi la voie de transduction correspondante.

B) Modèle d'une molécule sécrétée agissant comme un ligand. La molécule se lie à son récepteur propre, active sa voie de transduction et inhibe ainsi une autre voie de signalisation au niveau intracellulaire.

C) Modèle décrivant l'effet de la co-expression d'un récepteur constitutivement actif et d'une molécule inhibitrice sécrétée ; remarquer qu'il n'y a pas d'inhibition de la transduction du signal.

D) Modèle décrivant l'effet de la co-expression d'un récepteur constitutivement activé et d'une molécule avec une voie de transduction inhibitrice. La voie de transduction activée par le récepteur constitutif est inhibée.

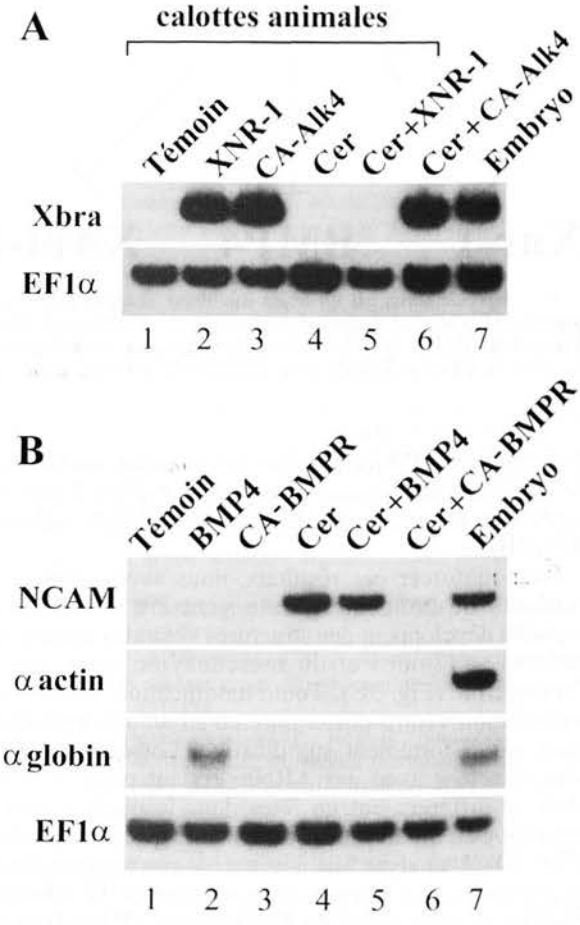

FIG. 2. – Cerberus est un inhibiteur extracellulaire des voies de transductions de Xnr-1 et de BMP-4. Analyses épistatiques montrant que l'ARNm codant pour *cerberus* fonctionne en amont du récepteur de A) Xnr-1 (ALK4) et B) du récepteur de BMP-4 (BMPR).

A) Des calottes animales injectées avec des ARNm codant pour *Xnr*-1 (100 pg) ou CA-ALK-4 (500 pg), en présence ou en absence d'ARNm codant pour *cerberus* (150 pg), sont explantées au stade 8 et traitées par RT-PCR au stade 11. Piste 1, calottes non injectées. Pistes 2-3, Xbra est activé respectivement par Xnr-1 et CA-ALK-4. Piste 4, calottes injectées avec des ARNm codant pour *cer*. Piste 5, les ARNs codant pour *cerberus* suppriment l'induction de Xbra par Xnr-1. Piste 6, les ARNm codant pour *cerberus* ne suppriment pas l'induction de Xbra par CA-ALK-4. Piste 7, Embryon total.

B) Des calottes animales injectées avec des ARNm codant pour *BMP-4* ou *CA-BMPR* en présence ou en absence d'ARNm codant pour *cerberus* sont explantées au stade 8 et traitées pour RT-PCR au stade 27. Piste 1, calottes non injectées comme témoin négatif. Piste 2, injections de *BMP-4* (300 pg). Piste 3, injections de *CA-BMPR* (300 pg). Remarquer que seul, BMP-4 induit le marqueur de mésoderme ventral *α-globine* indiquant que la dose de *BMP-4* utilisée est plus importante que celle de *CA-BMPR*. Piste 4, des calottes injectées avec des ARNm codant pour *cerberus* (150 pg), expriment le marqueur neuronal *N-CAM*. Piste 5, les ARNm codant pour *BMP-4* ne réduisent que très légèrement l'induction du marqueur *neuronal N-CAM* par les ARNm codant pour *cerberus*. Piste 6, les ARNm codant pour *CA-BMPR* suppriment complètement l'induction du marqueur neuronal N-CAM par les ARNm codant pour *cerberus*.

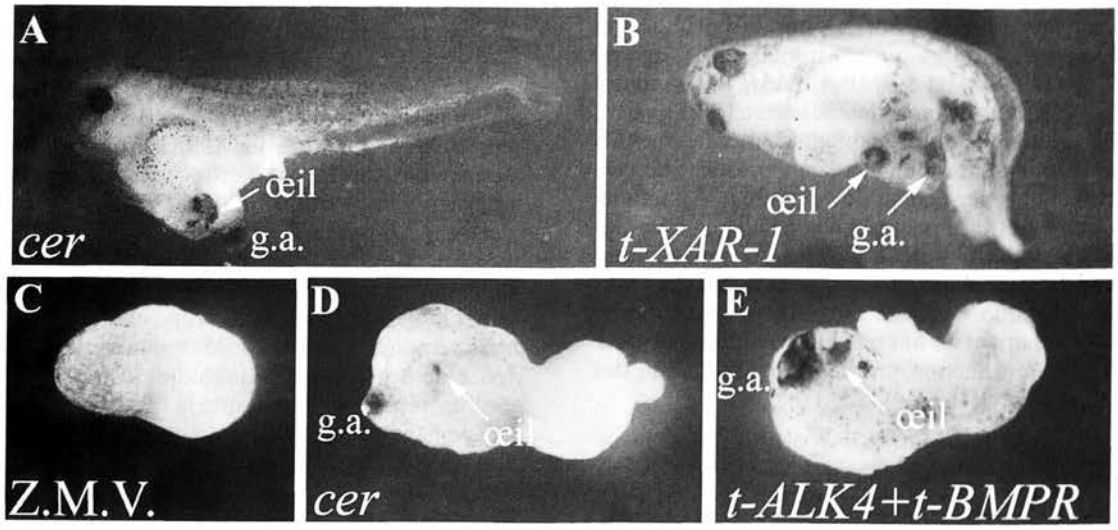

FIG. 3. – L'induction de structures antérieures par *cerberus* est mimée par le blocage simultané de deux voies de signalisation.

A) Embryon injecté ventralement avec 200 pg d'ARNm codant pour *cerberus*.

B) Embryon injecté ventralement avec 500 pg d'ARNm codant pour une forme tronquée de XAR-1 qui entraîne le blocage simultané de la signalisation par activin/Nodal-related et BMP (Schulte-Merker *et al.*, 1994).

C) Explant de zone marginale ventrale non injecté.

D) Explant de zone marginale ventrale injecté avec 200 pg d'ARNm codant pour *cerberus*. Noter la différenciation d'un œil et d'une glande adhésive (g. a.).

E) Explant de zone marginale ventrale injecté avec 1,5 ng d'ARNm codant pour *t-AKL-4* et avec 600 pg d'ARNm codant pour *t-BMPR*. Noter la différenciation d'un œil et d'une glande adhésive (g. a.) comme dans le cas de *cerberus*.

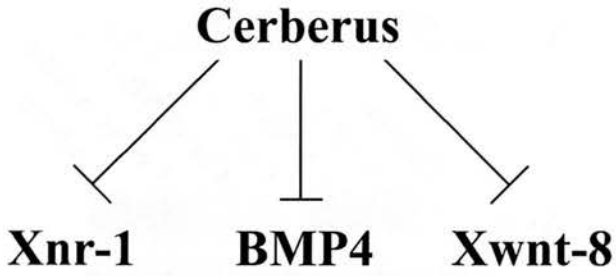

FIG. 4. – Cerberus est un triple inhibiteur extracellulaire. Diagramme indiquant la fonction triple de cerberus: inhibition de Xnr-1, Wnt-8 et de BMP-4. Il est intéressant de noter que Cerberus possède des sites de liaisons distincts pour chacune de ces trois molécules.

de Cerberus, et l'injection dans des blastomères ventraux de ce récepteur tronqué induit la formation d'une tête contenant un œil cyclopique et une glande adhésive (Fig. 3B).

Pour renforcer ces résultats, nous avons utilisé des explants de zone marginale ventrale (ZMV). Ces explants développent des structures ventrales comme des cellules sanguines et du mésenchyme ainsi que de l'endoderme (Fig. 3C). Toute modification de cette différenciation ventro-postérieure en structures antérieures nous paraît fortement significative. Lorsque des ZMV sont injectées avec des ARNm codant pour *cerberus*, elles se différencient en têtes dans lesquelles vont se développer un œil unique et une glande adhésive (Fig. 3D). L'analyse histologique de ces explants révèle la présence d'un « cerveau » contenant de la substance blanche et grise ainsi de l'endoderme (Piccolo *et al.*, 1999). De manière similaire, le blocage des voies de signalisation de *Xnr-1* et *BMP-4* par la co-injection d'ARNm codant pour des formes tronquées des récepteurs à XNR-1, *t-ALK4,* et à BMP-4, *t-BMPR*, va induire la différenciation des explants de ZMV en têtes (Fig. 3E). L'analyse histologique de ces explants démontre une différenciation similaire à celle obtenue en présence de *cerberus*. Ces résultats permettent de conclure que l'activité de *cerberus* peut être mimée par des récepteur tronqués (molécules qui vont bloquer les voies de transduction) qui ne possèdent pas d'activité de signalisation. Ici, nous avons démontré que l'activité de Cerberus est uniquement extracellulaire et ne fait pas intervenir de récepteur ou de voie de transduction propre pour l'induction des structures antérieures (Fig. 4).

DISCUSSION

Cerberus est une molécule capable d'inhiber trois types de facteur de croissance différents (Piccolo *et al.*, 1999). Ici, nous avons montré, en utilisant des études épistatiques, que l'activité de Cerberus peut être bloquée par les récepteurs constitutivement actifs CA-ALK4 et CA-BMPR.

De façon similaire, le blocage simultané des voies de transduction de BMP-4 et de Xnr-1 avec *t-XAR-1* ou *t-BMPR* et *t-ALK4* permet d'obtenir des phénotypes similaires à ceux obtenus avec *cerberus*. Cerberus est aussi un inhibiteur de Xwnt-8 (Glinka *et al.*, 1997 ; Piccolo *et al.*, 1999). L'inhibition de la voie de signalisation de *BMP-4* ou de *Xnr-1* entraîne indirectement l'inhibition de l'expression de *Xwnt-8* dans l'embryon (Hoppler & Moon, 1998 ; Piccolo *et al.*, 1999), le blocage simultané de ces deux voies de transduction entraîne de manière similaire le blocage de la voie de signalisation de *Xwnt-8* et permet l'induction des têtes ectopiques.

Cerberus est exprimé dans l'endoderme antérieur chez le Xénope (Bouwmeester et al., 1996) et un membre de la même famille, *cerberus-like*, est exprimé dans l'endoderme viscéral antérieur (EVA) de la Souris (Belo *et al.*, 1997 ; Biben *et al.*, 1998 ; Shawlot *et al.*, 1998). Chez la Souris, *nodal* l'homologue murin de *Xnr-1* est nécessaire à la formation du mésoderme et de l'endoderme viscéral (Zhou *et al.*, 1993). Nous avons montré que l'inhibition de Xnr-1 est nécessaire pour permettre la formation de la tête chez le Xénope (Piccolo *et al.*, 1999). L'analyse d'embryons chimères dans lesquels l'endoderme viscéral est mutant Nodal$^{-/-}$ et l'épiblaste est Nodal$^{+/+}$ révèle que ces embryons se développent avec une troncation sévère des régions céphaliques (Varlet *et al.*, 1997). Ces données suggèrent que l'expression de Nodal dans l'EVA est nécessaire à la formation de la tête (Beddington & Robertson, 1998 ; Varlet *et al.*, 1997).

Cependant, l'analyse de mutations affectant Smad 2, un gène qui participe à la voie de transduction de Nodal, montre qu'en l'absence de voie de signalisation de Nodal, les marqueurs de l'EVA, tels que *cerberus-like* ne sont pas exprimés et que l'expression de Nodal dans l'épiblaste est ubiquitaire et non restreinte à la région postérieure comme c'est le cas au cours du développement embryonnaire normal (Waldrip *et al.*, 1998 ; Nomura & Li, 1998). Le rôle de l'EVA semble donc de restreindre la formation du mésoderme troncal seulement dans la région postérieure de l'embryon (Beddington & Robertson, 1999 ; Nomura & Li, 1998 ; Waldrip *et al.*, 1998). De manière similaire, chez le *Xénope,* Cerberus est un inhibiteur multivalent bloquant différents facteurs de croissance impliqués dans le développement du tronc (BMP-4, Xnr-1 et Xwnt8), sécrété par l'endoderme antérieur, entraînant la création d'un territoire antérieur dans lequel le développement du tronc est réprimé.

Cette année marque le 75ème anniversaire de l'expérience de Spemann et Mangold et les données obtenues chez le Xénope montrent que la région de l'organisateur de Spemann est en fait une source d'inhibiteurs sécrétés comme Noggin (Lamb *et al.*, 1993 ; Smith *et al.*, 1993 ; Zimmerman *et al.*, 1996), Chordin (Piccolo *et al.*, 1996 ; Sasai *et al.*, 1994), Frzb-1 (Leyns *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1997), Dickkopf-1 (Glinka *et al.*, 1998) et Cerberus (Bouwmeester *et al.*, 1996 ; Piccolo *et al.*, 1999). Ainsi, il semble que la régionalisation de la gastrula par l'organisateur de Spemann soit en fait l'œuvre de molécules inhibitrices qui fonctionnent dans l'espace extracellulaire en bloquant des facteurs de croissance impliqués dans la mise en place des régions ventrales de l'embryon.

Remerciements. – Nous tenons à remercier Anatalia CUELLAR pour son excellente assistance technique. Merci aux Drs T. CHOUARD, A. LABROUSSE et G. MONTEILLET-AGIUS pour leurs suggestions et commentaires sur le manuscrit. Merci enfin à Nicolas AGIUS qui a fourni ses cheveux de nouveau-né permettant de fabriquer les outils de microchirurgie. Ce projet de recherche original a été subventionné par le NIH et le Howard Hughes Medical Institute dont E. A. est un chercheur associé et E. M. D. R. un chercheur principal.

BIBLIOGRAPHIE

Armes N. A. & Smith, J. C., The ALK-2 and ALK-4 activin receptors transduce distinct mesoderm-inducing signals during early Xenopus development but do not co-operate to establish thresholds. *Development*, 1997, *124*, 3797-3804.

Attisano L. & Wrana J. L., Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 1996, *7*, 327-339.

Beddington R. S. & Robertson E. J., Anterior patterning in mouse. *Trends Genet.*, 1998, *14*, 277-284.

Beddington R. S. P. & Robertson E. J., Axis development and early asymmetry in Mammals. *Cell*, 1999, *96*, 195-209.

Belo J. A., Bouwmeester T., Leyns L., Kertesz N., Galle M., Follettie M. & De Robertis E. M., Cerberus-like is a secreted factor with neuralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mech. Dev.*, 1997, *68*, 45-57.

Biben C., Stanley E., Fabri L., Kotecha S., Rhinn M., Drinkwater C., Lah M., Wang C. C., Nash A., Hilton D., Ang S. L., Mohun T. & Harvey R. P., Murine cerberus homologue mcer-1: a candidate anterior patterning molecule. *Dev. Biol.*, 1998, *194*, 135-151.

Bouwmeester T., Kim S., Sasai Y., Lu B. & De Robertis E. M., Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature*, 1996, *382*, 595-601.

Bouwmeester T. & Leyns L., Vertebrate head induction by anterior primitive endoderm. *Bioessays*, 1997, *19*, 855-863.

Chang C., Wilson P. A., Mathews L. S. & Hemmati-Brivanlou A., A Xenopus type I activin receptor mediates mesodermal but not neural specification during embryogenesis. *Development*, 1997, *124*, 827-837.

Chen Y. G., Hata A., Lo R. S., Wotton D., Shi Y., Pavletich N. & Massague J., Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev.*, 1998, *12*, 2144-2152.

Cho K. W., Blumberg B., Steinbeisser H. & De Robertis E. M., Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the Xenopus homeobox gene goosecoid. *Cell*, 1991, *67*, 1111-1120.

Dale L., Howes G., Price B. M. & Smith J. C., Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early Xenopus development. *Development*, 1992, *115*, 573-585.

Glinka A., Wu W., Delius H., Monaghan A. P., Blumenstock C. & Niehrs C., Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and fonctions in head induction. *Nature*, 1998, *391*, 357-362.

Glinka A., Wu W., Onichtchouk D., Blumenstock C. & Niehrs C., Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in Xenopus. *Nature*, 1997, *389*, 517-519.

Harland R. & Gerhart J., Formation and fonction of Spemann's organizer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1997, *13*, 611-667.

Heasman J., Patterning the Xenopus blastula. *Development*, 1997, *124*, 4179-4191.

Hemmati-Brivanlou A. & Melton D. A., A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in Xenopus embryos. *Nature*, 1992, *359*, 609-614.

Hemmati-Brivanlou A. & Melton D. A., Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in Xenopus. *Cell*, 1994, *77*, 273-281.

Hoodless P. A., Haerry T., Abdollah S., Stapleton M., O'Connor M. B., Attisano L. & Wrana J. L., MADR1, a MAD-related protein that fonctions in BMP2 signaling pathways. *Cell*, 1996, *85*, 489-500.

Hoppler S. & Moon R. T., BMP-2/-4 and Wnt-8 cooperatively pattern the Xenopus mesoderm. *Mech. Dev.*, 1998, *71*, 119-129.

Isaacs N. W., Cystine knots. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1995, *5*, 391-395.

Kay B. K. & Peng H. B., San Diego: Academic Press, Inc. *Meth. Cell Biology*, 1991, *36*, 657-662.

Kretzschmar M. & Massague J., SMADS: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1998, *8*, 103-11.

Lamb T. M., Knecht A. K., Smith W. C., Stachel S. E., Economides A. N., Stahl N., Yancopolous G. D. & Harland R. M., Neural induction by the secreted polypeptide Noggin. *Science*, 1993, *262*, 713-718.

Leyns L., Bouwmeester T., Kim S. H., Piccolo S. & De Robertis E. M., Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell*, 1997, *88*, 747-576.

Massague J., TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, *67*, 753-791.

McDonald N. Q. & Hendrickson W. A., A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*, 1993, *73*, 421-424.

Meitinger T., Meindl A., Bork P., Rost B., Sander C., Haasemann M. & Murken J., Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure. *Nat. Genet.*, 1993, *5*, 376-380.

Nomura M. & Li E., Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature*, 1998, *393*, 786-790.

Piccolo S., Agius E., Leyns L., Bhattacharyya S., Grunz H., Bouwmeester T. & De Robertis E. M., The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signais. *Nature*, 1999, *397*, 707-710.

Piccolo S., Sasai Y., Lu B. & De Robertis E. M., Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of Chordin to BMP-4. *Cell*, 1996, *86*, 589-598.

Sasai Y., Lu B., Steinbelsser H., Geissert D., Gant L. K. & De Robertis E. M., Xenopus Chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell*, 1994, *79*, 779-790.

Schulte-Merker S., Smith J. C. & Dale L., Effects of truncated activin and FGF receptors and of follistatin on the inducing activities of Bvg1 and activin: does activin play a role in mesoderm induction? *EMBO J.*, 1994, *13*, 3533-3541.

Shawlot W., Deng J. M. & Behringer R. R., Expression of the mouse cerberus-related gene, Cerr1, suggests a role in anterior neural induction and somitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, *95*, 6198-6203.

Smith W. C., Knecht A. K., Wu M. & Harland R. M., Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing Xenopus mesoderm. *Nature*, 1993, *361*, 547-549.

Spemann H. & Mangold H., Uber Induktion van embryonalanlagen durch Implantation artfiememder Organisatoren, *Roux' Arch. f. Entw. mech.*, 1924, *100*, 599-638.

Thomas P. & Beddington R., Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr. Biol.*, 1996, *6*, 1487-1496.

Thomas P. Q., Brown A. & Beddington R. S., Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development*, 1998, *125*, 85-94.

Varlet I., Collignon J. & Robertson E., nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development*, 1997, *124*, 1033-1044.

Waldrip W. R., Bikoff E. K., Hoodless P. A., Wrana J. L. & Robertson E. J., Smad2 signaling in extra-embryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell*, 1998, *92*, 797-808.

Wang S., Krinks M., Lin K., Luyten F. P. & Moos M. Jr., Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8, *Cell*, 1997, *88*, 757-766.

Wieser R., Wrana J. L. & Massague J., GS demain mutations that constitutively activate T-beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J.*, 1995, *14*, 2199-2208.

Wilson P. A. & Hemmati-Brivanlou A., Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature*, 1995, *376*, 331-333.

Zhou X., Sasaki H., Lowe L., Hogan B. L. & Kuehn M. R., Nodal is a navet TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature*, 1993, *361*, 543-547.

Zimmerman L. B., De Jesus-Escobar J. M. & Harland R. M., The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, 1996, *86*, 599-606.