

# xMLP est un gène de réponse précoce au calcium lors de la détermination neurale chez *Xenopus laevis*

par Julie Batut, Isabelle Néant, Catherine Leclerc et Marc Moreau\*

Centre de Biologie du Développement, CNRS-UMR5547, Université Paul Sabatier, Bat. 4R3,  
118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France.  
Tel : (33) (0) 5 61 55 63 98 – Fax : (33) (0) 5 61 55 65 07 – mel : moreau@cict.fr

\* auteur correspondant

Reçu le 5 mai 2003

## RÉSUMÉ

Pendant la gastrulation chez l'embryon d'Amphibien, les cellules ectodermiques ont le choix entre un destin épidermique et un destin neural. Ce choix de destinée résulte d'un antagonisme entre l'activation ventralisante de la voie induite par les « Bone Morphogenetic Proteins » (spécification épidermique), et les facteurs dorsalisants (tels que Noggin, Chordin ou Follistatine) sécrétés par le mésoderme en dorsal (spécification neurale). De plus, la détermination neurale nécessite une signalisation instructive qui implique l'activation de canaux calciques de type L. L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium qui en résulte est nécessaire et suffisante pour

orienter les cellules de l'ectoderme compétent vers la voie neurale. Nous avons recherché par criblage d'une banque soustractive entre ectodermes induits dans la voie neurale versus non induits, les gènes de détermination neurale qui sont immédiatement transcrits après la variation calcique. Le premier gène candidat étudié ici code pour xMLP, une « MARCKS like protein ». xMLP est activé par une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et par le facteur dorsalisant Noggin. Il est exprimé au niveau des territoires neuraux au cours de la gastrulation et de la neurulation. Le rôle possible de xMLP dans la détermination neurale sera discuté.

## SUMMARY xMLP is a calcium target gene involved in *Xenopus* neural fates

In vertebrates, neural induction occurs during gastrulation when ectodermal cells choose between two fates, neural and epidermal. In *Xenopus*, neural induction has been regarded as a default pathway as it occurs, in dorsal ectoderm, when ventralizing signals (mainly Bone Morphogenesis Proteins, BMPs, potent epidermal inducers) are inhibited by dorsalizing signals, including factors such as noggin, chordin, and follistatin. However, our previous studies demonstrated that an instructive signal triggered by the activation of L-type voltage-sensitive calcium channels, resulting in a transient increase in intracellular free calcium, appears to be a necessary and sufficient requirement to induce the competent ectoderm toward the neural pathway.

Here we further explore the relationship between the Ca<sup>2+</sup> transient signals observed and the expression of early neural genes. We have performed a subtractive approach to identify the genes which are transcribed early after the calcium signal and involved in neural determination. We have analyzed a candidate gene (xMLP) which encodes a MARCKS-like protein, a substrate for PKC. We show that this gene is activated by a calcium transient signals and induced by noggin overexpression. xMLP is expressed at the right time in presumptive neural territories. The putative role of xMLP in the process of neural induction is discussed.

## INTRODUCTION

Les mécanismes liés aux inductions embryonnaires constituent des systèmes adaptés à l'étude des processus de détermination cellulaire. Chez l'Amphibien, lors de la

gastrulation, l'ectoderme possède une double potentialité de détermination : ses cellules peuvent s'orienter soit vers la destinée épidermique soit vers la destinée neurale.

Les données actuelles suggèrent que le choix de détermination de l'ectoderme résulte d'un antagonisme, au

niveau extracellulaire, entre des molécules ventralisantes (les « Bone Morphogenetic Proteins », BMP2, 4, 7, appartenant à la famille du TGF $\beta$ ), et des molécules dorsalisantes (noggin, chordin, follistatine, XnR3, Cerberus), sécrétées par le mésoderme dorsal sous-jacent. Ainsi l'induction épidermique serait due à un mécanisme instructif, avec l'activation d'une cascade de transduction après fixation des BMPs sur leurs récepteurs et permettant la transcription de facteurs proépidermiques (Msx1, xVent2). La détermination neurale de l'ectoderme résulterait de l'inhibition de la fixation des BMPs à leurs récepteurs par les facteurs dorsalisants. L'induction neurale se produirait par défaut en absence de signalisation BMP (pour revue, voir Weinstein & Hemmati-Brivanlou, 1999).

Cependant Noggin est capable d'activer, au niveau de l'ectoderme, des canaux calciques voltage dépendants de type L (Leclerc *et al.*, 1997). Ces canaux sont exprimés transitoirement dans tout l'ectoderme pendant la période de compétence (Dréan *et al.*, 1995). Sur des ectodermes isolés, l'activation directe des canaux calciques de type L par des agonistes pharmacologiques est capable de déclencher l'induction neurale et permet d'obtenir après culture la différenciation de neurones et de cellules gliales (Moreau *et al.*, 1994). Inversement, le blocage de ces canaux par des antagonistes inhibe l'induction déclenchée par Noggin et oriente les cellules dans la voie de détermination épidermique (Leclerc *et al.*, 1997).

Ces résultats montrent que le calcium est nécessaire et suffisant pour déclencher l'induction neurale sur ces ectodermes isolés.

L'influx initial de calcium est vraisemblablement amplifié, selon un mécanisme « induced calcium release », par une libération de calcium à partir des stocks internes (Galione & Churchill, 2002). De plus, la stimulation directe de ces stocks par des méthylxanthines comme la caféine oriente les cellules ectodermiques dans la destinée neurale (Moreau *et al.*, 1994).

Pour comprendre comment le calcium instruit la détermination neurale, il est essentiel de connaître les éléments qui prennent le relais de ce signal ionique, inscrivant de manière irréversible ce choix de détermination. Cette détermination implique l'activation transcriptionnelle de gènes spécifiques neuraux.

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 calcium intracellulaire (Leclerc *et al.*, 1999). De même, l'activation des canaux de type L permet l'expression des facteurs de transcription Zic3 et XlPou2 (Leclerc *et al.*, 2001). Ces gènes sont également induits par Noggin. L'expression de XlPou2 est régionalisée dans les structures antérieures des tissus neuronaux (Witta *et al.*, 1995) et engage l'ectoderme compétent dans la voie de différenciation neurale (Matsuo-Takasaki *et al.*, 1999). Zic3 s'exprime également de manière précoce dans le système nerveux et les crêtes neurales en développement (Nakata *et al.*, 1997).

En dehors de ces trois gènes, les gènes de détermination neurale activés par la variation calcique sont inconnus. Nous avons construit une banque soustractive entre une population d'ectodermes soumis à une variation calcique (engagement vers la voie neurale) et une population témoin (voie épidermique). Nous présentons dans cet article les critères de sélection appliqués pour l'identification des gènes précocement transcrits à la suite d'une variation calcique intracellulaire et impliqués dans l'induction neurale. Nous analysons un premier gène ainsi isolé, codant pour xMLP, « MARKCS-like protein », substrat de la protéine kinase C (Zhao *et al.*, 2001) impliqué dans la modulation de l'affinité de la calmoduline pour le calcium (Porumb *et al.*, 1997), et nous discutons le rôle qu'il pourrait jouer dans l'induction neurale.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Embryons et explants

Les ovocytes, embryons et explants (calottes animales) sont conservés dans du NAM 0,1x (Normal Amphibian Medium : 11 mM NaCl, 0,2 mM KCl, 0,1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,01 Na<sub>2</sub>EDTA, 0,16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4). Le stade des embryons est déterminé d'après la table de développement établie par Nieuwkoop et Faber (1967). Les calottes animales, correspondant aux territoires ectodermiques, sont disséquées au stade 8 dans le NAM 0,1x et cultivées en absence (témoin) ou en présence (induction) de caféine 10 mM (Sigma) pendant des temps variant de 15 à 60 minutes. Les variations de la concentration calcique intracellulaire sont inhibées par le BAPTA-AM, chélateur calcique perméant intracellulaire (1,2-Bis (2-Aminophénoxy) éthane-N, N, N',N'-Tetraacetic acid-Acétométhylester, Sigma). Pour réaliser ces inhibitions, les ectodermes sont préincubés 30 minutes à l'abri de la lumière avec 20  $\mu$ M avant l'ajout de 10 mM de caféine.

L'addition de 10  $\mu$ g/ml de cycloheximide avant la variation calcique provoquée par la caféine inhibe la synthèse des protéines (Uzgare *et al.*, 1998).

Noggin est surexprimé dans les calottes animales après injection, dans les deux blastomères au stade deux cellules, de 50 pg d'ARN coiffé. Cet ARN messager est synthétisé *in vitro* suivant les instructions du kit « SP6 mMessage mMachine™ » (Ambion), à partir du plasmide d'expression de Noggin généreusement fourni par le Dr. Agius (Piccolo *et al.*, 1997).

### Extraction des ARN et RT-PCR

Les ARN totaux sont isolés à partir d'un embryon unique ou de 8 calottes animales par extractions au phénol/chloroforme/isoamylalcool (25 : 24 : 1) suivies d'une digestion de l'ADN génomique par la DNase RQ1 (1 unité, Promega), et d'une précipitation au chlorure de lithium. Le premier brin d'ADNc est synthétisé à partir de 1  $\mu$ g d'ARN totaux (« First-strand cDNA Synthesis

kit », Pharmacia). 1/20<sup>e</sup> sont soumis à l'amplification par la TaQ polymérase (Promega). Les amorces utilisées sont les suivantes :

ODC (U-TGGATTTTCAGAGACCAAC, D-CCAAGGCTAAAGTTGCAG),

XIPou2 (U-GGCAGATGTTGGCTTGGCACTG, D-GTAGACTTCGTGTTGCTGAGG),

Zic3 (U-GATCATTATGCTGCCCAAT, D-CGG-TATGCACCCTGATAT),

c-fos (U-CAGCTGCAAGTCTCTGTGAA, D-AGTGGTCAGATTCTGGGTATGT),

Noggin (U-ATGGATCATTCCAGTCCG, D-GCATGAGCATTTCAGTCCG),

Msx1 (U-ACTGGTGTAAAGCCGTCCCT, D-TCAGGCTTGAGCAGCGTCTCC),

Xbra (U-GGATCGTTATCACCTCTG, D-GTG-TAGTCTGTAGCAGCA),

et xMLP (Up-GTACCACTTGTAGCCCCTAGAG, D-CGCTCACAACCTTACATCCCAAG).

### Banque soustractive et criblage différentiel

La banque soustractive est construite suivant les instructions du « PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit » (Clontech), à partir de 0,6 µg d'ARN totaux issus des calottes animales témoin ou traitées par 10 mM de caféine pendant 15, 30, 45 et 60 minutes. Les fragments d'ADNc spécifiques de l'induction, c'est-à-dire obtenus après soustraction des fragments présents dans la population témoin, sont criblés (« PCR-Select Differential Screening Kit », Clontech). Ces ADNc issus de la soustraction induit versus non induit (dite « sens ») sont déposés sur membrane de nylon en quatre répliques. Les répliques sont hybridées de manière indépendante avec les sondes radio-marquées complexes spécifiques des populations soustraites et non soustraites, sens et inverse. Les fragments d'intérêt sont ensuite séquencés (Milligene, Toulouse) et comparés aux banques de données (BLAST, NCBI).

### Hybridation *in situ*

Les hybridations *in situ* sont réalisées suivant le protocole décrit par Harland (1991), avec les sondes marquées à la digoxigénine synthétisées à partir des plasmides pGEM-T-Easy contenant le fragment C3 (sonde sens témoin par SP6 et sonde antisens par T7, Roche).

## RÉSULTATS

### Critères de sélection des ectodermes compétents

Il est aisé d'induire dans la voie neurale des ectodermes isolés en les traitant par de la caféine. Dans ces conditions, les variations de la concentration en calcium sont transitoires et assez brèves, de l'ordre de 30 minutes. Cette période est suffisante pour orienter de manière définitive les cellules ectodermiques vers un destin neural. Ainsi, dans une période de temps très courte, inférieure

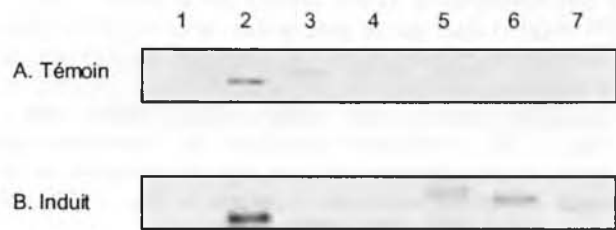


FIG. 1. – Caractérisation par RT-PCR des calottes induites et témoins pour la construction de la banque soustractive. Les calottes expriment toutes le gène de ménage ODC (A-B, puits 2). Elles sont exemptes de toute contamination génomique (A-B, puits 1) et mésodermique Xbra (A-B, puits 4). Elles sont ensuite testées pour les marqueurs spécifiques de la voie épidermique (Msx1, puits 3) et de la voie neurale (c-fos, puits 5; Zic3, puits 6 et XIPou2, puits 7).

à une heure, un certain nombre de gènes vont être activés pour à la fois réprimer la détermination épidermique et orienter les cellules dans la voie de détermination neurale.

Des ectodermes compétents prélevés au stade 8 sont induits dans la voie neurale par 10 mM de caféine au cours d'une cinétique allant de 15 à 60 minutes, parallèlement à la culture d'ectodermes témoins. Ces deux catégories d'ARN issus des ectodermes traités ou témoins sont contrôlées vis-à-vis de l'expression de gènes marqueurs spécifiques.

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'absence du marqueur pan-mésodermique Xbra dans ces deux populations (Fig. 1A et B, ligne 4). Ensuite nous avons révélé la présence spécifique dans la population témoin du marqueur proépidermique Msx1 (Fig. 1A, ligne 3) et son absence dans la population induite (Fig. 1B, ligne 3). Inversement, les gènes spécifiquement neuraux comme XIPou2 et Zic3 (Fig. 1B, lignes 7 et 6, respectivement). Le proto-oncogène c-fos est également exprimé dans la population induite (Fig. 1B, ligne 5). Ces trois marqueurs sont absents dans la population témoin (Fig. 1A, lignes 5, 6 et 7).

Nos deux populations d'ARN présentent donc chacune les gènes caractéristiques spécifiques de leur voie de détermination, et sont ainsi aptes à servir de matrice pour la réalisation d'une banque soustractive.

### Identification des cibles du calcium par banque soustractive et criblage différentiel

Pour isoler de nouveaux gènes précoces contrôlés par le calcium et impliqués dans la détermination neurale de l'ectoderme, nous avons construit une banque soustractive à partir des populations d'ARN totaux précédemment caractérisés, issus d'ectodermes induits par une variation calcique versus témoin.

Les inserts spécifiques de l'augmentation de concentration calcique sont déposés sur membranes et hybridés avec les sondes radioactives complexes spécifiques des populations soustraites et non soustraites, sens et inverse. Des contrôles indépendants sont déposés, correspondant

à des fragments d'ADNc fournis par Clontech (Fig. 2, G9 et G10) ainsi que le gène codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein, F11). Les candidats spécifiques de la variation calcique, tels que le dépôt D3, présentent un signal fort avec la sonde complexe soustraite « sens » (Fig. 2, III), c'est-à-dire spécifique de l'induction calcique, et une absence de marquage en présence de la sonde complexe soustraite « inverse » (Fig. 2, IV), et donc spécifique des ectodermes témoins.

Parmi les 384 clones indépendants testés, une trentaine de candidats spécifiquement exprimés après stimulation calcique ont été mis en évidence. La plupart des inserts ainsi isolés ne présentent pas d'homologie de séquence avec les banques de données disponibles.

Aussi avons nous tout d'abord choisi d'analyser les candidats correspondant à des fragments de gènes codant pour des entités connues chez le Xénope. Le premier fragment retenu se situe dans la région 3'UTR du gène xMLP.

### MRP est un gène de réponse précoce à une variation calcique

Dans un premier temps nous avons vérifié que l'expression de notre candidat était bien spécifiquement induite par une augmentation de la concentration calcique intracellulaire.

Des ectodermes compétents isolés soumis à une variation calcique induite par la caféine expriment le transcrite de xMLP (Fig. 3, ligne Caf), alors que cet ARN messager est absent dans les ectodermes non traités. La préincubation de ces ectodermes par le BAPTA-AM, chélateur calcique perméant, abolit la variation calcique due à l'ajout de caféine, et ces ectodermes ne présentent plus le transcrite (Fig. 3, ligne BAPTA + Caf). Ainsi le gène xMLP est spécifiquement exprimé à la suite d'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire.

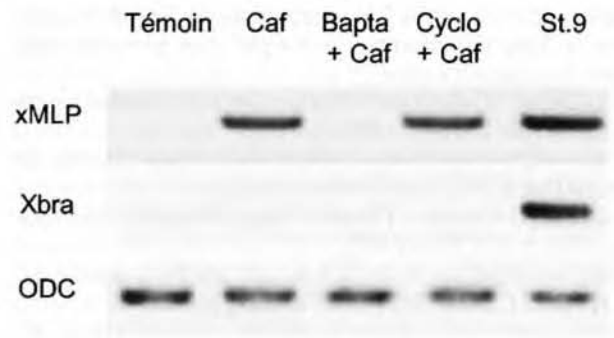


FIG. 3. – L'expression de xMLP dépend du calcium. RT-PCR sur 8 calottes animales témoins (Tem), 8 calottes animales traitées 30 mn par 10 mM de caféine (Caf), et 8 calottes animales préincubées pendant 30 mn soit par 20  $\mu$ M de BAPTA (BAPTA + Caf), soit avec 10  $\mu$ g/ml de cycloheximide (Cyclo + Caf) avant le traitement à la caféine 10 mM.

Comme nous recherchions les gènes précocement activés par la variation calcique, nous avons préincubé les ectodermes compétents avec un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide, avant l'addition de caféine. Dans de telles conditions, xMLP est toujours exprimé (Fig. 3, ligne Cyclo + Caf). Nous pouvons donc conclure que xMLP est un gène de réponse directe à la variation calcique puisque son expression ne nécessite pas d'intermédiaire de synthèse protéique.

Ainsi ce gène issu de la banque soustractive est effectivement un gène de réponse précoce à une variation calcique intracellulaire. Est-il impliqué dans le processus d'induction neurale ?

### L'expression de xMLP est induite par Noggin

Afin de déterminer si ce gène est un relais de la variation calcique impliquée dans la signalisation neurale,

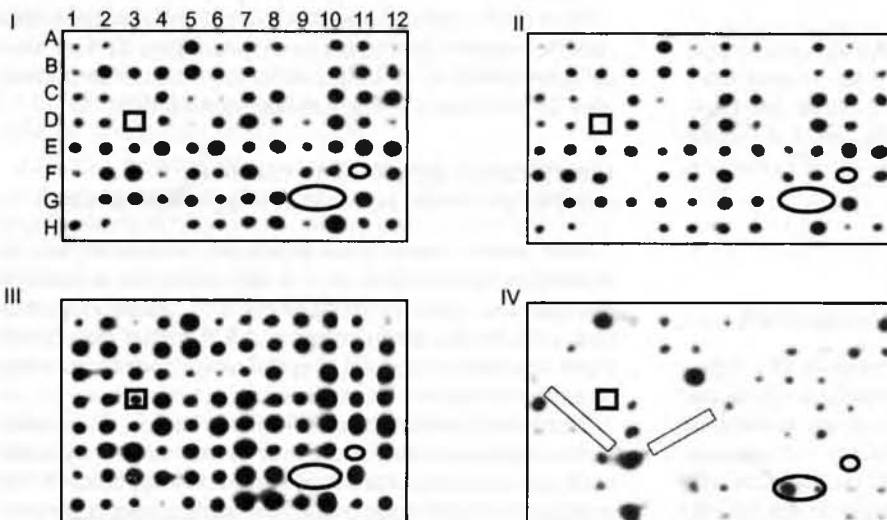


FIG. 2. – Criblage différentiel de la banque soustraite, spécifique de l'induction calcique. Les fragments issus de la soustraction et ordonnés sur membrane de nylon sont hybridés avec les sondes complexes des populations initiale induite (I), initiale témoin (II), soustraite induite versus témoin (III), et soustraite témoin versus induite (IV). Le candidat de coordonnées D3 est spécifique de la population induite. Les contrôles internes sont déposés en F11 pour la GFP, en G9 et G10, correspondant à des ADNc fournis par Clontech.

nous avons tout d'abord étudié son expression en présence du facteur neuralisant Noggin. Nous avons recherché par RT-PCR le niveau d'expression du gène candidat dans des ectodermes compétents isolés à partir d'embryons surexprimant Noggin par rapport à des calottes d'embryons ne surexprimant pas Noggin. Les ectodermes injectés expriment effectivement le facteur dorsalisant Noggin (Fig. 4, Nog). De tels ectodermes expriment également xMPLP (Fig. 4, Nog), alors que les ectodermes témoins n'expriment ni Noggin, ni xMPLP (Fig. 4, Témoin).

Ainsi, nous disposons d'un gène dont l'expression est spécifiquement induite par une variation calcique et par l'inducteur neural Noggin.

Notre but étant de mettre en évidence des gènes qui soient dépendants du calcium mais également impliqués dans les processus de détermination neurale, nous avons étudié le profil d'expression du candidat, prenant comme second critère de sélection une répartition des transcrits dans les territoires neuraux au cours du développement.



FIG. 4. – L'expression de xMPLP dépend de signaux dorsalisants. RT-PCR à partir de calottes animales prélevées sur 8 embryons témoins au stade 8 et sur 8 embryons surexprimant Noggin (Nog). Noggin induit la transcription de xMPLP.

### xMPLP présente un profil d'expression de type neural

xMPLP est un gène maternel (Fig. 5A, ovo) et s'exprime à tous les stades testés par RT-PCR (Fig. 5A). Pendant la gastrulation, le transcrite de xMPLP s'exprime fortement au niveau du mésoderme (zone marginale) et légèrement au niveau de l'ectoderme dorsal (Fig. 5B). Au stade neurula, il est exprimé dans les futurs territoires neuraux (Fig. 5C, D). Au stade bourgeon caudal, le signal est localisé au niveau des somites et du tube neural, avec une forte expression dans les structures antérieures, notamment au niveau des yeux (Fig. 5 E, F). Notre candidat xMPLP s'exprime donc précocement au niveau des territoires neuraux dans l'embryon de Xénope.

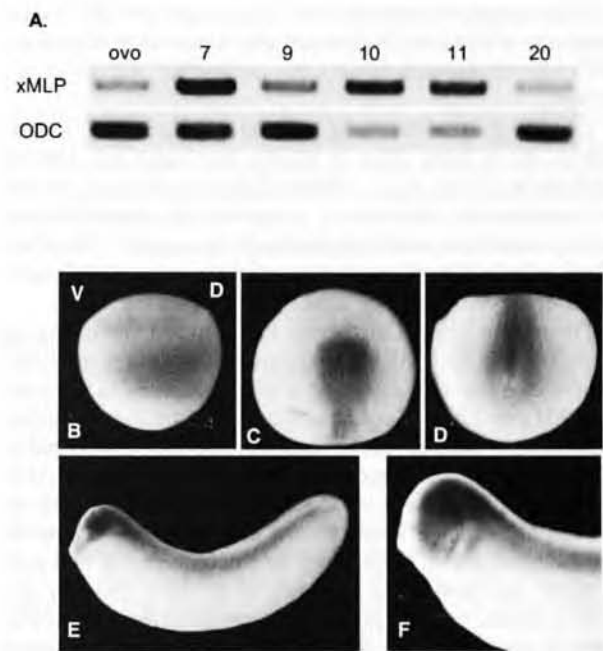


FIG. 5. – Profil d'expression de xMPLP par RT-PCR (A) et par hybridation in situ (B-F) sur des embryons entiers à différents stades de développement. Le transcrite de xMPLP est présent à tous les stades testés (ovocyte, stades 7, 9, 10, 11 et 20). xMPLP s'exprime dans les territoires neuraux aux stades jeune gastrula (B : vue de profil), neurula (C : vue dorsale antérieure, D : vue dorsale postérieure) et bourgeon caudal (E, F). V, ventral et D, dorsal.

## DISCUSSION

Au stade de jeune gastrula, les cellules ectodermiques sont compétentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent s'orienter vers la détermination neurale ou la destinée épidermique, en fonction des signaux reçus. Les travaux précédemment menés ont montré que l'activation de canaux calciques de type L, présents au sein de l'ectoderme compétent, était nécessaire et suffisante pour le déclenchement de la détermination neurale (Leclerc *et al.*, 1997, 2000).

Afin d'intégrer cette signalisation calcique dans le processus d'induction neurale, nous avons recherché de nouveaux gènes précoces contrôlés par le calcium et impliqués dans la voie de détermination neurale de l'ectoderme. Nous avons construit une banque soustractive à partir des ectodermes induits par une variation calcique versus témoin, permettant de comparer deux populations d'ARN messagers et d'isoler des gènes qui sont exprimés exclusivement dans chacune des populations.

La plupart des inserts isolés ne présente pas d'homologie de séquence avec les banques de données disponibles. Certains candidats correspondent à des fragments de gènes codant pour des entités connues chez le Xénope. Pour chacun d'entre eux, nous devons tout d'abord vérifier que leur transcription répond bien à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et que leur expression est associée aux futurs territoires neuraux.

Notre premier candidat testé est le gène xMLP, codant pour une « MARKCS-like protein », protéine myristoylée riche en alanine et substrat de la PKC (Zhao *et al.*, 2001).

Les premières études *in vivo* ont montré que l'inactivation de ce gène chez la Souris provoque une létalité périnatale (Chen *et al.*, 1996). Cette inactivation inhibe la fermeture du tube neural, menant à des exencéphalies embryonnaires ou anencéphalies (Chen *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996). Ce gène est donc nécessaire au développement embryonnaire des structures cérébrales.

De même chez l'embryon de Xénope, le domaine d'expression de xMLP est typiquement neural au cours du développement. Ce gène a été isolé chez le Xénope en 2001 par Zhao et collaborateurs à partir d'ectodermes compétents induits par l'activine, laquelle est capable d'engager l'ectoderme dans la voie mésodermique (Ariizumi *et al.*, 1991). Au stade jeune gastrula, le transcrite du gène xMLP est effectivement exprimé au niveau du mésoderme dorsal mais aussi de l'ectoderme dorsal précurseur des territoires neuraux (Fig. 5B; Zhao *et al.*, 2001). Ainsi, cette expression correspond aux territoires où sont enregistrés les signaux calciques et qui expriment les canaux calciques de type L (Leclerc *et al.*, 1999). Au stade bourgeon caudal, le signal en hybridation *in situ* est localisé dans le tube neural, avec une forte intensité dans les structures antérieures, notamment au niveau des yeux, mais également dans les somites (Fig. 5 E et F; Zhao *et al.*, 2001).

Notre candidat xMLP pourrait faire le lien entre les voies dépendantes du calcium et l'engagement des cellules ectodermiques vers la voie neurale dans l'embryon de Xénope.

Des études menées *in vitro* ont montré que les protéines de type MARCKS ont une double potentialité : le domaine N-terminal possède un site de myristoylation qui permet un ancrage aux membranes (Vergeres *et al.*, 1995), et un domaine effecteur capable de lier soit la calmoduline, soit l'actine filamenteuse, en fonction de leur état de phosphorylation par la PKC (Kim *et al.*, 1994; 2000). De plus, l'association à la calmoduline régule l'affinité de cette dernière pour le calcium (Porumb *et al.*, 1997).

xMLP pourrait être à la convergence entre la signalisation calcique (calmoduline), les cascades de phosphorylation médiées par la PKC, et la polymérisation de l'actine.

Nous proposons un modèle dynamique du rôle de xMLP pendant les phases précoces du développement. La phosphorylation de MARCKS par une PKC indépendante du calcium (PKC  $\theta$ ) régule sa localisation subcellulaire. Ainsi, la forme phosphorylée cytoplasmique est associée à un état prolifératif de la cellule et la forme non phosphorylée membranaire traduit un contexte de différenciation cellulaire (Kim *et al.*, 2000). Nous supposons que xMLP, qui possède le même domaine effecteur, pourrait également être un substrat de la PKC  $\theta$  et présenterait la même distribution subcellulaire. Dans un premier temps, xMLP phosphorylé cytoplasmique serait associé à un état prolifératif caractéristique des stades précoces de segmentation. Dans un deuxième temps, en contexte de signalisation calcique élevée au début de la gastrulation, xMLP néo-synthétisé potentialiserait l'affinité de la calmoduline pour le calcium, et le complexe calcium/calmoduline activerait une calcium-calmoduline kinase (CaM K) conduisant à l'activation de la transcription des gènes proneuraux (Fig. 6A). xMLP permet-

### A 1. Segmentation / Prolifération

### 2. Début de gastrulation / Identité neurale

### B 3. Neurulation / Différenciation

### Réarrangements corticaux

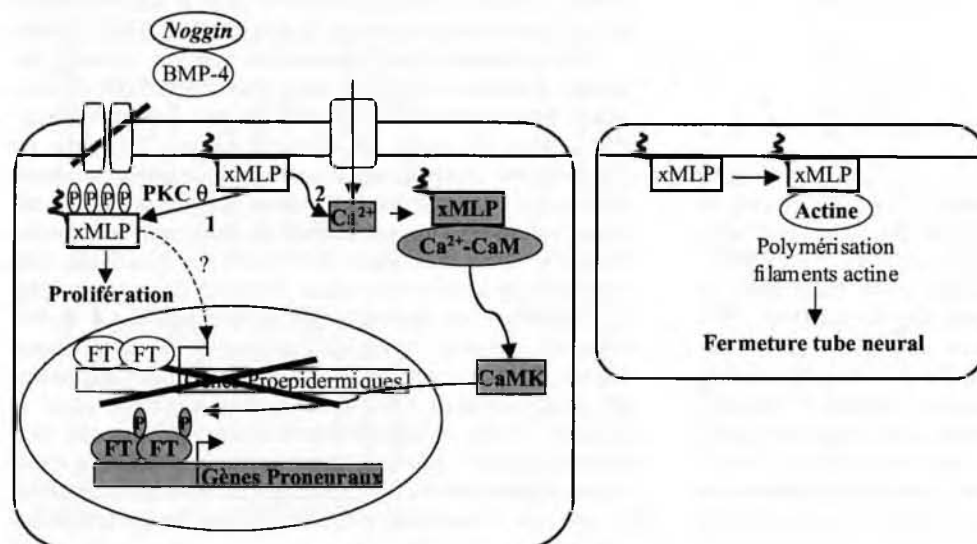


FIG. 6. – Modèle de l'implication dynamique de xMLP dans la détermination neurale de l'ectoderme chez l'amphibien. A. La forme phosphorylée de xMLP par la PKC  $\theta$  signe la phase de prolifération cellulaire (1). L'« identité neurale » se met en place sous l'influence de *Noggin* et de l'augmentation de calcium intracellulaire (2), xMLP s'associe à la calmoduline, activant la transcription des gènes proneuraux (via une CaM Kinase) et inhibant celle des gènes proépidermiques. B. Lors de la neurulation, les cellules ectodermiques s'engagent dans la voie de différenciation, xMLP permet d'ancrer l'actine au cortex, permettant les mouvements morphogénétiques nécessaires à la fermeture du tube neural.

trait ainsi l'établissement d'une « identité neurale » des cellules ectodermiques. Enfin, pendant la neurulation qui correspond aux premières étapes de différenciation, la signalisation calcique est basse. xMLP ancré à la membrane pourrait alors lier l'actine filamenteuse et ainsi permettre la fermeture du tube neural (Fig. 6B), les protéines de la famille des MARCKS étant impliquées dans les changements de forme et migration cellulaires (Zolessi & Arruti, 2001).

Ainsi xMLP serait à la fois une cible transcriptionnelle du signal calcique et en quelque sorte à son tour un « potentialisateur » de voies calciques via sa régulation de l'affinité de la calmoduline pour le calcium. Il reste cependant à déterminer comment le calcium régule la transcription de ce gène, en recherchant la présence de séquences consensus décrites dans les voies de transduction dépendantes du calcium, telles que les séquences promotrices de type CaRE et DRE (pour revue, Mellstrom & Naranjo, 2001).

Nous avons ici des éléments pour impliquer xMLP dans la mise en place de cette identité neurale. La sous-traction inverse, qui provient d'ectodermes non induits versus ectodermes induits par une variation calcique, est enrichie en gènes de détermination épidermique. Elle permettra d'accéder aux gènes dont la transcription est spécifiquement inhibée par l'augmentation de calcium intracellulaire. Il existe donc une signalisation calcique instructive activant l'expression de gènes nécessaires à l'établissement et au maintien de la voie neurale.

**Remerciements.** – Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier du CNRS, d'un contrat PICS/CNRS et de l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) n°4325. Nous remercions le Dr Eric Agius pour nous avoir fourni le plasmide exprimant Noggin. Nous tenons à remercier tout particulièrement Christiane Daguzan pour sa précieuse aide technique et le Dr Fabienne Pituello pour sa disponibilité pendant les expériences en hybridation *in situ*.

## BIBLIOGRAPHIE

- Ariizumi T., Sawamura K., Uchiyama H. & Asashima M., Dose and time-dependent mesoderm induction and outgrowth formation by activin A in *Xenopus laevis*. *Int. J. Dev. Biol.*, 1991, 35, 407-414.
- Chen J., Chang S., Duncan S.A., Okano H.J., Fishell G. & Aderem A., Disruption of the MacMARCKS gene prevents cranial neural tube closure and results in anencephaly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 6275-6279.
- Dréan G., Leclerc C., Duprat A.M. & Moreau M., Expression of L-type Ca<sup>2+</sup> channel during early embryogenesis in *Xenopus laevis*. *Int. J. Dev. Biol.*, 1995, 39, 1027-1032.
- Galione A. & Churchill G.C., Interactions between calcium release pathways : multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium*, 2002, 32, 343-354.
- Harland R.M., *In situ* hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol.*, 1991, 36, 685-695.
- Kim J., Shishido T., Jiang X., Aderem A. & McLaughlin S., Phosphorylation, high ionic strength, and calmodulin reverse the binding of MARCKS to phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 28214-28219.
- Kim S.S., Kim J.H., Kim H.S., Park D.E. & Chung C.H., Involvement of the theta-type protein kinase C in translocation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) during myogenesis of chick embryonic myoblasts. *Biochem. J.*, 2000, 347, 139-146.
- Leclerc C., Daguzan C., Nicolas M.T., Chabret C., Duprat A.M. & Moreau M., L-type calcium channel activation controls the *in vivo* transduction of the neuralizing signal in the amphibian embryos. *Mech. Dev.*, 1997, 64, 195-110.
- Leclerc C., Duprat A.M. & Moreau M., Noggin upregulates fos expression by a calcium mediated pathway in amphibian embryos. *Dev. Growth Differ.*, 1999, 41, 227-238.
- Leclerc C., Rizzo C., Daguzan C., Néant L., Batut J., Augé B. & Moreau M., La détermination neurale dans l'embryon de *Xenopus laevis* : contrôle de l'expression des gènes neuraux précoces par le calcium. *J. Soc. Biol.*, 2001, 195, 327-337.
- Matsuo-Takasaki M., Lim J.H. & Sato S.M., The POU domain gene, XIPOU 2 is an essential downstream determinant of neural induction. *Mech. Dev.*, 1999, 89, 75-85.
- Mellstrom B. & Naranjo J.R., Mechanisms of Ca<sup>2+</sup>-dependent transcription. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2001, 11, 312-319.
- Moreau M., Leclerc C., Gualandris-Parisot L. & Duprat A.M., Increased internal Ca<sup>2+</sup> mediates neural induction in the amphibian embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 12980-12985.
- Nakata K., Nagai T., Aruga J. & Mikoshiba K., *Xenopus* Zic3, a primary regulator both in neural and neural crest development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 11980-11985.
- Piccolo S., Agius E., Lu B., Goodman S., Dale L. & De Robertis E.M., Cleavage of Chordin by Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell*, 1997, 91, 407-416.
- Porumb T., Crivici A., Blackshear P.J. & Ikura M., Calcium binding and conformational properties of calmodulin complexed with peptides derived from myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) and MARCKS-related protein (MRP). *Eur. Biophys. J.*, 1997, 25, 239-247.
- Uzgare A.R., Uzman J.A., El-Hodiri H.M. & Sater A.K., Mitogen-activated protein kinase and neural specification in *Xenopus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 14833-14838.
- Vergeres G., Manenti S., Weber T. & Sturzingner C., The myristoyl moiety of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) and MARCKS-related protein is embedded in the membrane. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 19879-19887.
- Weinstein D.C. & Hemmati-Brivanlou A., Neural induction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1999, 15, 411-433.
- Witta S.E., Agarwal V.R. & Sato S.M., XIPOU2, a noggin-inducible gene, has direct neuralizing activity. *Development*, 1995, 121, 721-730.
- Wu M., Chen D.F., Sasaoka T. & Tonegawa S., Neural tube defects and abnormal brain development in F52-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 2110-2115.
- Zhao H., Cao Y. & Grunz H., Isolation and characterization of a *Xenopus* gene (xMLP) encoding a MARCKS-like protein. *Int. J. Dev. Biol.*, 2001, 45, 817-826.
- Zolessi F.R. & Arruti C., Apical accumulation of MARCKS in neural plate cells during neurulation in the chick embryo. *BMC Dev. Biol.*, 2001, 1, 7-15.