

# Imagerie et développement de la ligne latérale chez le Poisson-zèbre

par Christine Dambly-Chaudière

Laboratoire de Neurogénétique, INSERM E343, Université Montpellier II, cc103, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5. E-mail : cdambly@univ-montp2.fr

Reçu le 4 mars 2004

## RÉSUMÉ

Le système de la ligne latérale du Poisson-zèbre présente les qualités de simplicité, d'accessibilité et de reproductibilité qui en font un système approprié pour l'analyse du développement neural et la formation d'un « modèle » chez les Vertébrés. De plus, la

transparence de l'embryon permet l'utilisation, chez l'animal vivant, d'une batterie d'outils optiques et moléculaires, essentiels pour une analyse approfondie du système.

## SUMMARY Imaging the development of the zebrafish line

The lateral line system of the zebrafish offers the qualities of simplicity, accessibility and reproducibility which are most appropriate for the analysis of neural development and pattern formation in verte-

brates. Furthermore, the transparency of the fish embryos allows the application of a variety of optical and molecular methods in the living animal, which is essential for a more complete analysis of the system.

## DESCRIPTION DE LA LIGNE LATÉRALE

La ligne latérale du Poisson est un système sensoriel très proche (et vraisemblablement l'ancêtre évolutif) de notre système auditif. Ce système est sensible aux mouvements d'eau dans le milieu environnant, et permet à l'animal d'éviter les obstacles, de détecter ses proies ou ses prédateurs, de nager en bancs sans visibilité... La ligne latérale a disparu avec le passage à la vie terrestre, à l'exception de sa forme dérivée, l'oreille interne des Vertébrés supérieurs (Adam *et al.*, 1998; Eddison *et al.*, 2000; Fritsch & Beisel, 2001).

La ligne latérale est composée d'un ensemble d'organes superficiels (neuromastes) arrangés en lignes selon un modèle défini et spécifique de l'espèce. Elle comprend deux subdivisions principales, la ligne antérieure qui regroupe les organes présents sur la tête, et la ligne postérieure qui inclut les organes présents sur le tronc et la queue. Nous nous intéressons essentiellement à la ligne postérieure composée, à la fin de l'embryogenèse, de 7 à 8 organes régulièrement répartis le long du flanc de l'animal.

Chaque neuromaste est constitué de cellules ciliées entourées de cellules-support et est innervé par des neurones sensoriels bipolaires situés dans un ganglion crânien. Ces neuromastes sont très faciles à visualiser, soit en microscopie Nomarski, soit après incubation du pois-

son dans un colorant vital (2 Di-4-Asp) (Collazo *et al.*, 1994) qui s'accumule spécifiquement dans les cellules ciliées actives.

## LE DÉVELOPPEMENT DE LA LIGNE LATÉRALE

Les neuromastes de la ligne latérale postérieure et leurs neurones sensoriels dérivent d'une seule placode ectodermique qui se forme vers 18-20 heures après fécondation (haf) au niveau du rhombencéphale, postérieurement à la placode otique (Kimmel *et al.*, 1995). Chez le Poisson-zèbre, cette placode contient une centaine de cellules qui se séparent en deux groupes. Un groupe rostral (environ 20 cellules), destiné à former le ganglion tandis que le groupe caudal forme un primordium qui reste stationnaire, migre le long du flanc du poisson et atteint la nageoire caudale 24 heures plus tard (soit à 48 haf) en laissant derrière lui des groupes de cellules qui vont former les premiers neuromastes (Metcalfe *et al.*, 1985). Cette ligne postérieure comprend 5 neuromastes régulièrement espacés le long de chaque flanc et 2-3 neuromastes terminaux au bout de la queue. Lors de la croissance de l'animal, la ligne embryonnaire est progressivement complétée par l'addition de neuromastes, pour arriver à un nombre final d'une cinquantaine de neuromastes formant quatre lignes antéro-postérieures sur le

tronc et la queue. Nous avons montré que cette complé-  
tion de la ligne latérale postérieure se fait par réitération  
du processus embryonnaire avec formation et migration  
de nouveaux primordiums (Sapède *et al.*, 2002).

## OUTILS POUR ÉTUDIER LA MIGRATION DES CELLULES ET LEUR PROLIFÉRATION

La transparence des embryons du Poisson-zèbre per-  
met de suivre *in vivo* la migration du primordium par  
cinématographie vidéo en "time-lapse". Grâce à cette  
méthode, nous avons suivi individuellement chaque cel-  
lule du primordium en migration et avons montré que ces  
cellules gardent toutes leur position relative et qu'elles  
continuent à se diviser (Gompel *et al.*, 2001). Une ana-  
lyse plus détaillée de la prolifération des cellules dans le  
primordium peut être réalisée en visualisant l'incorpora-  
tion de bromodéoxyuridine (BrdU). Cette technique est  
particulièrement aisée avec le Poisson-zèbre car il suffit  
de tremper les embryons dans une solution de BrdU, de  
les incubé pendant 30 minutes et de les laisser se déve-  
lopper pendant une heure afin de permettre la synthèse  
d'ADN, pour révéler la présence de cellules en réplika-  
tion dans le primordium en migration.

## OUTILS POUR ÉTUDIER LA MISE EN PLACE DES NEUROMASTES

La méthode de cinématographie vidéo en time-lapse  
nous a également permis de montrer que ce sont les cel-  
lules «en queue» du primordium qui se ségrègent pour  
former un neuromaste. Cette mise en place se fait non  
pas en des endroits définis du corps, mais à des inter-  
valles de temps définis. Nous en avons conclu que ces  
ségrégations résultent en fait d'un processus de partition  
intrinsèque au primordium (Gompel *et al.*, 2001).

Afin de mieux comprendre pourquoi les cellules du  
primordium qui vont former un neuromaste s'arrêtent  
alors que leurs voisines continuent leur migration, nous  
avons recherché des gènes exprimés de manière hétéro-  
gène dans le primordium (Gompel *et al.*, 2000). De cette  
manière, nous avons trouvé un gène dont l'expression  
suit le comportement migratoire des cellules : il est for-  
tement exprimé dans les cellules en migration, son  
expression est réduite dans les cellules qui vont être  
déposées et elle est absente dans les cellules immobilis-  
ées (Gompel *et al.*, 2001). L'inactivation de ce gène, qui  
code pour le récepteur de chémokine CXCR4, a montré  
qu'il contrôle le pouvoir migratoire des cellules (David  
*et al.*, 2002). De récents travaux rapportent que ce gène  
CXCR4 contrôle également la migration des cellules ger-  
minales non seulement chez le Poisson (Doitsidou *et al.*,  
2002 ; Knaut *et al.*, 2003) mais également chez la Sou-  
ris (Molyneaux *et al.*, 2003)

L'absence de neuromastes différenciés, détectée par  
l'absence de marquage au DiAsp, peut avoir différentes ori-  
gines. Par exemple, elle peut résulter de l'absence de ségré-

gation de cellules par le primordium en migration, d'une  
ségrégation normale mais de l'absence de différenciation  
des cellules déposées ou encore de leur mort cellulaire.  
Fort heureusement, il existe une méthode très simple qui  
permet d'examiner la mise en place des cellules et leur  
survie, indépendamment de leur différenciation : il s'agit de  
la méthode de décaement. Le principe en est d'injecter de  
la fluorescéine encagée (molécule de fluorescéine portant  
des radicaux qui abolissent la fluorescence mais qui peu-  
vent être détectés par une courte exposition à la lumière  
U. V.) dans le zygote et ensuite de décaer la fluorescéine  
par une impulsion très courte de lumière UV, ce qui rend  
ces cellules fluorescentes. Ainsi, si le décaement est réa-  
lisé sur le primordium, les cellules en migration deviennent  
fluorescentes, ainsi que toute leur descendance.

## OUTILS POUR MARQUER DES NEURONES

Chaque neuromaste est innervé par des neurones sen-  
soriels bipolaires, qui étendent également une projection  
centrale dans le rhombencéphale. Il est possible de visua-  
liser ces neurones sensoriels chez les poissons vivants,  
simplement en prolongeant l'incubation des poissons dans  
le DiAsp : ce marqueur qui s'accumule dans les cellules  
ciliées diffuse également dans les neurones sensoriels  
(Alexandre & Ghysen, 1999). De cette manière, on peut  
voir que les neuromastes embryonnaires sont innervés par  
deux fibres, suggérant que chaque neuromaste est innervé  
par deux neurones sensoriels. Cette méthode extrêmement  
simple de visualisation des projections sensorielles et cen-  
trales des neurones est très précieuse car elle permet de  
trier très rapidement un grand nombre de larves pour des  
défauts dans les projections de leurs neurones.

On peut également obtenir le marquage de neurones  
individuels par application iontophorétique du marqueur  
lipophile DiI à un neuromaste. En effet, le DiI est  
capable de diffuser le long de la projection sensorielle,  
autour des corps cellulaires et le long de la projection  
centrale dans le rhombencéphale. D'autres molécules  
peuvent également être utilisées pour ce type de mar-  
quage, tels que les dextrans hydrophiliques fluorescents,  
qui diffusent également le long des axones des poissons  
vivants. L'utilisation simultanée de deux fluorochromes  
différents (par exemple un dextrane couplé à la fluo-  
rescéine et un dextrane couplé à la rhodamine) permet de  
comparer les projections correspondantes à deux neuro-  
mastes distincts. De cette manière, Alexandre et Ghysen  
(1999) ont montré l'existence d'une somatotopie dans la  
projection de la ligne latérale, c'est-à-dire une représen-  
tation de l'arrangement des neuromastes sur la surface du  
corps, dans l'arrangement des axones centraux, au niveau  
du rhombencéphale.

## AUTRES OUTILS

Les qualités d'accessibilité et de visualisation aisées du  
système de la ligne latérale rendent ce système accessible  
à une variété d'outils optiques et moléculaires. Il est ainsi

possible de tuer individuellement une cellule ou d'activer localement un gène d'intérêt suite à un "pulse" laser (choc thermique) sur une construction contenant ce gène.

Il est évident que ces possibilités augmenteront dans un avenir très proche avec, notamment, la possibilité de décager localement des ARN ou des oligonucléotides encagés injectés dans le zygote, de suivre la dynamique d'expression de gènes identifiés dans des cellules identifiées grâce à des constructions contenant un marqueur fluorescent. La possibilité d'utiliser de tels outils pour étudier le développement de la ligne latérale de l'animal vivant, c'est-à-dire dans un environnement complètement normal, est sans aucun doute l'un des aspects les plus attirants de ce système.

**BIBLIOGRAPHIE**

Adam J., Myat A., Le Roux I., Eddison M., Henrique D., Ish-Horowicz D. & Lewis J., Cell fate choices and the expression of Notch Delta and Serrate homologues in the chick inner ear: parallels with *Drosophila* sense-organ development. *Development*, 1998, 125, 4645-4654.

Alexandre D. & Ghysen A., Somatotopy of the lateral line projection in larval zebrafish. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 7558-7562.  
Collazo A., Fraser S. E. & Mabee P. M., A dual embryonic origin for vertebrate mechano-receptors. *Science*, 1994, 264, 426-430.  
David N., Sapède D., St Etienne L., Thisse C., Thisse B., Dambly-Chaudière C., Rosa F. & Ghysen A., Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand SDF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 16297-16302.  
Doitsidou M., Reichman-Fried M., Stebler J., Kopranner M., Dorries J., Meyer D., Esguerra C. V., Leung T. & Raz E., Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell*, 2002, 111, 647-659.  
Eddison M., Le Roux L. & Lewis J., Notch signaling in the development of the inner ear: lessons from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 11692-11699.  
Fritsch B. & Beisel K. W., Evolution and development of the vertebrate ear. *Brain. Res. Bull.*, 2001, 55, 711-721.  
Gompel N., Cubedo N., Thisse C., Thisse B., Dambly-Chaudière C. & Ghysen A., Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mech. Dev.*, 2001, 105, 69-77.  
Knaut H., Werz C., Geisler R. & Nusslein-Volhard C., A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature*, 2003, 421, 279-282.

**SUMMARY** - Identification of a genetic approach to generate and characterize

new models for studying gene expression in the lateral line system. We have developed a genetic approach to generate and characterize new models for studying gene expression in the lateral line system. We have developed a genetic approach to generate and characterize new models for studying gene expression in the lateral line system.

Cells expressing the lacZ reporter gene under the control of a promoter of interest were used to follow the proliferation of target cells, induction of cell fate and the development of the lateral line system. The induction of cell fate and the development of the lateral line system were followed in real time using a genetic approach.

**INTRODUCTION**

During the last few years, the development of genetic approaches to study gene expression in the lateral line system has been a major topic in the field of developmental biology.

For example, the cells expressing the lacZ reporter gene under the control of a promoter of interest were used to follow the proliferation of target cells, induction of cell fate and the development of the lateral line system. The induction of cell fate and the development of the lateral line system were followed in real time using a genetic approach.

In the future, targeting promoters of interest and GFP expression to specific tissues should allow the detailed localization of the action of various receptor ligands.

New models are now tools for studying gene expression in the lateral line system and the role of hormone receptors in this system.

Cells expressing the lacZ reporter gene under the control of hormones applied in vivo are now available for studying signal transduction and other response factors. They are complementary models to other models that have been developed in our laboratory for several years.

In the future, targeting promoters of interest and GFP expression to specific tissues should allow the detailed localization of the action of various receptor ligands.