

**Thèse présentée  
pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Louis Pasteur – Strasbourg I  
Discipline: Biologie du Développement**

par

**Antoine AGATHON**

soutenue publiquement  
le 25 Juin 2004

**Titre:**

**"Contrôle de la détermination des territoires  
embryonnaires le long de l'axe animal-végétal par  
les voies de signalisation Nodal, BMP et Wnt chez  
l'embryon de poisson zèbre (Danio rerio).**

**MEMBRES DU JURY**

**Pr. Pierre CHAMBON  
Pr. Nicole LE DOUARIN  
Pr. Christof NIEHRS  
Pr. Jean-Marc REICHHART  
Dr. Christine THISSE  
Dr. Bernard THISSE**

**Président du jury  
Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Rapporteur interne  
Directeur de Thèse  
Directeur de Thèse**

## **Remerciements**

*Je voudrais tout d'abord remercier Bernard et Christine pour leur excellent encadrement, leur soutien et leur compréhension tout au long de ma thèse. La liberté et la confiance qu'ils m'ont accordé m'ont permis de prendre du plaisir au cours de ces années.*

*Merci à l'équipe de D.Y.R. Stainier pour notre travail en collaboration sur Casanova.*

*Merci aux membres du jury qui ont examiné ce manuscrit malgré leur emploi du temps chargé.*

*Mon travail de thèse a pu aussi avancer grâce aux conseils techniques et scientifiques de Max. Sa rigueur et sa grande culture scientifique m'ont beaucoup apporté, et je l'en remercie. Bonne route à lui.*

*Grand merci à Vincent qui a partagé ces cinq années de travail. Sa maîtrise et sa grande expérience de toutes les techniques du laboratoire ont été un repère pour moi. Merci aussi à sa bonne humeur et à ses histoires de marqueterie, de plongée ou de Police Nationale.*

*Remerciements chaleureux et sincères à tous ceux qui ont travaillé à l'animalerie: Odile, Abdo, Audrey, Sandrine, Chantal et Dominique. Leur travail et leur aide furent précieux. Ils ont dû supporter nos coups de stress et nos sauts d'humeur. Merci pour leur compréhension.*

*Merci à Aline pour ses sourires et ses encouragements. Merci à Violaine pour ses histoires de frites.*

*Merci à Germgnès pour ses attentions quotidiennes, ses blagues à deux balles et ses yeux de serpent.*

*Merci à Iban pour nos joutes sportives et nos discussions scientifiques. Ses questions (parfois un peu pénibles, mais toujours pertinentes) nous ont permis de passer de bons moments de prise de tête sur la formation de la tête.*

*Merci à Jeanne et Johanne pour leurs encouragements dans la dernière ligne droite. Bonne route à elles.*

*Merci à Jipi pour sa bonne humeur et ses cours d'anglais quotidiens.*

*Pensée aussi à tous ceux avec qui j'ai partagé quelques mois ou quelques années dans le laboratoire : Tania (grande amatrice de musique Alsacienne), Juliette (grande amatrice de Pastaga), Benjamin (grand amateur de film japonais de plus de 2h), Gui-gui (maître estripoux), Sophie (spécialiste du corpuscule de Stainnius), Xiao-Qin (spécialiste de la médecine douce) et Jeannot (DDM Records). Leur présence fut motivante pour aller travailler.*

*Grand merci à ceux qui m'ont aidé directement ou indirectement à réaliser ce travail de thèse: Colette, Maïté, Hélène, Doris, Serge du séquençage, Serge de l'atelier, le service oligos, le service Info, Jean-Luc et Didier, le service photo.*

*Merci à Josiane pour la Fête de la Science, ses conseils et ses relations.*

*Merci aussi à tout ceux dont les conversations régulières aux détours d'un couloir sont toujours agréables: Robert, Pascal, Franck, Djémo, Nadine, Sepand, Anna...*

*Merci aux poissons. Merci surtout à Dudule, qui, une fois, à pondu 256 œufs en cinq minutes, me permettant de finir ma séance d'injection un peu plus tôt que prévu.*

*Enfin, énorme merci à tout mes proches qui m'ont soutenu et encouragé tout le long de ces cinq ans dans les moments difficiles. Merci à Jean-François et Monique pour leurs « après une thèse il y a plein de choses à faire ». Mercix à Delf. Merci à Juju, Miraboule, Isaboule, Bernois, Raibenice, Jean-Robert, Plouc, Alaïne, Clothilde, Romjé, Bast, Nadège, Seb, Pascualitos, Fred et Clemouze. Spécial mercix à Louack.*





## Introduction

<b>I. Diversité du règne animal, évolution et embryologie</b>	<b>1</b>
I.1 Une classification des animaux	1
I.2 L'apparition du concept d'évolution	1
I.3 L'apport de l'embryologie et de la génétique	2
<b>II. L'apparition des <i>Bilateria</i></b>	<b>3</b>
II.1 Feuillet embryonnaire	3
II.2 Axes embryonnaires	4
II.3 Apparition et diversification des <i>Bilateria</i>	4
II.4 Notion d'homologie: De E. Geoffroy St Hilaire à l'embryologie moderne..	6
<b>III De Spemann à Nieuwkoop</b>	<b>7</b>
III.1 Les phénomènes d'induction	7
III.2 Blastopore, greffes et chimères...	8
III.3 Les expériences de Mangold, l'extension du modèle	9
III.4 Etablissement des axes et des feuillets embryonnaires	9
<b>IV Le poisson zèbre, organisme modèle de biologie du développement</b>	<b>11</b>
IV.1 Les intérêts du modèle	11
IV.2 Les principales étapes du développement de l'embryon de poisson zèbre.	12
IV.3 La carte des territoires présomptifs	14
<b>V. Les grandes voies de signalisation utilisées au cours du développement précoce</b>	<b>15</b>
V.1 La signalisation TGF $\beta$ et la mise en place des axes embryonnaires	15
V.2 La signalisation Wnt	19
V.3 La signalisation des MAPK	21
V.4 Autres signalisations	22
<b>VI La détermination des axes embryonnaires chez le poisson zèbre</b>	<b>22</b>
VI.1 Détermination de la face dorsale	22
VI.2 Détermination de la face ventrale	23
VI.3 Mise en place de l'axe animal-végétal	24
VI.4 Mise en place de l'axe antéro-postérieur	25
<b>V. Problématique</b>	<b>26</b>

## PARTIE 1: Contribution des gènes *Atv1* et *Atv2* à la mise en place de l'axe A/V

<b>I. Introduction: identification des protéines Lefty</b>	<b>27</b>
I.1. Un TGF $\beta$ aux caractéristiques particulières	27
I.2. Conservation chez les Chordés	27
I.3. Antagoniste compétitif des TGF $\beta$	28
I.4. Les domaines d'expression des gènes <i>lefty</i>	29
I.5. Rôle des gènes <i>lefty</i> au cours de l'embryogenèse	31

<b>II. Résultats: Contribution des antagonistes Atv1 et Atv2 à la mise en place des feuillets embryonnaires</b>	<b>33</b>
II.1. Les gènes Atv1 et Atv2 sont essentiels pour la détermination de l'endoderme et du mésoderme chez le poisson zèbre.	33
II.2. Les gènes <i>atv1</i> et <i>atv2</i> et la détermination de l'ectoderme	40
<b>III. Discussion</b>	<b>43</b>
III.1 La perte de fonction des gènes <i>atv1</i> et <i>atv2</i> perturbe la gastrulation	43
III.2 Les gènes <i>atv1</i> et <i>atv2</i> et la détermination de l'endoderme et du mésoderme	43
III.3 La signalisation Nodal dans des embryons déficients pour les gènes <i>atv1</i> et <i>atv2</i>	44
III.4 Les effets sur l'ectoderme dans les embryons déficients pour les gènes <i>atv1</i> et <i>atv2</i> .	45
<b>IV. L'inhibition de Nodal par Cerberus</b>	<b>46</b>
IV.1 Le couple Cerberus - Lefty	46
IV.2 Le rôle de l'hypoblaste chez le Poulet	47
<b>V. CONCLUSION</b>	<b>47</b>

<b>PARTIE 2: <i>Casanova</i>, effecteur des Nodal au cours de la différenciation de l'endoderme</b>
---

<b>I. Introduction: Différenciation de l'endoderme chez les Vertébrés : aspects cellulaires et moléculaires</b>	<b>48</b>
I.1 Description embryologique	48
I.2 L'induction précoce de l'endoderme: données moléculaires et génétiques chez le Poisson Zèbre	50
<b>II. Résultats: <i>Casanova</i> médiateur de la signalisation Nodal au cours de la différenciation de l'endoderme</b>	<b>57</b>
II.1 Le gène <i>casanova</i> code pour une protéine de la famille Sox.	57
II.2 <i>Casanova</i> agit en aval de Mixer et Gata5	59
II.3 <i>Casanova</i> est suffisant pour induire un devenir endodermal dans les cellules de la marginales	63
<b>III. Discussion</b>	<b>69</b>
III.1 <i>Casanova</i> , effecteur de la voie Nodal pour la différenciation de l'endoderme	69
III.2 <i>Casanova</i> effecteur de l'endoderme dans les cellules de la marge	73
<b>IV Quelques précisions...</b>	<b>74</b>
IV.1 Un candidat pour le facteur X?	74
IV.2 Le facteur de transcription Pou2	75
IV.3 Ségrégation des cellules de l'endoderme et du mésoderme	77
IV.4 Voie BMP et différenciation de l'endoderme	78
IV.5 Les gènes de spécification de l'endoderme sont conservés entre les invertébrés et les vertébrés	79
<b>V. Conclusion</b>	<b>79</b>

## **PARTIE 3: Identification cellulaire et moléculaire du centre organisateur de la queue chez le poisson zèbre**

<b>I. Introduction</b>	<b>80</b>
I.1 De la gastrulation à la formation du bourgeon caudal	80
I.2 Induction précoce du bourgeon caudal	83
I.3 Deux structures indépendantes	85
I.4 Molécules requises pour la formation du bourgeon caudal	85
<b>II. Résultats: Identification et caractérisation moléculaire de l'organisateur de la queue chez le poisson zèbre</b>	<b>89</b>
II.1 L'organisateur de Spemann ne peut induire de queue ectopique	89
II.2 La marge ventrale et la marge dorsale participent à la formation du bourgeon caudal de manière indépendante	90
II.3 Les cellules de la marge ventrale ont une activité organisatrice de la queue	91
II.4 Caractérisation moléculaire de l'organisateur de la queue	95
II.5 Les contraintes au développement d'une queue secondaire	101
II.6 L'activité de l'organisateur de la queue ne dépend pas de celle de l'organisateur axial de Spemann	103
II.7 Les facteurs BMP, Nodal et Wnt8 forme une boucle de rétro-action positive	103
II.8 Effecteurs de BMP/Nodal/Wnt	107
II.9 Existence d'une activité organisatrice tout autour de la marge	109
<b>III. DISCUSSION</b>	<b>113</b>
III.1 Rôle de l'organisateur de Spemann chez le poisson zèbre	113
III.2 Identification de l'organisateur de la queue	113
III.3 Nature moléculaire de l'organisateur de la queue	117
III.4 Une activité organisatrice tout autour de la marge	120
<b>IV. Conservation des mécanismes de différenciation postérieure et croissance de la queue</b>	<b>123</b>
IV.1 Activités organisatrices au sein du bourgeon caudal	123
IV.2 Les gènes à identité postérieure	123
IV.3 Conservation des signaux TGFβ-Wnt chez les Vertébrés	124
IV.4 Le couple Wnt-Notch	124
IV.5 Le rôle de BMP Nodal et Wnt chez l'oursin	124
<b>V. Conclusion</b>	<b>125</b>

## Discussion

<b>I. Coordonnées spatiales des cellules au sein de l'embryon en début de gastrulation</b>	<b>126</b>
I.1 Indépendance des axes dorso-ventral et animal-végétal	126
I.2 Les cellules les plus végétales ont un niveau de signalisation Nodal élevé	128
I.3 Détermination des cellules de la marge par intégration des voies de signalisation BMP, Nodal et Wnt8	129
<b>II. L'apparition des <i>Bilateria</i>: développement de nouvelles interactions?</b>	<b>130</b>
II.1 Les cnidaires, "des <i>bilateria</i> en attente"?	130
II.2 Quels mécanismes pour la radiation des <i>Bilateria</i> ?	133
 <b>Matériel et Méthodes</b>	 <b>135</b>
 <b>Bibliographie</b>	 <b>142</b>

**Annexe 1: Les stades du développement embryonnaire du poisson zèbre**

**Annexe 2: Gènes utilisés: abréviations, mutants et références**

**Annexe 3: Abréviations**

**Annexe 4: Publications 1**

**Annexe 5: Publication 2**

**Annexe 6: Publication 3**



*Buffalo Débile*  
*(Les Ogres de Barback)*

*En passant par le égouts  
Juste devant ma maison  
J'ai creusé un tunnel  
De dix huit mètres de long  
J'ai atterri dans la cave  
D'une laiterie parisienne  
J'ai pris trois cents carambars  
Un kilo de madeleine  
J'ai eu des crampes d'estomac  
Au moins pendant trois semaine  
J'suis le roi des casseurs,  
j'suis le roi des braqueurs  
Les journaux parlent pas de moi,  
et c'est ça.....qui m'écœurent*

*J'ai volé une voiture  
Qui n'était même pas à moi  
J'voulais allé sur la côte  
J'me suis r'trouvé sur le toit  
Les quartes roues en l'air,  
Mon père m'a engueulé  
Comme si c'était sa bagnole  
Que j'y avais bousillé  
D'ailleurs c'était la sienne  
J' pouvais pas l'deviner  
J'suis le roi des voyous,  
j'suis le roi des filous  
Les journaux parlent pas de moi,  
Mais alors pas du tout*

*Avec un de mes copains  
On a voulu détourner  
Un boïng sept cent sept....  
On en n'a pas trouvé.....  
A la porte d'Orléan  
Ils veulent pas s'arrêter  
On est mal desservi dans c'quartier  
Non de non !  
Alors j'ai détourné la conversation  
J'suis le roi des pirates de l'air  
conditionné  
Les journaux parlent pas de moi  
Mais ça pas tarder*

*Un peu plus tard j'ai fais  
Le hold-up du siècle  
A grands coups de burin  
J'ai cassé un parcmètre  
L'aubergine intrépide  
Elle a voulu s'y opposer  
J'ai dis des mots obscènes  
Elle s'est mise à pleurer  
Y' avait qu'deux francs cinquante  
Dans la caisse fracturée  
J'suis le roi des casseurs,  
j'suis le roi des braqueurs  
Vous pouvez le constater  
J' l' ai déjà dit tout à l'heure.....  
Si je continue à faire  
Des chansons dans ce genre là  
C'est pas demain la veille  
Qu'les journaux parleront d'moi....  
Ni haine, ni armes, ni violence.....*

# INTRODUCTION

## I. Diversité du règne animal, évolution et embryologie

### I.1 Une classification des animaux

Des trois règnes eucaryotes (champignons, plantes, animaux), le règne animal est celui qui comporte le plus d'espèces. Les plans d'organisation sont extrêmement variés donnant des formes allant des plus simples aux plus complexes. La classification animale est une illustration de cette diversité. Elle s'attache à recenser et à regrouper par caractères partagés les différentes espèces.

C'est Linné (1707-1778) qui a établi le système de classification binomiale (genre - espèce) que l'on utilise encore aujourd'hui (*Systema Naturae* - 1736). Bien que la place de certaines espèces ou même de Familles entières aient été modifiées de nombreuses fois, le principe reste le même. Les critères de classification sont d'abord anatomiques mais aussi physiologiques, embryologiques ou génétiques.

### I.2 L'apparition du concept d'évolution

Jusqu'à la publication de *L'Origine des Espèces* de Darwin, aucune théorie de l'évolution n'avait été formulée. Cependant, plusieurs naturalistes avaient pressenti que les espèces animales ne pouvaient avoir été créées indépendamment les unes des autres. J.B. Lamarck (1744-1829), E. Geoffroy St Hilaire (1772-1844), G. Cuvier (1769-1832) ou C. Lyell (1797-1875) sont quelques noms des principaux contributeurs de ce courant de pensée du début du XIXe siècle. Ces intuitions étaient notamment fondées sur l'observation des données paléontologiques indiquant que certaines espèces animales avaient disparu et que les espèces recensées aujourd'hui n'étaient pas apparues toutes en même temps.

En 1859, Charles Darwin publie *L'Origine des Espèces* qui formalise pour la première fois une théorie de l'évolution. Darwin postule que les espèces changent constamment d'une génération à l'autre et que seuls les individus les mieux adaptés au milieu sont sélectionnés.

Même si les principes de la sélection naturelle exposés dans cette théorie sont encore controversés, l'évidence de l'évolution des animaux, l'apparition et l'extinction des espèces sont des concepts généralement acceptés.

### **I.3 L'apport de l'embryologie et de la génétique**

Pour expliquer les mécanismes d'évolution des espèces, trois courants de pensée existent ou ont existé. Le premier, dont le chef de file a été G. Cuvier, postule que l'apparition de nouvelles espèces s'est faite par "sauts" brutaux, à la suite de bouleversements (biologique, climatiques, ... ). Cette vision saltatoire de l'évolution est basée essentiellement sur des données fossiles. En effet, d'une strate à l'autre, certaines formes disparaissent alors que d'autres apparaissent. Cette théorie a été largement développée par l'embryologiste autrichien R. Goldschmidt dans les années 1940. C. Lyell, géologue de formation, est à l'origine d'une hypothèse plus progressive. Pour lui, ces "sauts" observés dans les strates géologiques correspondent en réalité à des lacunes de sédimentation. En effet, au cours des temps géologiques certaines zones ont été successivement immergées et émergées, en fonction de la hauteur des mers, ce qui a conduit à une discontinuité dans les épisodes de sédimentation. Ce courant d'uniformitarisme, ou néodarwinisme, considère que les espèces animales se sont modifiées lentement au cours des temps géologiques, et qu'il n'est pas nécessaire de recourir à des "crises" pour expliquer la diversité des formes actuelles.

Le courant actuel majoritaire au sein de la communauté scientifique, se situe entre les deux précédents et postule que l'apparition des espèces animales s'est faite graduellement en passant par des phases de bouleversement majeur (Conway-Morris, 2003). C'est l'essor de l'embryologie moderne et de la génétique qui ont permis d'apporter des arguments pour étayer cette théorie.

Avant les années 70, même si l'ADN et les gènes avaient été identifiés et reconnus comme supports de l'hérédité, leur rôle au cours du développement embryonnaire n'avait pas été clairement démontré. Génétique et embryologie étaient considérées pour beaucoup comme deux sciences distinctes. C'est avec l'analyse de mutants homéotiques chez la Drosophile, identifiés initialement par Bateson en 1894, que E. Lewis, E. Wieschaus et C. Nüsslein-Volhard ont montré que certains gènes pouvaient contrôler le développement embryonnaire (Lewis, 1978; Nüsslein-Volhard et Wieschaus, 1980). Une seule mutation dans un gène de la Drosophile pouvait entraîner des modifications aussi drastiques que l'apparition d'une deuxième paire d'aile ou que la transformation des antennes en pattes. C'était la première fois qu'un lien clair entre développement embryonnaire et gènes avait été établi. Depuis, les analyses génétiques en embryologie se sont généralisées et ont permis de mieux comprendre les mécanismes qui gouvernent le développement des embryons. Aujourd'hui, on peut

facilement concevoir comment des mutations dans des gènes impliqués dans le développement embryonnaire ont permis l'apparition de nouvelles formes, graduellement ou par "sauts" (comme les mutations homéotiques).

## **II. L'apparition des *Bilateria***

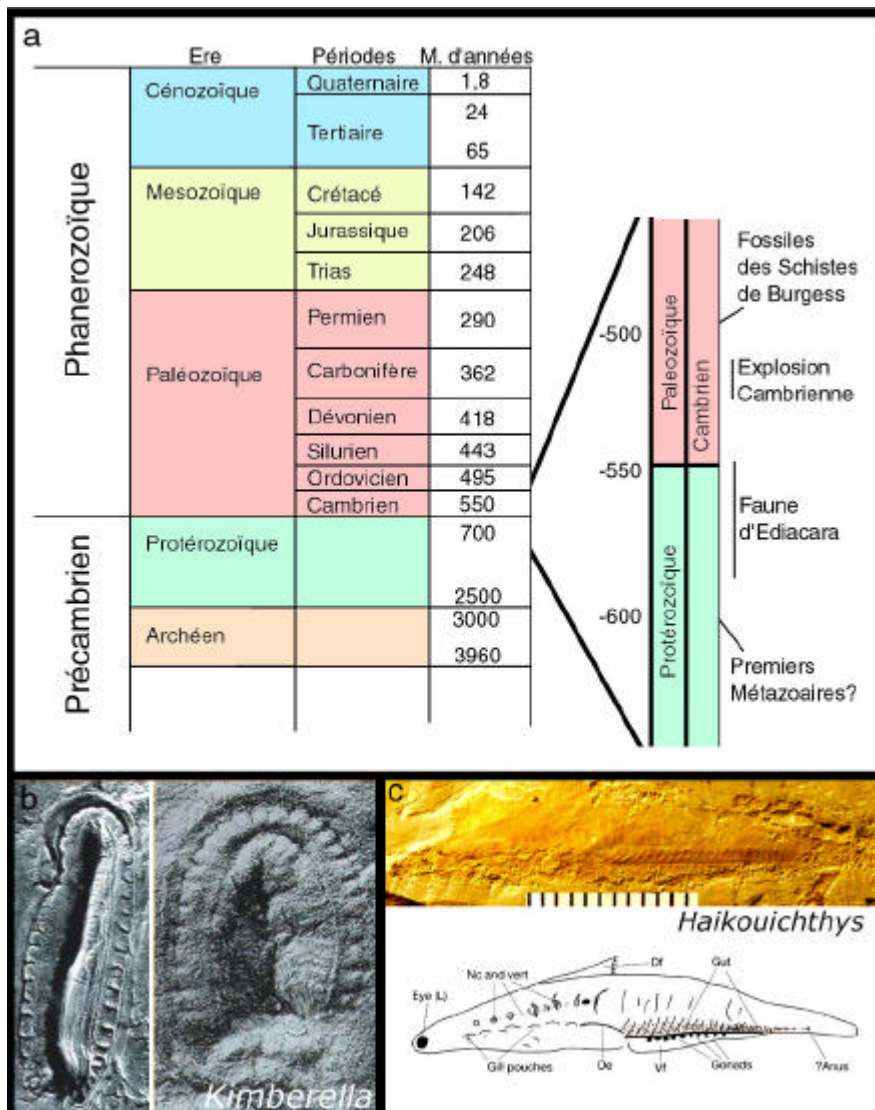
### **II.1 Feuilletts embryonnaires**

Les organismes pluricellulaires sont composés de différents types de cellules spécialisées dans la réalisation d'une fonction précise. Un organisme est considéré d'autant plus complexe qu'il possède de spécialisations. Ces groupes de cellules différenciées sont appelés tissus. Chez les animaux, il en existe quatre grands types: le tissu épithélial, le tissu conjonctif au sens large, le tissu musculaire et le tissu nerveux. Le tissu conjonctif, qui est défini comme un tissu de cellules non-jointives, comprend le tissu conjonctif au sens strict, le tissu sanguin et le tissu osseux. Ces tissus adultes dérivent de tissus primaires, appelés feuilletts embryonnaires (ou germinatifs). Ils se forment précocement au cours de la vie embryonnaire, lors de la gastrulation.

Chez les animaux diblastiques (Spongiaires, Cnidaires et Cténaïres), l'embryon ne possède que deux feuilletts: l'ectoderme et l'endoderme. L'ectoderme correspond à l'enveloppe extérieure de l'embryon. Il va se différencier en tissu épithélial de surface ainsi qu'en système nerveux. L'endoderme tapisse les cavités internes de l'embryon et se spécialise notamment dans la digestion. Les animaux triblastiques possèdent un troisième feuillet, le mésoderme, qui s'insère entre l'ectoderme et l'endoderme. Il est à l'origine de la plupart des organes des triblastiques puisqu'il va former les tissus conjonctifs et musculaires.

À l'échelle du règne animal, l'apparition du mésoderme s'est accompagnée d'une augmentation de la taille des individus ainsi que de l'utilisation d'un tube digestif à deux ouvertures et de la complexification des systèmes respiratoires et nerveux. L'apparition du mésoderme au cours de l'évolution des animaux est donc une innovation qui a permis la diversification des plans d'organisation ainsi que l'élaboration de nombreuses fonctions complexes.

L'étude de la formation des feuilletts embryonnaires en biologie du développement revêt donc deux dimensions: la découverte des mécanismes fondamentaux conduisant à l'établissement



### **Intro - Figure 1: Explosion cambrienne et diversification des triblastiques**

Comme en témoigne plusieurs spécimens de fossiles, l'apparition des premiers organismes triblastiques date de l'ère néoprotérozoïque (a et b). Cependant la date d'apparition des premiers organismes triblastiques reste controversée. Toutefois il est admis que les organismes triblastiques se sont diversifiés pendant l'explosion cambrienne (a). La plupart des embranchements triblastiques connus aujourd'hui, même des chordés (c), étaient déjà présents à cette époque. Spécimens fossiles: *Kimberella*: animal appartenant probablement aux premières formes de mollusque: *Haikouichthys*: agnathe de type Lamproie.

d'un individu et l'analyse d'un phénomène qui a joué un rôle majeur au cours de l'évolution des espèces animales (Technau et Scholz, 2003).

## **II.2 Axes embryonnaires**

L'observation des animaux diblastiques révèle qu'ils sont généralement organisés selon une symétrie radiale (à l'exception des Spongiaires qui ne possèdent pas d'axe de symétrie particulier), alors que la majorité des triblastiques possède un plan de symétrie droite-gauche. Classiquement, on utilisait le terme de *Radiata* pour les diblastiques et de *Bilateria* pour les triblastiques (Martindale et al, 2002). Ainsi l'apparition du mésoderme peut être reliée à l'apparition de nouveaux plans de symétrie.

Au cours de la vie embryonnaire des *Bilateria*, trois grands plans, ou axes de symétrie sont définis: l'axe droite - gauche (D/G), l'axe antéro-postérieur (A/P) et l'axe dorso-ventral (D/V). Ces axes embryonnaires ne correspondent pas toujours à ceux qui sont observés chez l'adulte. Par exemple, l'embryon et la larve d'oursin possèdent typiquement le plan d'organisation d'un *Bilateria* avec trois axes clairement définis. Cependant, l'adulte après métamorphose possède une symétrie radiaire.

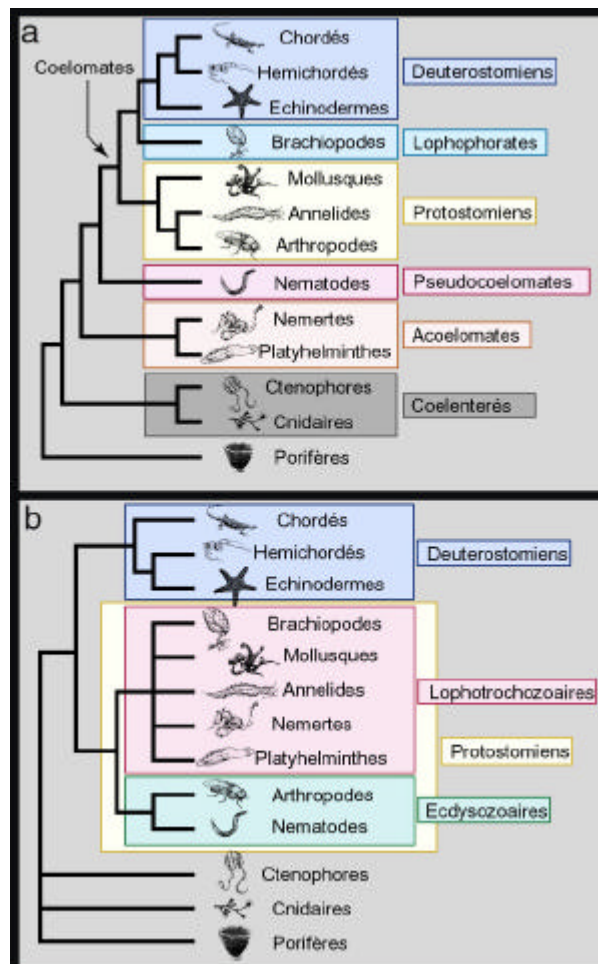
De même que pour la mise en place des feuilletts germinatifs, l'étude de la détermination des axes embryonnaires permet de proposer des hypothèses quant à l'évolution des espèces animales.

## **II.3 Apparition et diversification des *Bilateria***

Des données récentes en matière de paléontologie, de phylogénie et d'embryologie ont permis de préciser l'apparition des triblastiques.

### **II.3.a L'explosion cambrienne**

Les données fossiles importantes les plus anciennes sont regroupées sous le nom de faune d'Ediacara. Ces gisements fossilifères ont été datés entre -650 et -600 millions d'années, durant l'ère protérozoïque (Fig.1a). Même si les animaux n'ont laissé que des empreintes, il est clair que plusieurs espèces diblastiques existaient déjà (petite taille et symétrie radiaire). Certaines spécialistes pensent que certaines formes de *Bilateria* y sont fossilisées (Fig.1b) ; ces interprétations restant largement controversées (Knoll et Carroll, 1999; Valentine et al, 1999).



### **Intro - Figure 2: La nouvelle classification des triblastiques**

Précédemment, les métazoaires étaient classés en de nombreux embranchements. Les triblastiques étaient divisés en acœlomates, pseudocœlomates et cœlomates, eux-mêmes divisés en protostomiens et deutérostomiens (a). Des données moléculaires ont permis de revoir cette phylogénie. Les triblastiques sont maintenant divisés simplement en protostomiens et deutérostomiens (b).

La diversité animale n'est réellement observée qu'à partir de fossiles datant du Cambrien (-590 à -530 Millions d'années). Les spécimens observés sur différents sites montrent que la plupart des embranchements animaux, dont celui des Chordés (incluant les Vertébrés, Fig.1c), sont présents (Chen *et al*, 1999; Knoll et Carroll, 1999 ; Chen *et al*, 2003 ; Shu *et al*, 2003). Trois gisements fossiles remarquablement conservés ont été décrits, notamment celui des schistes de Burgess au Canada, largement présentés et détaillés au grand public par S.J. Gould. Il a même été retrouvé de nombreuses formes animales originales n'ayant pas d'équivalent actuel. La faune cambrienne était très riche.

La période entre les gisements des faunes d'Ediacara et ceux du Cambrien est estimée entre 10 et 15 millions d'années, ce qui, à l'échelle des temps géologiques, est court. C'est pourquoi on parle d'explosion cambrienne pour qualifier la prolifération de la vie à cette époque (une explosion durant quelques millions d'années...). Il est supposé que les quelques individus vermiformes repérés dans les faunes d'Ediacara sont à l'origine des espèces observées dans les fossiles du Cambrien. Ces "proto-triblastiques" pourraient être les ancêtres communs à l'ensemble des animaux triblastiques actuels (Knoll et Carroll, 1999; Valentine *et al*, 1999).

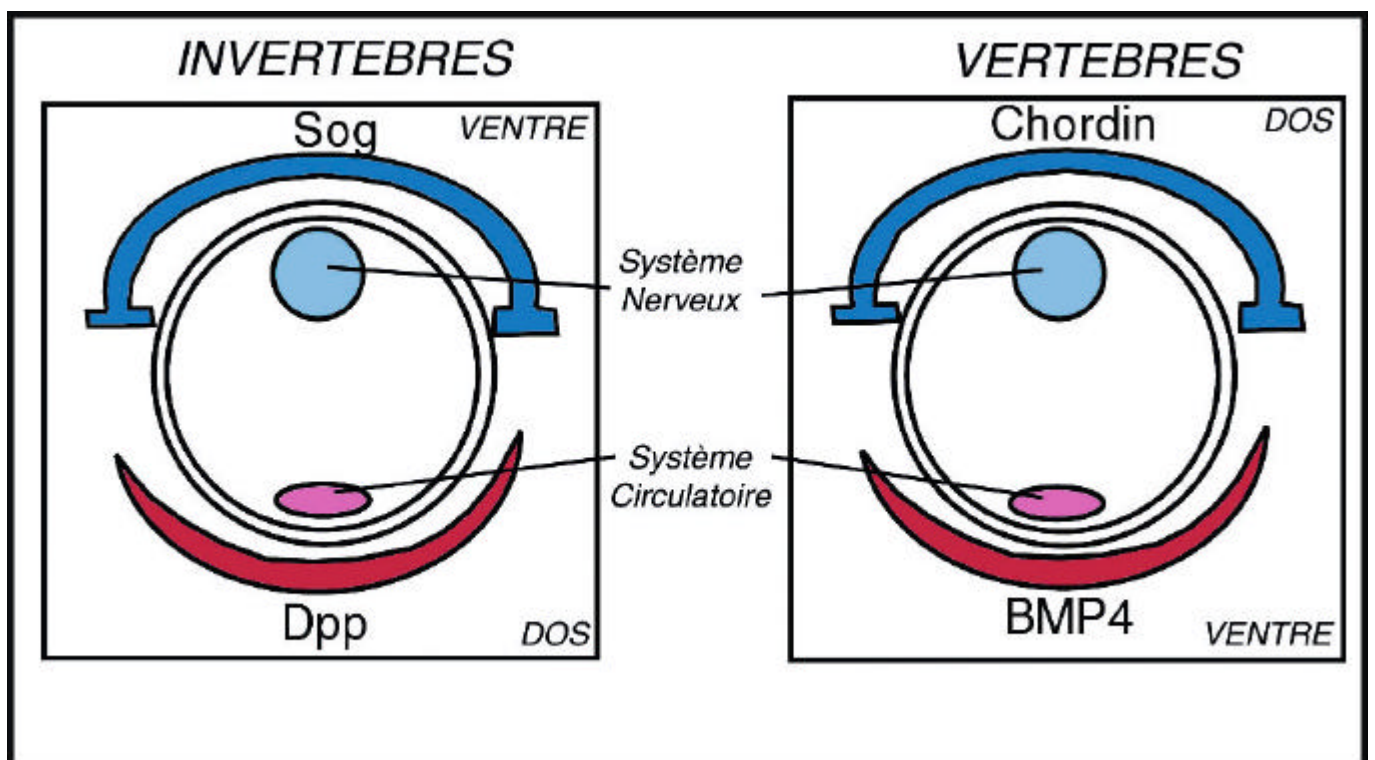
De ces données paléontologiques, nous pouvons donc retenir que la diversification des formes animales triblastiques date du Cambrien. Cette période ne constitue pas l'apparition des formes animales mais plutôt leur diversification. Nous pouvons donc supposer que l'utilisation du mésoderme est un des "outils" de diversification des formes observées à cette époque (Technau et Scholz, 2003).

### **II.3.b L'apport de la phylogénie moléculaire**

La phylogénie moléculaire consiste en la comparaison des séquences de gènes de plusieurs espèces en vue d'établir leurs "relations de parenté" au cours de l'évolution. Cette approche permet aussi de dater approximativement les divergences entre les différents embranchements. Les gènes choisis pour établir les arbres phylogénétiques sont considérés comme ayant un taux d'évolution lent. Les données issues de telles études ont permis de revoir la phylogénie des métazoaires.

Classiquement, les *Bilateria* étaient divisés en acéelomates, pseudocéelomates et céelomates, en fonction de la présence ou non d'une cavité céelomique au sein du mésoderme. Les céelomates étaient composés des deutérostomiens (dont les chordés) et des protostomiens (arthropodes, mollusques) (Fig.2a). Ainsi, des structures embryonnaires ou des processus développementaux conservés entre la mouche et la souris indiquaient qu'ils étaient déjà présents chez l'ancêtre commun aux protostomiens et deutérostomiens. Cependant, plusieurs





**Intro - Figure 3: L'intuition de E. Geoffroy St Hilaire**

Représentations schématiques en coupes transversales d'un organisme invertébré et vertébré. Chez les invertébrés, le côté dorsal, où se situe le système circulatoire, est déterminé par le ligand Dpp dont l'activité est inhibée ventralement par l'antagoniste Sog. Chez les vertébrés, le côté ventral, où se situe le système circulatoire, est déterminé par les BMP, molécules homologue de Dpp. Leur action est inhibée par l'antagoniste Chordin, homologue de Sog.

études indépendantes de phylogénie moléculaire fondées sur l'analyse des gènes codant pour les ARN18s et pour des facteurs Hox ont montré que les *Bilateria* formaient un groupe homogène (groupe monophylétique) qui se divise en trois ensembles: les deutérostomiens, les lophotrochozoaires (annélides et mollusques) et les ecdysozoaires (arthropodes et nématodes) (Fig.2b; Adoutte et al, 1999; Erwin et Davidson, 2002). Cette phylogénie est aujourd'hui communément admise. Cette nouvelle manière d'envisager la phylogénie des *Bilateria* implique que les caractères partagés aux deutérostomiens et protostomiens étaient déjà présents chez l'ancêtre des *Bilateria*.

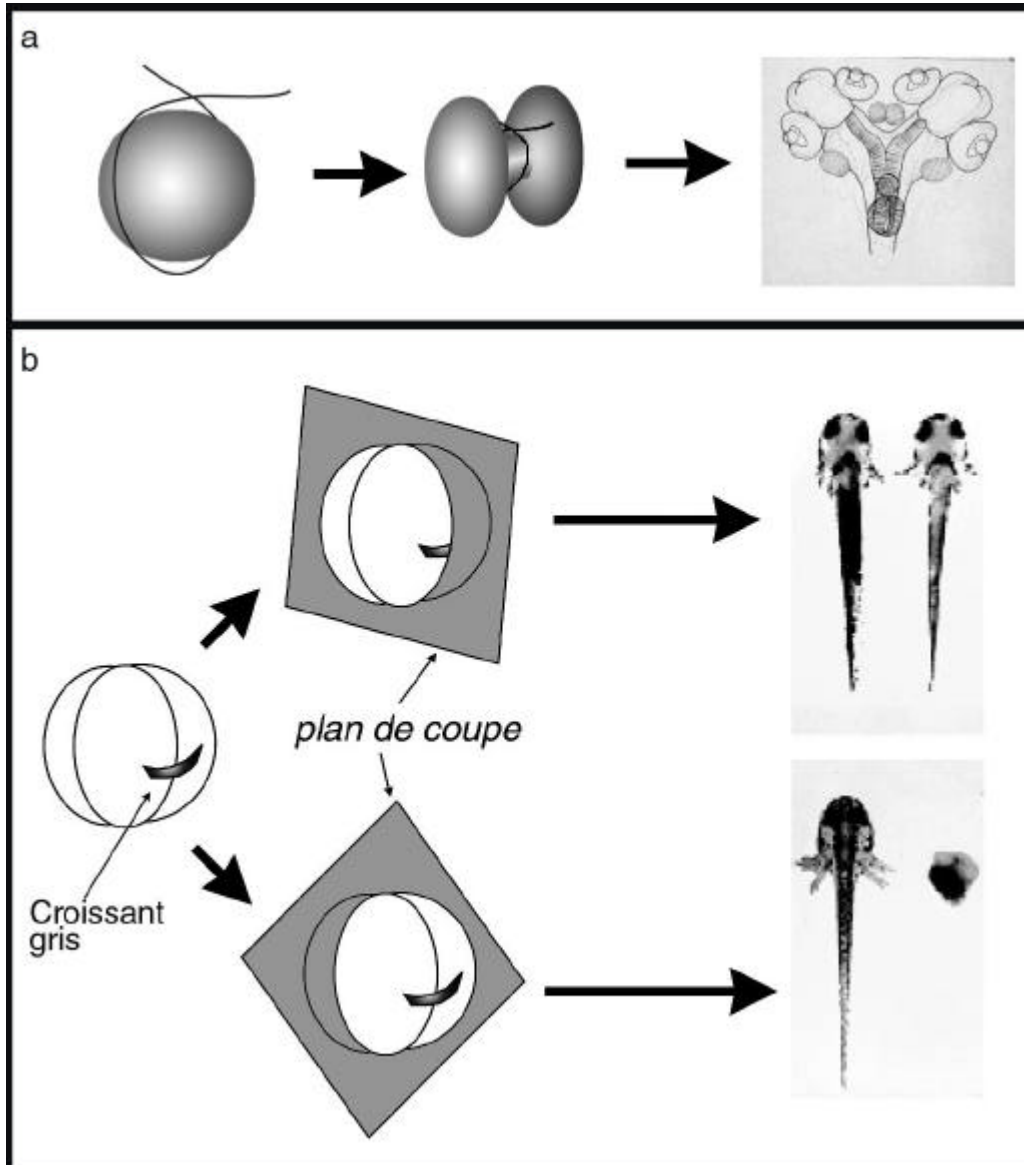
En conséquence la comparaison des mécanismes qui contrôlent la différenciation du mésoderme et la mise en place des axes embryonnaires entre les protostomiens et les deutérostomiens revêt une toute autre importance car elle renseigne sur l'apparition des triblastiques au cours de l'évolution.

#### **II.4 Notion d'homologie: De E. Geoffroy St Hilaire à l'embryologie moderne**

Ces analyses comparatives entre deutérostomiens et protostomiens utilise le concept fondamental d'homologie introduit par E. Geoffroy St Hilaire (1772-1844).

Par l'observation de nombreux spécimens, Geoffroy St Hilaire a montré que le plan d'organisation interne des invertébrés était très similaire à celui des vertébrés, à la différence près que les invertébrés ont un axe dorso-ventral inversé par rapport à celui des vertébrés. Alors que le homard possède une corde nerveuse ventrale, les vertébrés ont un tube neural dorsal. Un homard marcherait-il sur le dos? Pour Geoffroy St Hilaire, ce fait n'est pas le fruit du hasard; les plans d'organisation n'ont pas convergé vers une forme commune, ils ont dérivés à partir d'une même forme initiale. C'est par cette constatation que Geoffroy St Hilaire a introduit la notion d'homologie, sans réellement nommer ce terme. Deux structures sont dites homologues si elles dérivent d'une même structure ancestrale. Cela est à opposer à l'analogie, qui définit deux structures accomplissant la même fonction, mais étant apparues indépendamment l'une de l'autre.

L'intuition de Geoffroy St Hilaire n'a été confirmée que récemment grâce aux avancées de l'embryologie et de la biologie moléculaire (De Robertis et Sasai, 1996). Chez la *Drosophile* la détermination du côté dorsal est sous le contrôle de Dpp (decapentaplegic), facteur de croissance de la voie des TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ). Son activité est inhibée ventralement par un antagoniste sécrété, Sog (short gastrulation) (Fig.3).



#### **Intro - Figure 4: Les expériences préliminaires**

H. Spemann a montré que la séparation non complète d'un embryon d'amphibien au stade un cellule à l'aide d'un cheveu conduit à la formation de siamois (a). Si la séparation est complète, deux cas sont possibles. Si le plan de coupe passe par le croissant gris, alors deux embryons peuvent se former (b en haut). Si le plan de coupe est perpendiculaire au croissant gris, alors seule la partie possédant la croissant gris se développe en un embryon normal. L'autre moitié reste à l'état indifférencié (b en bas).

Chez le Xénope, les BMPs (Bone Morphogenetic Protein), appartenant aussi à la superfamille des TGF $\beta$ , sont responsables de la détermination ventrale de la gastrula. Du côté dorsal, leur action est inhibée par des antagonistes sécrétés du type Chordin ou Noggin (Fig.3).

La comparaison des séquences protéiques montre que Dpp et BMP4 sont homologues ainsi que Chordin et Sog. Le même couple ligand - antagoniste intervient donc dans la mise en place de l'axe dorso-ventral chez un vertébré et un invertébré, à la différence près que leurs polarités finales sont inversées. L'intuition de E. Geoffroy St Hilaire était donc exacte au niveau moléculaire.

*De cette observation, il est donc possible de déduire que l'ancêtre commun aux Bilateria possédait un système de détermination de l'axe dorso-ventral de type BMP/Dpp - Chd/Sog (De Robertis et Sasai, 1996). De nombreux autres exemples d'homologies pourraient être cités à la lumière des découvertes récentes.*

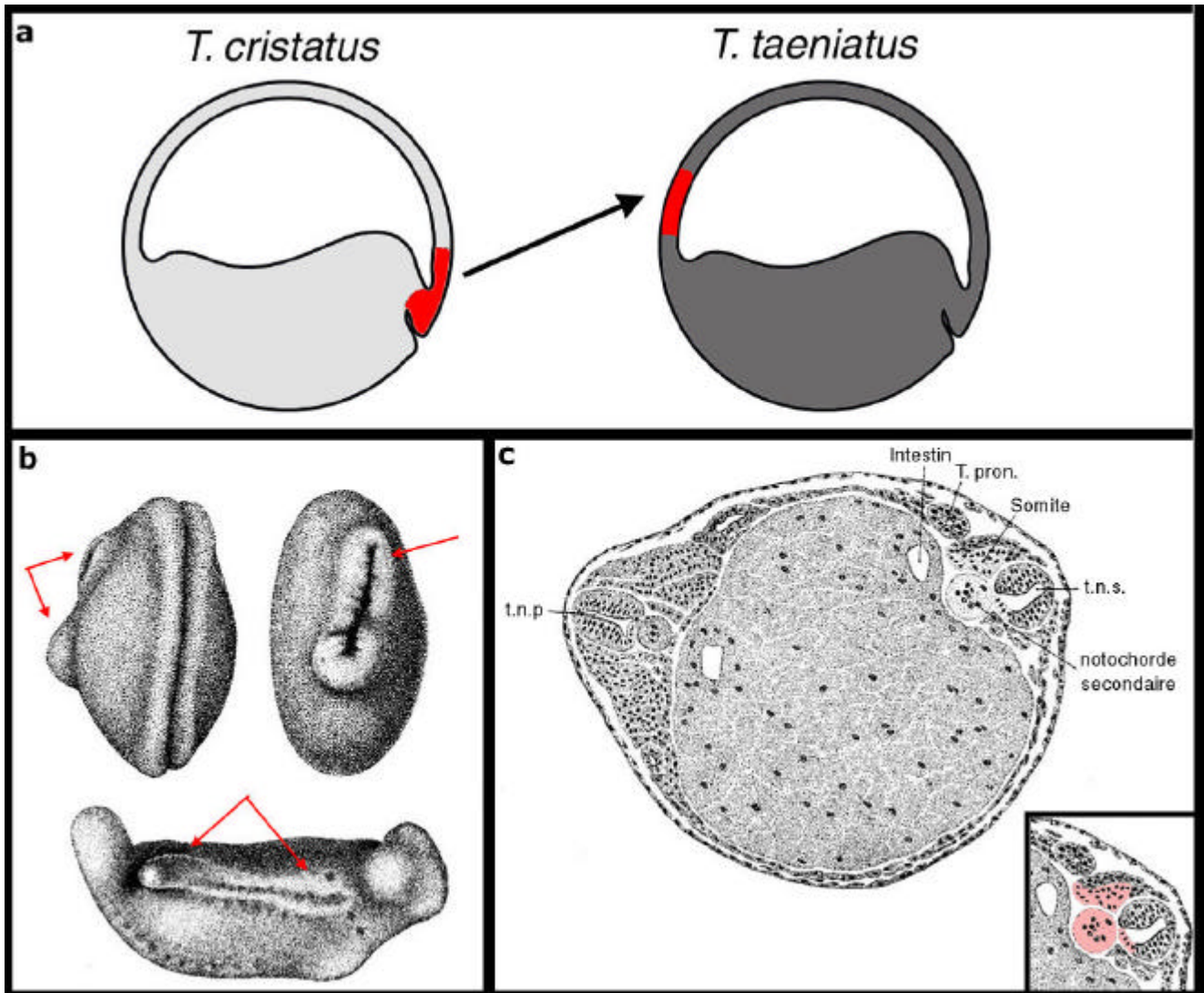
### **III De Spemann à Nieuwkoop**

Comme nous l'avons évoqué, l'étude des mécanismes contrôlant la mise en place des axes et des feuilletts embryonnaires chez les triblastiques est une problématique centrale en embryologie. Les travaux de Hans Spemann au début du siècle sur les amphibiens ont contribué de manière fondamentale à la compréhension de ces phénomènes. Ils ont révolutionné la manière d'étudier le développement des embryons en introduisant les concepts d'induction et de centre organisateur (Sander et Faessler, 2001).

#### **III.1 Les phénomènes d'induction**

Les travaux de Spemann ont commencé à être connus après l'étude des phénomènes inductifs conduisant à la formation du cristallin chez les amphibiens. Par des expériences de transplantation de vésicules optiques entre deux espèces d'amphibien, il répertoriait les phénomènes d'induction de cristallin dans différents contextes.

Mais l'originalité de son approche vint plus tard alors qu'il obtint des embryons présentant des duplications d'axe (Sander et Faessler, 2001). En effet, à l'aide de cheveux de sa fille, il réalisa des ligatures pour séparer de jeunes embryons (stade de segmentation) en deux (Fig.4). Si la séparation du zygote était incomplète, de manière à laisser une fine connexion entre les deux moitiés, il observait de manière fréquente, des duplications de tête (Fig.4a). Lorsque la



### Intro - Figure 5: La lèvre dorsale du blastopore...

H. Spemann et H. Mangold ont prélevé la lèvre dorsale du blastopore d'un embryon de *T. cristatus*, qui possède des cellules claires, pour la greffer dans la zone marginale ventrale d'un embryon receveur *T. taeniatus*, qui possède des cellules foncées (a). Au stade neurula, les auteurs ont remarqué que les embryons receveurs développent un deuxième tube neural (b, flèches). L'observation en coupe transversale indique que les cellules du greffon (cellules claires et colorées en rouge dans l'agrandissement) ont formé une notochorde secondaire ainsi que la partie ventrale du tube neurale et quelques cellules somitiques (c). Autour de cette notochorde se sont formés un tube neural, des tubes pronephriques, une cavité intestinale et des somites (c). Abréviations: t.n.p. et t.n.s.= tube neural primaire et secondaire; T.pron.= tube pronephrique. Figure adaptée de Spemann, 1924.

séparation était complète, deux cas étaient possibles. Si le plan de division passait par le croissant gris (futur emplacement de la lèvre dorsale du blastopore), alors deux individus identiques se développaient (Fig.4b). Par contre, si le plan coupait l'œuf parallèlement au croissant gris, un seul embryon se développait (celui contenant le croissant gris), l'autre fragment restant à l'état de boule de cellules indifférenciées (Fig.4b).

Ces expériences préliminaires ont montré que: (1) certains tissus pouvaient influencer le développement d'un autre tissu (phénomène d'induction); (2) la région dorsale de l'embryon (moitié contenant le croissant gris) était nécessaire et suffisante pour permettre le développement d'un embryon complet.

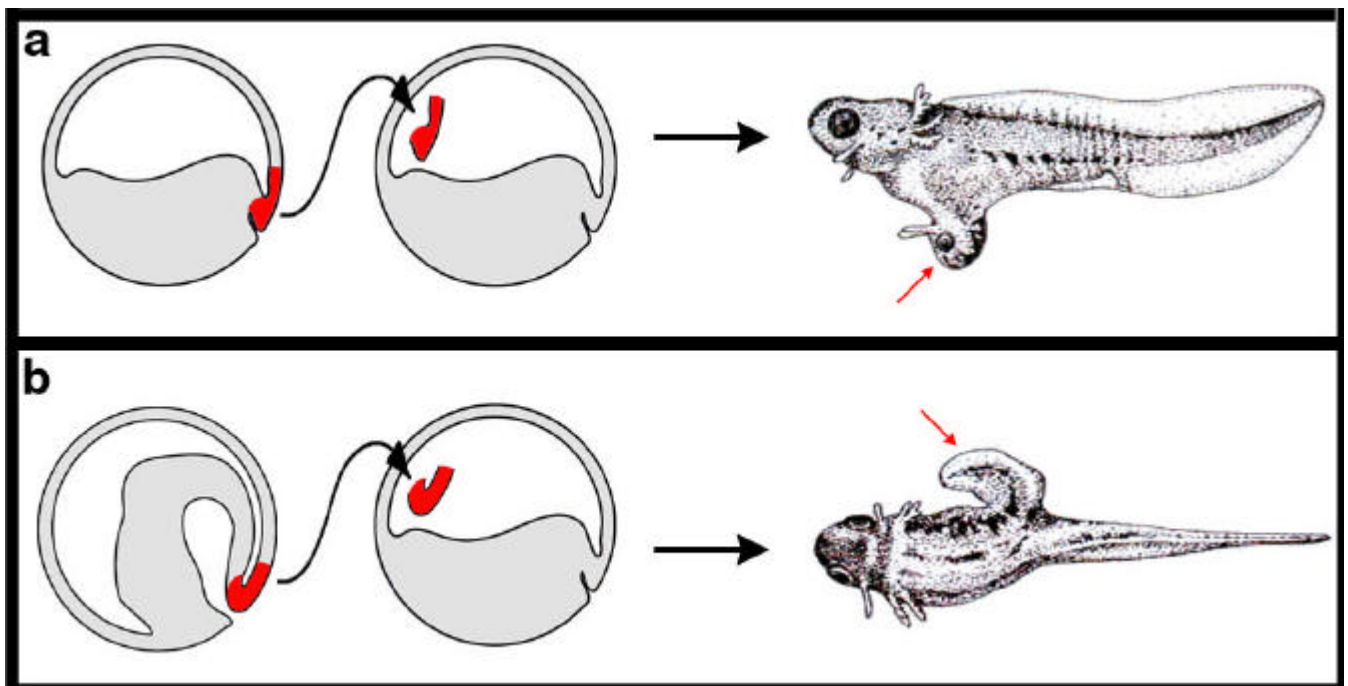
### **III.2 Blastopore, greffe et chimères...**

Lors d'expériences de transplantations, il est essentiel d'analyser l'origine des cellules du donneur et celles de l'hôte. Pour cela, Spemann a utilisé deux espèces de Salamandre, *Triturus taeniatus* et *Triturus cristatus*, dont les cellules diffèrent par leur pigmentation. Après avoir analysé la compatibilité entre tissus provenant des deux espèces, Spemann a commencé des expériences de greffe de lèvre dorsale du blastopore (Fig.5). Chez les amphibiens, ce tissu est à l'origine des cellules du mésoderme axial.

C'est Hilde Mangold, qui réalisa pendant sa thèse l'ensemble des expériences dont le concept d'organisateur est issu. La manipulation consistait à prélever la lèvre dorsale du blastopore d'un embryon de *T. cristatus* en blastula pour la greffer vers la face ventrale d'un embryon de *T. taeniatus*, au même stade (Fig.5a). Sur 274 animaux transplantés, seuls 41 ont survécu. 29 embryons ont développé un tube neural secondaire (dont 13 avec des somites). Les observations histologiques montrèrent sans équivoques que les cellules du donneurs se différenciaient en notochorde et tube neural ventral (quelques fois en somites), alors que les autres structures (comme le tube neural et les somites) se développaient à partir de cellules de l'hôte (Fig.5b,c; Spemann et Mangold, 1924, 2001).

De cette observation Spemann et Mangold en ont conclu que la lèvre dorsale du blastopore est capable d'induire un deuxième axe ectopique en recrutant des cellules de l'hôte qui ne sont pas déterminées pour ce destin cellulaire. Dans l'article publié en 1924 qui présente ces expériences, ils définissent la lèvre dorsale du blastopore comme centre organisateur.

L'équivalent du centre organisateur de Spemann a été identifié chez tous les organismes modèles de vertébrés (Gerhart, 2001).



**Intro - Figure 6: Les expériences de O. Mangold**

La greffe de la lèvre dorsale du blastopore d'un embryon en début de gastrulation dans le blastocœle d'un embryon en fin de stade blastula induit une tête secondaire (a). La greffe de la lèvre dorsale du blastopore d'un embryon en fin de gastrulation dans le blastocœle d'un embryon en fin de stade blastula induit une queue secondaire (b).

### **III.3 Les expériences de Mangold, l'extension du modèle**

En 1933, Otto Mangold publia une série d'expérience qui élargit de manière considérable l'importance du centre organisateur de Spemann lors de la mise en place des axes embryonnaires (Mangold, 1933).

Sur le même principe que les expériences précédentes, il examina la capacité organisatrice de la lèvre dorsale du blastopore prélevée à différents moments de la gastrulation (Fig.6). Il remarqua que la transplantation de la lèvre dorsale d'une jeune gastrula induisait une duplication des parties les plus antérieures (tête), alors que la même expérience réalisée avec des embryons en fin de gastrulation duplique les structures postérieures de l'embryon (Fig.6). Ces résultats indiquent donc que l'organisateur de Spemann est actif tout au long de la gastrulation et qu'en plus que déterminer le côté dorsal des embryons, il contrôle la régionalisation A/P. En conséquence, il semble que ce groupe de cellules est requis pour la détermination de tout l'axe embryonnaire.

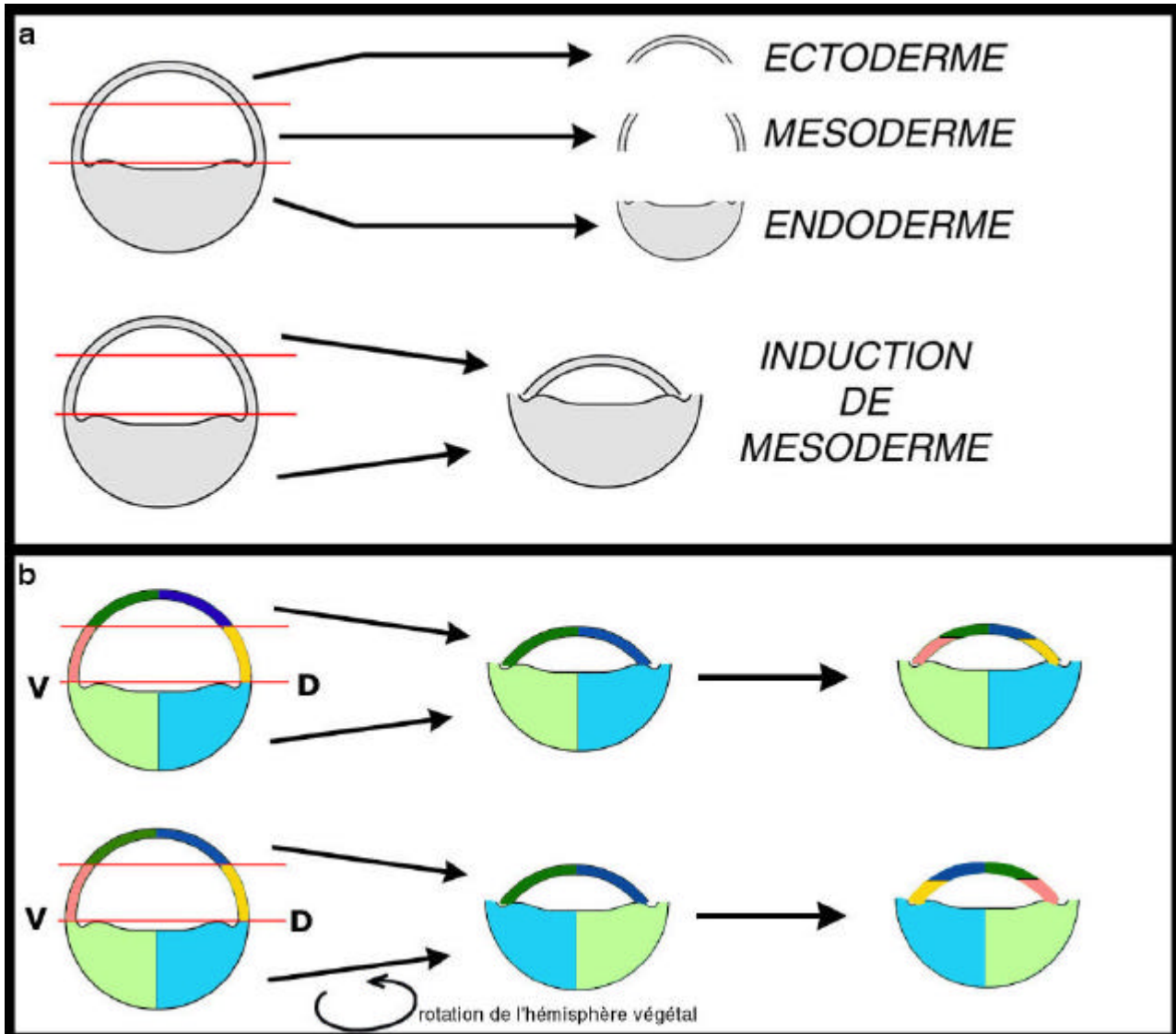
### **III.4 L'établissement des axes et des feuilletts embryonnaires**

Sur la base de ces résultats, les travaux de P. Nieuwkoop chez les amphibiens ont permis de mieux cerner le rôle du centre organisateur de Spemann au cours de l'embryogenèse. Nieuwkoop a proposé un modèle, toujours largement utilisé actuellement, qui explique comment les feuilletts embryonnaires sont déterminés et à quel moment les cellules de la lèvre dorsale du blastopore acquièrent leur activité organisatrice.

#### **III.4.a Le centre de Nieuwkoop**

Afin d'étudier l'influence des différents feuilletts embryonnaires les uns par rapport aux autres, Nieuwkoop découpa une blastula de Xénope en trois parties selon l'axe animal - végétal et mis ces tissus indépendamment en culture. La partie animale (ou calotte animale) donna des dérivés ectodermiques, la partie médiane (ou zone marginale) se différençia en mésoderme, et enfin, l'hémisphère végétal produit des cellules endodermiques (Fig.7a). Ainsi les cellules de la blastula possèdent déjà une information de lignage régionalisée selon l'axe animal - végétal. À la suite de cette série de manipulations, P. Nieuwkoop accola la calotte animale et l'hémisphère végétal. Il observa que les cellules donnant normalement de l'ectoderme produisent du mésoderme (Fig.7a; Nieuwkoop, 1969). De plus, il remarqua que la polarité selon l'axe dorso - ventral de ce mésoderme néo-induit dépend de la polarité de l'endoderme sous-jacent (Fig.7b; Nieuwkoop, 1973; Nieuwkoop, 1977).





### Intro - Figure 7: Les expériences de Nieuwkoop

La culture d'explants d'embryon en fin de stade blastula indique que la partie la plus animale acquiert des caractéristiques d'ectoderme, la partie médiane développe des propriétés de mésoderme et la partie végétale des caractéristiques d'endoderme (a). Si le mésoderme présomptif est enlevé en fin de stade blastula et la calotte animale accolée à l'hémisphère végétale, l'embryon reforme du mésoderme en position intermédiaire (b). De plus, la régionalisation selon l'axe D/V dépend de l'orientation de l'hémisphère végétal et pas de la calotte animale (b).

À partir de ces expériences, P. Nieuwkoop conclut que: (1) l'hémisphère végétal possède des signaux induisant le mésoderme, (2) la partie dorsale de l'hémisphère végétal détermine l'organisateur de Spemann.

Ces résultats ont été reproduits et précisés. La partie végétale située dorsalement fut nommée centre de Nieuwkoop, essentiel pour l'induction du centre organisateur de Spemann et la détermination du côté dorsal (Gerhart *et al*, 1989).

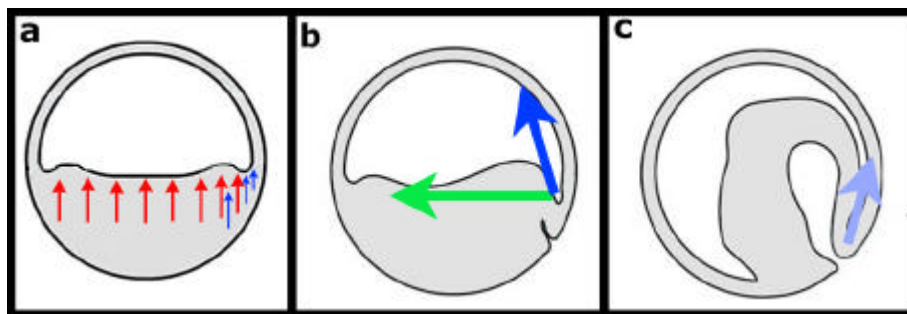
#### **III.4.b La régionalisation antéro-postérieure de la plaque neurale**

Sur la base des travaux réalisés antérieurement par O. Mangold sur la plaque neurale des amphibiens, P. Nieuwkoop ainsi que S. Toivonen et L. Saxén ont proposé un modèle de régionalisation A/P de la plaque neurale (Nieuwkoop, 1952; Toivonen et Saxén, 1955). Initialement, une identité neurale antérieure serait induite dans toutes les cellules précurseurs de la plaque neurale. C'est l'étape d'activation. Progressivement, au cours de la gastrulation, la plaque neurale acquerrait sa régionalisation le long de l'axe A/P sous l'influence de signaux "posteriorisants". C'est l'étape de transformation. Selon ce modèle, l'organisateur de Spemann serait responsable des deux effets mais de manière décalée dans le temps.

#### **III.4.c Le modèle**

Le modèle fondé sur ces expériences historiques postule que précocement des signaux provenant de l'hémisphère végétal déterminent tout le mésoderme (Fig.8a). Dorsalement le centre de Nieuwkoop induit le centre organisateur de Spemann qui neuralise l'ectoderme (Fig.8a,b). Par la suite, le centre organisateur de Spemann régionalise le mésoderme le long de l'axe dorso - ventral et posteriorise la plaque neurale (Fig.8c).

Nous re-discuterons de ce modèle ultérieurement à la lumière de données plus récentes.



**Intro - Figure 8: Modèle classique de la mise en place des axes embryonnaires**

La mise en place des axes embryonnaires chez l'amphibien est classiquement considérée en trois étapes. Précocement, un signal provenant de l'hémisphère végétal détermine le mésoderme (a, flèches rouges). Dorsalement, un signal distinct provenant du centre de Nieuwkoop détermine le côté dorsal et induit la formation du centre organisateur de Spemann (a, flèches bleues). En début de gastrulation, le centre organisateur de Spemann régionalise le mésoderme le long de l'axe D/V (b, flèche rouge) et "active" l'ectoderme vers un devenir neural (b, flèche bleue). En cours de gastrulation, le centre de Spemann est toujours actif et "transforme" la plaque neurale pour déterminer les identités postérieures (c).

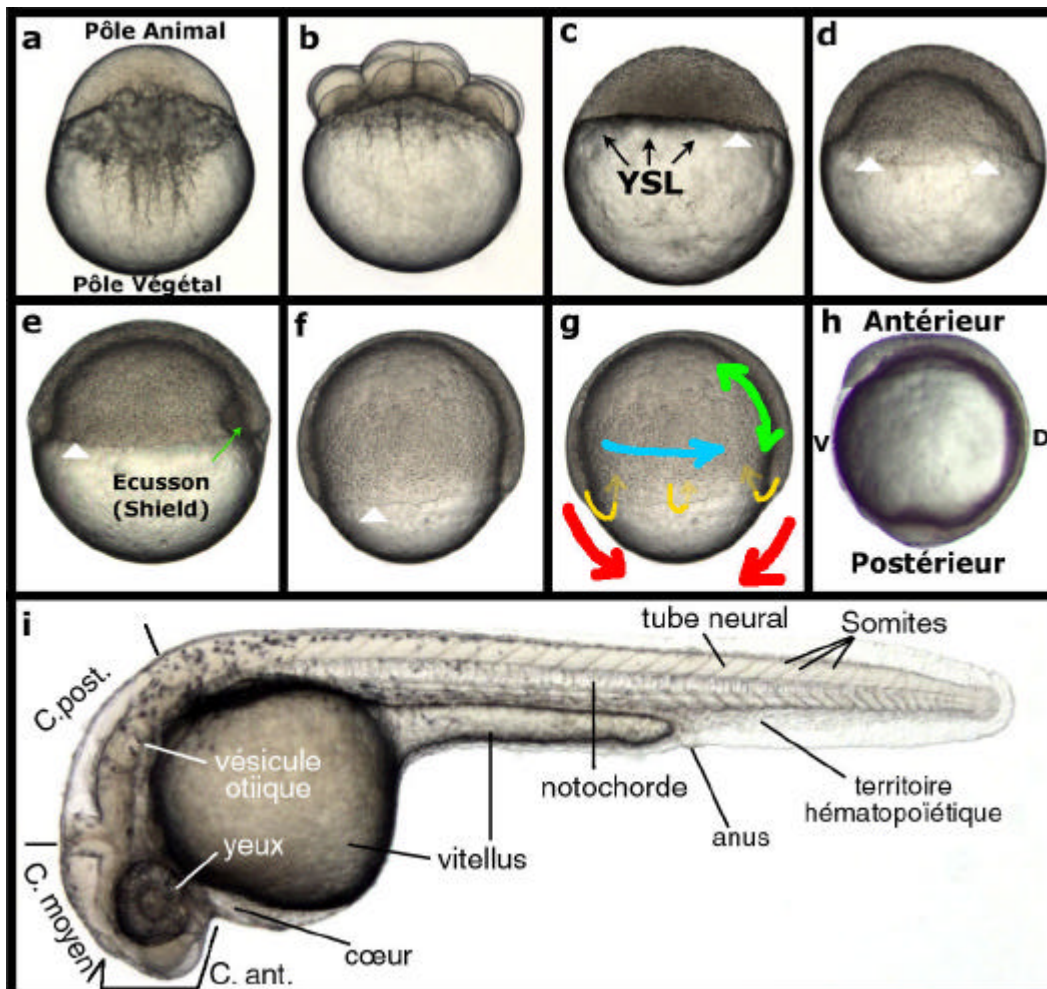
## **IV Le poisson zèbre, organisme modèle de biologie du développement**

L'utilisation du poisson zèbre en tant qu'organisme modèle s'est considérablement développée depuis le début des années 90 en raison des nombreux avantages que cette espèce présente pour les études en biologie du développement. L'utilisation de ce modèle permet d'aborder la problématique de la mise en place des axes embryonnaires selon des approches génétique, moléculaire et embryologique.

### **IV.1 Les intérêts du modèle**

Le poisson zèbre est un poisson téléostéen d'eau douce tropicale. Il est élevé à 28,5°C selon un cycle de 14h de jour et 10h de nuit. L'accouplement du mâle et de la femelle est synchronisé avec le réveil. Le mâle expulse les œufs du ventre de la femelle et les féconde dans le milieu extérieur pour produire une ponte de l'ordre de 150-200 œufs en l'espace de 15 minutes. L'obtention des œufs se fait donc en grand nombre, dans un laps de temps court et sans sacrifice de la femelle. Les embryons qui se développent à partir de ces œufs ont la particularité d'être totalement transparents permettant l'observation de structures internes comme le sang, le cœur ou le système nerveux. L'utilisation de marqueurs fluorescents a été largement développée grâce à cet avantage. Par ailleurs, il est possible de réaliser des études génétiques (mutagenèse, transgénèse) grâce au temps de génération relativement court (3 mois).

Par conséquent, les études chez le poisson zèbre allient les avantages d'approches embryologique et génétique. Cependant, pour réaliser une perte de fonction d'un gène, il n'est pas possible de recourir à la recombinaison homologue, ce qui oblige à utiliser une approche par mutagenèse aléatoire. Cette méthode a été utilisée chez le poisson zèbre lors d'un crible à grande échelle par mutagenèse ENU (Ethyl Nitroso Urée) sur mâle (Haffter *et al*, 1996). La plupart des mutants génétiques utilisés en embryologie chez le poisson zèbre ont été isolés lors de ce crible. Actuellement, une technique associant cette méthode traditionnelle de mutagenèse à un crible de gènes mutés sur échantillons d'ADN (TILLING) permet d'isoler assez rapidement une mutation pour un gène souhaité (Wienholds *et al*, 2003). Des approches complémentaires utilisant des oligonucléotides anti-sens modifiés permettent



**Intro - Figure 9: Les principales étapes du développement embryonnaire du poisson zèbre**

Au cours de la segmentation, l'embryon se développe sur le vitellus (a,b). Juste avant le début de l'expression des gènes zygotiques, les cellules les plus marginales fusionnent et forment la YSL (c). Du stade Sphère (c, 4hpf) jusqu'en fin de gastrulation, les cellules de l'embryon subissent des mouvements d'epibolie et recouvrent progressivement le vitellus (c-h, flèches rouges en g). Pendant cette période, on appelle "marge" les cellules situées en front de migration (triangle en c-e). En fin de stade blastula (50% epibolie, d), les feuilletts embryonnaires sont déterminés et régionalisés (voir carte des territoires présomptifs). Pendant la gastrulation, les cellules de la marge subissent des mouvements d'involution sous l'épiblaste et forment les feuilletts embryonnaires (flèches jaunes en g). En début de gastrulation, les mouvements d'involution sont plus importants au niveau dorsal créant un épaissement de la marge appelé écusson embryonnaire (ou Shield) (flèche verte en e). Pendant la gastrulation, les cellules subissent aussi des mouvements de convergence vers le côté dorsal (flèche bleue en g) et d'extension le long de l'axe animal - végétal (flèche verte en g). En fin de gastrulation, le vitellus est complètement recouvert et les ébauches des différents tissus sont en place (h). A 24h de développement, on peut reconnaître facilement les différentes structures embryonnaires grâce à la transparence des tissus (i). Abréviations: C.ant.=Cerveau antérieur (prosencephale); C. moy.=Cerveau moyen (Mésencéphale); C.post.=Cerveau postérieur (Rhombencéphale).

d'obtenir rapidement des informations concernant la perte de fonction d'un gène (morpholino et P.N.A; Nasevicius et Ekker, 2000; Urtishak *et al*, 2003). En effet, la perte de fonction du gène est réalisée par simple injection de l'oligonucléotide au stade 1-cellule.

## **IV.2 Les principales étapes du développement de l'embryon de poisson zèbre.**

L'ensemble des stades du développement embryonnaire sont récapitulés en Annexe 1.

### **IV.2.a La segmentation (0h - 3h)**

Au moment de la ponte, l'œuf est chargé uniformément de réserves vitellines. Juste après la fécondation, un courant vitellin déforme la membrane cellulaire et crée une région dépourvue de vitellus et définit ainsi le pôle animal, lieu de formation de la première cellule de l'embryon (Fig.9a) qui se divisera par mitoses synchrones jusqu'au stade 1024-cellules. Jusqu'au stade 16-cellules, où les blastomères sont organisés en un plateau posé sur le vitellus, il n'y a pas de séparation nette les blastomères et les réserves vitellines puisqu'il existe des ponts cytoplasmiques qui relient les deux compartiments (Fig.9b).

La fin de la période de la segmentation est définie par deux événements marquants. Entre les stades 512 et 1024 cellules, le génome zygotique commence à fonctionner, c'est la transition mi-blastuléenne (MBT - Fig.9c). Jusqu'à cet événement, le métabolisme des cellules ainsi que les signalisations étaient assurés par des molécules maternelles déposées dans le vitellus au moment de l'ovogenèse. Le deuxième phénomène consiste en la fusion des cellules se trouvant à la frontière entre le vitellus et l'embryon, ce qui forme la Couche Vitelline Syncytiale (YSL), annexe extra-embryonnaire essentielle pour la détermination des axes embryonnaires (Fig.9c). Cette structure est considérée comme l'équivalent de l'endoderme viscéral de l'embryon de souris ou de l'hypoblaste de l'embryon de poulet (Ho *et al*, 1999).

### **IV.2.b Le stade blastula (3h-6h)**

Cette période va de la MBT (3hpf) jusqu'en début de la gastrulation (6hpf). Au cours de cette phase, alors que les blastomères continuent à se diviser (de manière asynchrone), le blastoderme commence à recouvrir le vitellus par un mouvement d'épibolie. L'embryon se creuse en son centre pour former une sorte de casquette posée sur le vitellus. Même si en fin de stade blastula (stade 50% épibolie), seul l'axe animal - végétal est reconnaissable (Fig.9d), l'axe dorso-ventral et les feuilletts embryonnaires sont déjà déterminés au niveau moléculaire.

#### **IV.2.c La gastrulation (6h - 10h)**

Au cours de la gastrulation, on peut distinguer trois grands types de mouvements cellulaires. Tout d'abord, les cellules situées les plus à la marge entre l'embryon et le vitellus involuent pour former un deuxième feuillet interne, l'hypoblaste, situé sous l'épiblaste. Les cellules hypoblastiques vont se différencier en endoderme et mésoderme. Ces mouvements d'involution sont visualisables par un épaississement de la zone marginale, appelé anneau germinatif. Dorsalement ce dernier est plus épais et constitue l'écusson embryonnaire (ou Shield), à l'origine du mésoderme axial (Fig.9e), premier signe morphologique d'une dissymétrie le long de l'axe dorso-ventral. J. Oppenheimer a montré par des expériences de greffes que l'écusson embryonnaire des poissons était l'équivalent de la lèvre dorsale du blastopore des amphibiens, et possède une activité organisatrice comparable (Oppenheimer *et al*, 1936). Parallèlement, l'embryon continue les mouvements d'épibolie initiés lors de la blastula pour recouvrir complètement le vitellus (Fig.9f,h). En plus des mouvements d'involution et d'épibolie, les cellules subissent des mouvements complexes de convergence vers le côté dorsal et d'extension le long de l'axe Animal-Végétal (Fig.9g).

En fin de gastrulation, les principales régions de l'embryon (axe, tête, queue) ont été mises en place (Fig.9h) et sont reconnaissables morphologiquement.

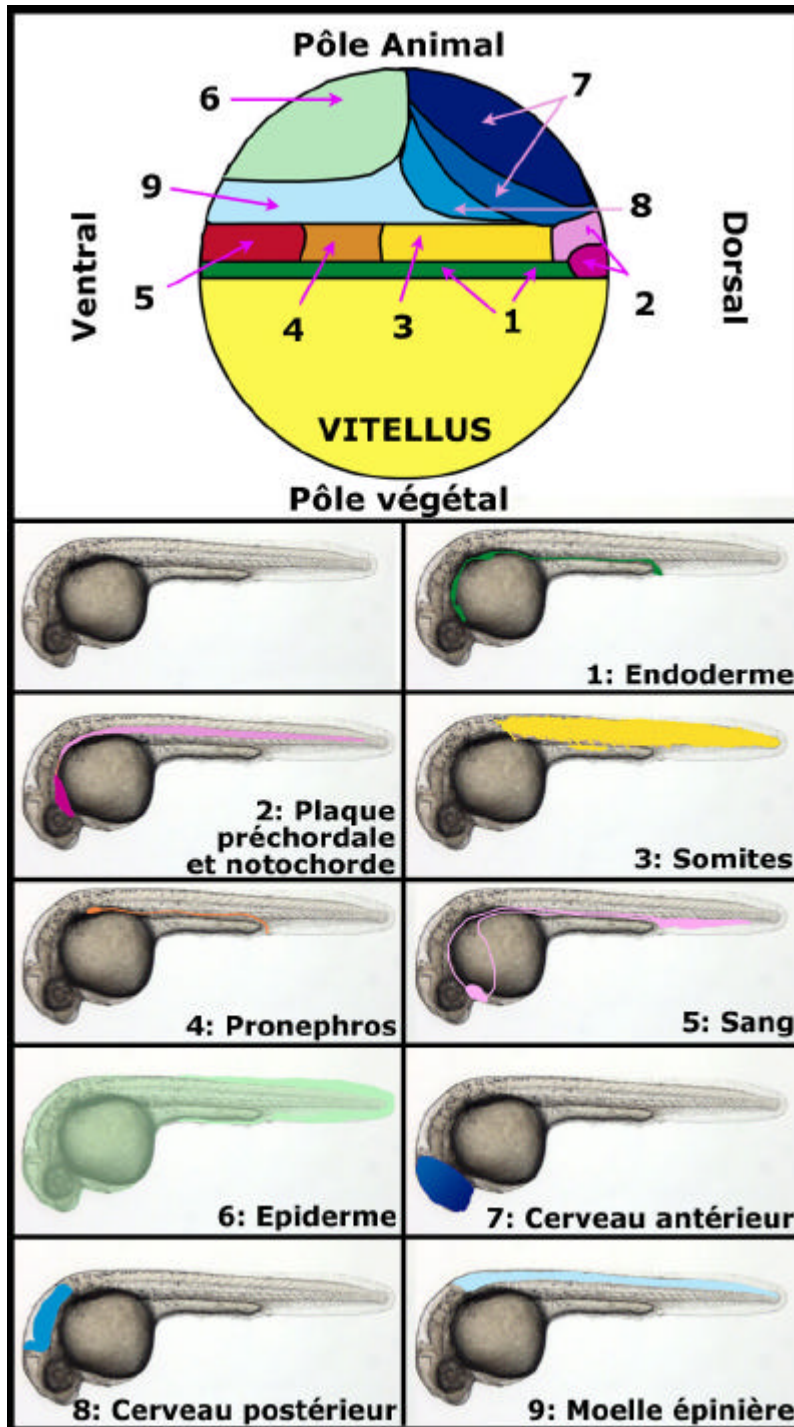
#### **IV.2.d La somitogenèse (10h - 24h)**

La somitogenèse est une période où les territoires définis pendant la gastrulation vont grandir et se différencier. Tout d'abord, le système nerveux central se forme à partir de la plaque neurale dorsale pour former un tube neural par cavitation. Antérieurement, les différentes vésicules céphaliques se forment et les yeux s'individualisent.

Au niveau de l'hypoblaste dorsal, le mésoderme para-axial se segmente en somites, de l'anterior vers le postérieur. Postérieurement, le bourgeon caudal, issu de la fusion de cellules marginales en fin de gastrula, se développe pour former les structures postérieures de l'embryon (queue). Voir Annexe 1.

#### **IV.2.e Après 24h...**

Au bout de 24h de développement, l'embryon de poisson zèbre ressemble déjà à un petit poisson avec les principales structures reconnaissables (Fig.9i). La plupart des organes sont individualisés sous forme d'ébauche. On peut reconnaître facilement le mésoderme axial (notochorde) et para-axial (somites) ainsi que le mésenchyme ventral (sang). Au niveau



**Intro - Figure 10: La carte des territoires présomptifs en fin de stade blastula (50% epibolie)**

A 50% epibolie les différents feuillets embryonnaires sont déterminés et régionalisés. Le long de l'axe animal-végétal, on peut observer l'endoderme (1: en vert) qui est situé le plus à la marge, le mésoderme (2,3,4 et 5) puis l'ectoderme (6,7,8 et 9). Les cellules au sein du mésoderme et de l'ectoderme sont régionalisées le long de l'axe D/V.



neural, les différentes régions du cerveau sont visualisées grâce à des repères morphologiques comme l'oreille ou la barrière mésencéphale - rhombencéphale (Fig.9i).

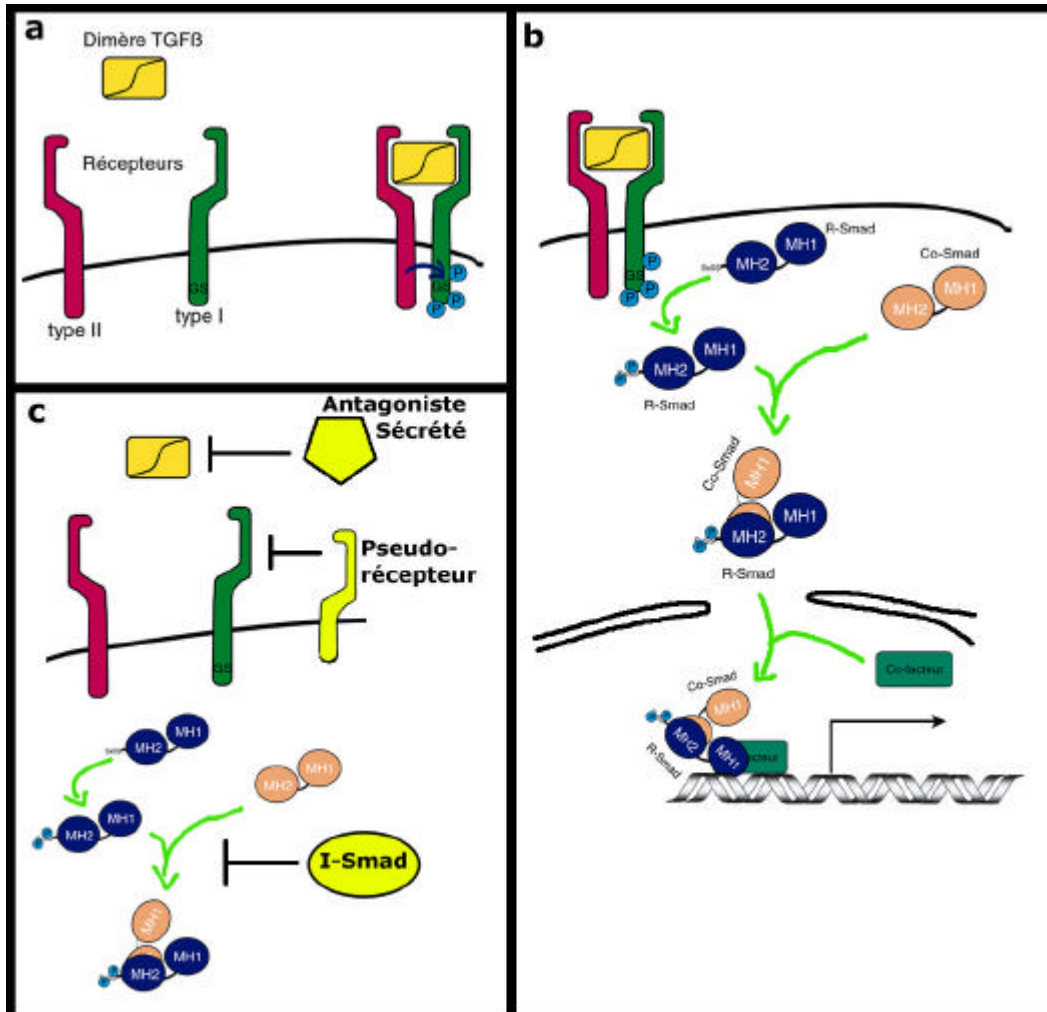
Grâce à l'ensemble de ces caractères morphologiques, ce stade est utilisé pour l'analyse phénotypique des expériences réalisées plus précocement (injections ou transplantations).

Le jeune poisson est autonome jusqu'à 5 jours de développement (épuisement de la réserve vitelline), moment où il a besoin d'une alimentation externe.

### **IV.3 La carte des territoires présomptifs**

La compréhension des événements précoces au cours du développement embryonnaire nécessite l'utilisation d'une carte des territoires présomptifs. Cet outil essentiel indique quels sont les destins des différentes régions de l'embryon à des stades précoces, ce qui permet de définir les territoires d'expression de gènes transcrits précocement dans l'embryon. Les études de suivi cellulaire par injection de molécules fluorescentes (rhodamine et fluorescéine) ont montré qu'une carte précise ne peut être tracée qu'en fin de blastula. Avant, les destins ne sont pas encore fixés complètement et d'un embryon à l'autre, les résultats ne sont pas exactement les mêmes (Kimmel *et al*, 1990, Strehlow *et al*, 1994).

La figure 10 présente la carte des territoires présomptifs d'un embryon à 50% épibolie, juste avant la gastrulation. On peut remarquer que: (1) les feuillet embryonnaires sont globalement superposés les uns au-dessus des autres le long de l'axe animal-végétal, l'endoderme se trouvant le plus à la marge, suivi du mésoderme et de l'ectoderme; (2) chaque feuillet embryonnaire est régionalisé le long de l'axe dorso-ventral (l'endoderme l'étant probablement aussi).



**Intro - Figure 11: La signalisation TGFβ**

a: Les dimères de TGFβ interagissent avec les récepteurs de type I et II et permet leur rapprochement. L'activité S/T kinase du récepteur de type II phosphoryle le récepteur de type I. b: Le récepteur de type I phosphorylé active dans le cytoplasme les R-Smad au niveau de la séquence consensus SXSS, permettant l'interaction avec les Co-Smad. Après migration dans le noyau, les complexes R-Smad/Co-Smad sont recrutés par des co-facteurs au niveau de séquences régulatrices de gènes cibles. c: Le signal TGFβ peut être régulé par des antagonistes sécrétés agissant au niveau des ligands, par des pseudo-récepteurs ou par des I-Smad qui agissent au niveau des Smad dans le cytoplasme.

## **V. Les grandes voies de signalisation utilisées pour la mise en place des axes embryonnaires**

Chez le poisson zèbre, la mise en place des axes embryonnaires fait intervenir différents facteurs de croissance appartenant aux familles des TGF $\beta$ , des Wnt et des FGF (pour revue voir Schier, 2001). C'est pourquoi je me concentrerai dans ce paragraphe sur la description des ces trois voies de signalisation et leur implications au cours du développement précoce chez le poisson zèbre.

### **V.1 La signalisation TGF $\beta$ et la mise en place des axes embryonnaires**

#### **V.1.a La transduction d'un signal TGF $\beta$**

##### **V.1.a.1 Les ligands**

Les facteurs de croissance du type TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) forment une superfamille dont les ligands possèdent de multiples activités en fonction du contexte dans lequel ils sont étudiés (pour revue voir Shi et Massagué, 2003). Ils sont au nombre de 40 chez l'Homme et ont été clonés dans la plupart des espèces animales métazoaires.

Une des caractéristiques structurales des ligands TGF $\beta$  est une série de sept cystéines conservées qui forment une conformation tertiaire particulière appelée nœud cystéine. L'une de ces cystéines est impliquée dans la formation d'un pont disulfure avec un deuxième ligand. Les TGF $\beta$  agissent en tant qu'homo ou hétérodimères.

Par ailleurs, plusieurs TGF $\beta$  agissent comme des morphogènes. Cela a été démontré pour différents ligands comme l'Activin, Squint/Nodal et Dpp/BMP (Green *et al*, 1992; Gurdon *et al*, 1994; Nellen *et al*, 1996; Chen et Schier, 2001).

##### **V.1.a.2 La réception du signal**

Il existe deux types de récepteurs (type I et type II) possédant une activité Sérine-Thréonine kinase. Les récepteurs de type II possèdent une activité Sérine-thréonine kinase endogène alors que la région catalytique du récepteur de type I (région « GS », pour riche en Sérine et Glycine) doit être phosphorylée par le récepteur de type II pour être active. Cette phosphorylation croisée est permise grâce à la fixation des ligands qui induit un rapprochement des deux récepteurs, et active donc le récepteur de type I (Fig.11a). Pour certains TGF $\beta$ , la transduction du signal est dépendante d'un co-récepteur qui interagit directement avec les récepteurs et les ligands.

La fixation ligand - récepteur peut être inhibée par différents antagonistes extracellulaires (pour revue voir Massagué et Chen; 2000).

### **V.1.a.3 Les effecteurs cytoplasmiques**

En aval des récepteurs, le signal est transduit via les molécules Smad. Ces effecteurs cytoplasmiques sont composés de deux domaines conservés, MH1 et MH2 (MH pour Mad Homology), séparés par une région-charnière (pour revue voir Shi, 2001). Parmi les 8 Smad identifiés chez les Vertébrés, trois types de sont distingués: les R-Smad (Smad régulateurs), Co-Smad (Smad cofacteur) et les I-Smad (Smad inhibiteurs).

Les R-Smad interagissent via leur domaine MH2 avec le récepteur de type I au niveau d'une boucle adjacente à la région GS phosphorylée. Cette liaison conduit à la phosphorylation du R-Smad dans sa partie carboxy-terminale (en aval du domaine MH2) qui possède un site consensus Ser-Ser-X-Ser, conservé uniquement chez les Smad régulateurs. Il existe 5 R-Smad: Smad1,2,3,5 et 8. Une fois phosphorylées, ces molécules peuvent lier le Co-Smad, par une interaction des domaines MH2 (Fig.11b).

Une fois assemblé, ce complexe passe dans le noyau et se fixe sur l'ADN via le domaine MH1 du R-Smad au niveau de séquences cibles (Fig.11b). La spécificité de fixation est réalisée grâce à des co-facteurs nucléaires, se fixant aussi sur le domaine MH1 du R-Smad. Plusieurs co-facteurs ont été identifiés et montrés comme spécifiques de certains types cellulaires ou de certains ligands TGF $\beta$ .

Le troisième type de Smad, les I-Smad, réalise un rétrocontrôle négatif. Deux I-Smad ont été identifiés, Smad6 et Smad7. Smad6 a la capacité de lier la forme phosphorylée de Smad1 et d'empêcher ainsi l'interaction avec Smad4. Ce nouveau dimère est inactif. Le mécanisme d'inhibition de Smad7 est un peu différent. Après la stimulation des cellules par un signal TGF $\beta$ , Smad7 passe du noyau vers le cytoplasme et interagit avec les protéines Smurf, impliquées dans la dégradation via le protéasome. Cette interaction entraîne l'ubiquitination des récepteurs de type I, et ainsi leur dégradation.

Ce schéma de transduction est conservé entre vertébrés et invertébrés (Shi, 2001).

Ligands	Récept. Type I	Récept. Type II	Co-récepteur	R-Smad	Co-Smad	I-Smad	Antagonistes
Activin	ALK4	ActRIIB		Smad2,3	Smad4	Smad7	Lefty/Foll.
Nodal	ALK4,7	ActRIIB	Cripto	Smad2,3	Smad4	Smad7	Lefty/Cerb.
dActivin	Baboon	Punt		dSmad2	Medea	Smad7	
BMP2	ALK3,6	BMPRII		Smad1,5,8	Smad4	Smad6,7	Chd/Nog/Foll/Cerberus
BMP4	ALK3,6	BMPRII, ActRIIB		Smad1,5,8	Smad4	Smad6,7	Chd/Nog/Foll/Cerberus
BMP7	ALK2,3,6	BMPRII, ActRIIB		Smad1,5,8	Smad4	Smad6,7	Chd/Nog/Foll/Cerberus
Dpp, Screw, 60A	Tkv, Sax	Punt, Wit		Mad	Medea	Dad	Sog

### **Intro - Table I: La voie de signalisation des TGFβ**

Abréviations: ALK= Activin receptor Like Kinase; ActR=Activin Receptor; Foll=Follistatin; Cerb.=Cerberus; Dpp=Decapentaplegic; 60A=Gbb60A; Tkv=Thickvein; Sax=Saxophone; Wit=Wishful Thinking; Sog=Short Gastrulation.

#### **V.1.a.4 Contrôles positifs et négatifs de la signalisation**

La signalisation TGF $\beta$  peut être modulée par de nombreux acteurs à différents niveaux. Certains diminuent le niveau de signalisation comme le pseudo-récepteur BAMBI (Bmp and Activin Membrane Bound Inhibitor), les I-Smad ou les antagonistes sécrétés (Fig.11c; pour revue voir Massagué et Chen, 2000). D'autres augmentent la réponse du signal comme la protéine nucléaire Arkadia, ou les protéines SARA, Disabled2, Axin ou ELF  $\beta$  spectrin qui facilitent le recrutement des R-Smad au niveau du récepteur de type I (Episkopou *et al*, 2001; Niederländer *et al*, 2001; Shi et Massagué, 2003).

#### **V.1.a.5 Deux familles de TGF $\beta$**

Les ligands sont séparés en deux familles en fonction des R-Smad qu'ils recrutent dans le cytoplasme (Shi et Massagué, 2003). Le premier groupe, qui utilise les Smad2 et Smad3, est constitué, entre autres, du TGF $\beta$ , de l'Activin, et des Nodal. Chacun utilise une combinaison de ligands déterminée et un co-récepteur spécifique, sauf pour l'Activin. Les ligands de cette famille TGF $\beta$ /Activin se fixent tout d'abord au récepteur de type II, qui recrute le récepteur de type I. La deuxième famille, composée essentiellement par les BMP (Bone Morphogenetic Protein), active les Smad1, 5 et 8. Les ligands se fixent d'abord au récepteur de type I. Chez la drosophile la même dichotomie Activin/Nodal - BMP est observée et des homologues de chaque molécule, sauf des Nodal, existent (Raftery et Sutherland, 1999). Un récapitulatif des ligands et de leurs récepteurs est présenté en Table 1.

#### **V.1.b La famille Activin/Nodal**

Chez le poisson zèbre, trois gènes Activin ont été identifiés et seule l'Activin $\beta$ B pourrait jouer un rôle au cours du développement précoce du fait de son patron d'expression. La plupart des études concernant la fonction de l'Activin indiquent que c'est un puissant inducteur d'endoderme et de mésoderme, mais ces résultats reposent sur des expériences de sur-expression. La perte de fonction de ces gènes n'induit aucun défaut de développement, ce qui suggère que ce gène n'est pas requis au cours du développement précoce ou que son activité est largement masquée par celle d'autres TGF $\beta$  (Rodaway *et al*, 1999).

Les facteurs Nodal, initialement isolés chez la souris (Zhou *et al*, 1993; Conlon *et al*, 1994), sont au nombre de 3 chez le poisson zèbre: ZNR1/Cyclops, ZNR2/Squint et Southpaw (ZNR pour Zebrafish Nodal Related 1 & 2 - Erter *et al*, 1998; Feldman *et al*, 1998; Rebagliati *et al*, 1998; Sampath *et al*, 1998; Long *et al*, 2003). La sur-expression de ZNR1 et ZNR2 produit le même type de phénotype qu'avec l'Activin $\beta$ B, et leur perte de fonction perturbe la formation

du mésoderme et de l'endoderme (Feldman *et al*, 1998; Gristman *et al*, 2000; Kikuchi *et al*, 2000). Le facteur Nodal Southpaw est requis plus tardivement au cours de l'embryogénèse pour la mise en place de l'axe droite-gauche (Long *et al*, 2003).

La transduction du signal des Nodal, et non celui de l'Activin, requiert la présence du co-facteur CRIPTO appartenant à la famille EGF-CFC (Gristman *et al*, 1999). Chez le poisson zèbre, ce gène est muté dans la souche *one-eye pinhead (oep)* et code pour une protéine qui est présente avant et après la MBT. La perte des composantes maternelle et zygotique de ce gène (mutants *MZoep*) produit le même phénotype que la perte de fonction des gènes *znr1/cyclops* et *znr2/squint* (Gristman *et al*, 1999).

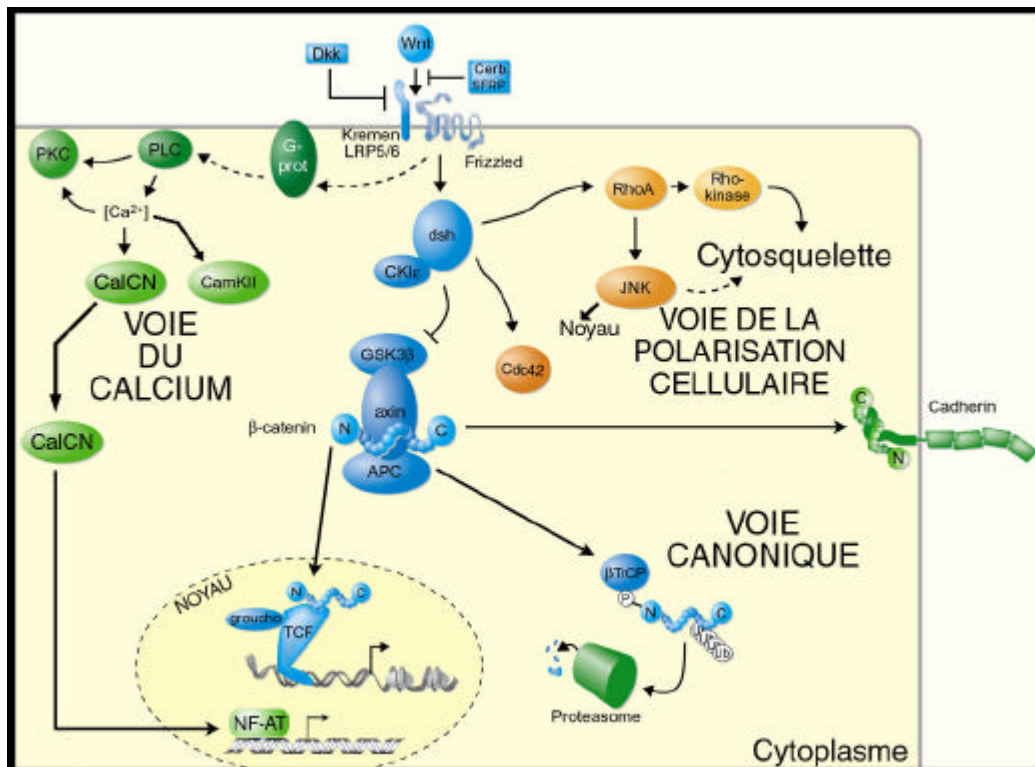
Après stimulation d'une cellule par des facteurs Activin/Nodal, les complexes R-Smad/Co-Smad peuvent être recrutés au niveau de l'ADN par le co-facteur FAST-1/FoxH1 ou Mixer (Chen *et al*, 1996; Watanabe et Whitman, 1999; Germain *et al*, 2000; Osada *et al*, 2000; Randall *et al*, 2002). Les gènes codant pour ces deux protéines sont mutés dans les souches *schmalspur (sur)* et *bonnie& clyde (bon)* dont les embryons sont déficients pour la formation de mésoderme et d'endoderme respectivement (Kikuchi *et al*, 2000; Pogoda *et al*, 2000; Sirotkin *et al*, 2000).

L'activité de ces facteurs de croissance est régulée par les protéines Antivin/Lefty qui bloquent la signalisation en agissant comme inhibiteur compétitif (Bisgrove *et al*, 1999; Meno *et al*, 1999; Thisse *et al*, 1999; Sakuma *et al*, 2002) De plus, les antagonistes multivalents de la famille DAN/Cerberus peuvent aussi fixer les Nodal et empêcher l'interaction avec les récepteurs (Piccolo *et al*, 1999).

### **V.1.c La famille BMP**

Pour les facteurs BMP, seule une partie sont exprimés précocement. Chez le poisson zèbre, les gènes codant pour BMP2b, 4 et 7 sont fortement transcrits dans les cellules ventrales de l'embryon en début de gastrulation (pour revue voir Schier, 2001). Leur activité est contrôlée par une interaction directe avec les antagonistes extracellulaires Chordin, Noggin et DAN/Cerberus, qui empêchent leur fixation aux récepteurs (Massagué et Chen, 2000). La signalisation BMP peut être aussi bloquée par le facteur Follistatin, qui inhibe aussi l'Activin (de Winter *et al*, 1996; Iemura *et al*, 1998).

Comme pour la signalisation Activin/Nodal, les complexes R-Smad/Co-Smad activés par les ligands BMP sont recrutés au niveau de l'ADN par des co-facteurs tels que OAZ (Hata *et al*, 2000).



**Intro - Figure 12: La signalisation Wnt**

Un signal Wnt peut être transmis vers le noyau de trois manières différentes. La voie canonique de la  $\beta$ -catenin (molécules en bleu), la voie de la polarisation cellulaire (molécules en orange) et la voie du calcium (molécules en vert). **Abréviations:** SFRP: Secreted Frizzled Related Protein; Cerb.=Cerberus; LRP:Lipoprotein Receptor Related Protein; dsh=Dishevelled; CKI= Casein Kinase I; GSK=Glycogen Synthase Kinase; APC=Adematous Polyposis Coli;  $\beta$ -TrCP= $\beta$  Transducin repeat containing Protein; TCF=T Cell Factor; PLC=PhosphoLipase C; PKC=Protein Kinase C; CamKII=Calmodulin Dependent Kinase II; CalCN=Calcineurin; NF-AT= Nuclear Factor of Activated T cells; JNK=Jun Kinase. figure adaptée de Huelsken et Birchmeier, 2001.



## **V.2 La signalisation Wnt**

Les gènes *wnt* codent pour des facteurs de croissance riches en cystéines. Comme pour les TGF $\beta$ , il semble qu'ils peuvent agir en tant que morphogène dans un tissu mais leurs capacités de diffusion semblent dépendre du contexte cellulaire dans lequel ils évoluent (Cadigan, 2002). Les facteurs de croissance de la famille des Wnt sont impliqués dans divers phénomènes au cours de l'embryogenèse précoce comme la régionalisation des tissus et le contrôle des mouvements cellulaires (Huelsen et Birchmeier, 2001).

Cette variété d'activité repose sur un grand répertoire de ligands Wnt (18 chez les mammifères) qui peuvent emprunter au moins trois voies de transduction du signal (Fig.12). Toutes ces voies de signalisation sont activées par l'interaction d'un ligand Wnt avec un récepteur Frizzled (récepteur à 7 domaines transmembranaires - Pandur *et al*, 2002).

### **V.2.a. La voie canonique**

Le premier système de transduction du signal des Wnt à avoir été décrit consiste à la stabilisation d'une protéine intracellulaire multifonctionnelle, la  $\beta$ -catenin (Fig.12; Huelsen et Birchmeier, 2001). En l'absence de stimulation, la  $\beta$ -catenin est phosphorylée successivement par la Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) et la Casein Kinase I (CKI) au sein d'un complexe associant de nombreuses protéines telles que Axin, PP2A (Protein Phosphatase 2A) et APC (Adenomatous Polyposis Coli). Cette phosphorylation entraîne la dégradation de la  $\beta$ -catenin par le protéasome (Fig.12). Si un ligand Wnt se fixe à un récepteur, l'activité de ce complexe multimérique est inhibée par la protéine Dishevelled (Dsh) qui a été activée par Frizzled. Une fois stabilisée, la  $\beta$ -catenin peut s'associer à différentes protéines dont le facteur de transcription nucléaire TCF-Lef, ce qui active la transcription de certains gènes cibles. Par ailleurs, dans le cytoplasme, la  $\beta$ -catenin peut interagir directement avec des complexes protéiques impliqués dans les jonctions intercellulaires ( $\alpha$ -catenin - cadhérines), ce qui modifie les conditions d'adhérence de la cellule activée (Fig.12).

Au cours de l'embryogenèse précoce des vertébrés, cette signalisation est impliquée dans la détermination du côté dorsal, dans la postériorisation de l'embryon ainsi que dans la formation de la partie la plus antérieure de la plaque neurale (télencéphale) (Yamaguchi, 2001; Niehrs, 2004).

### **V.2.b La voie de la polarisation cellulaire**

Certains ligands Wnt (Wnt4, 5 et 11 chez le poisson zèbre) sont impliqués spécifiquement dans la polarisation et les mouvements cellulaires. Dans ce cas précis, la signalisation utilise toujours la protéine Dsh qui active RhoA (petite protéine G) et Cdc42 (kinase). Indépendamment ces deux enzymes phosphorylent d'autres protéines (dont les enzymes RhoKinase et JunKinase) qui agissent sur le cytosquelette et activent la transcription de gènes cibles (Fig.12; Huelsken et Birchmeier, 2001; Myers *et al*, 2002b).

Chez le poisson zèbre, cette signalisation est impliquée notamment dans le contrôle des mouvements de convergence et d'extension au cours de la gastrulation (Myers *et al*, 2002b).

### **V.2.c La voie du Calcium**

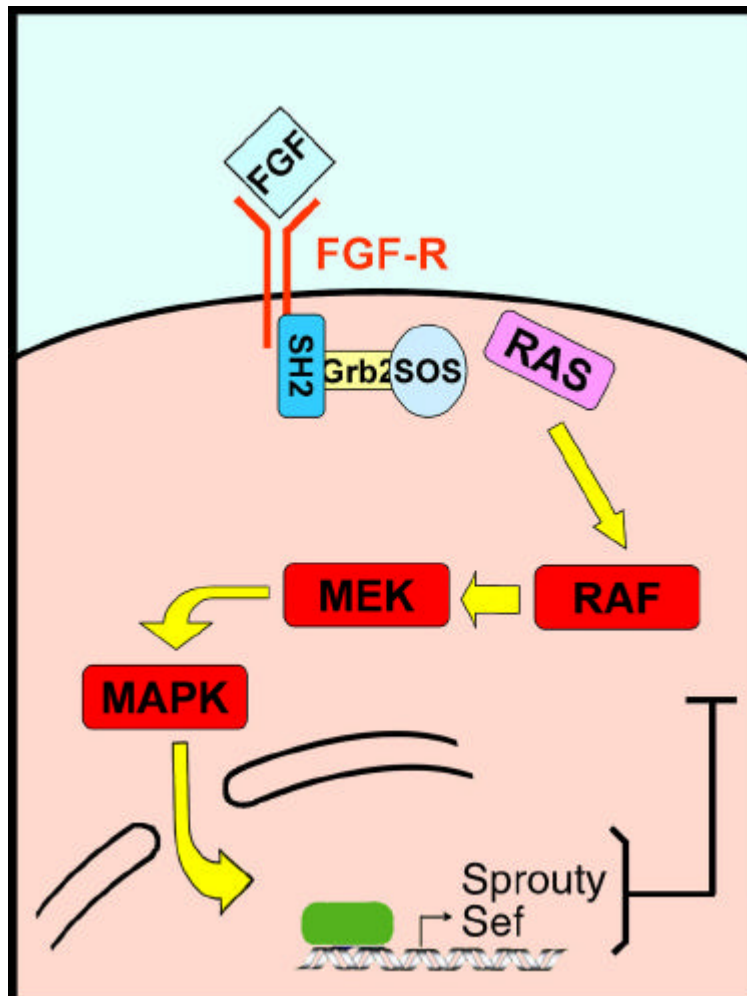
Bien que l'existence de cette voie de transduction du signal ait été observée depuis longtemps, les bases moléculaires de cette signalisation ne viennent d'être précisées que récemment (Itoh et Sokol, 1999; Kuhl *et al*, 2000; Saneyoshi *et al*, 2002).

Pour cette signalisation, Frizzled active directement la voie des phospho-inositides (Phospho-Lipase C - Inositol 3 Phosphate), sans passer par Dsh, ce qui conduit à une augmentation de la concentration cytoplasmique du Calcium. Ce signal active au moins trois enzymes différentes (PKC, CamKII, Calcineurine, voir légende Fig.12) qui, à leur tour, activent le facteur de transcription NF-AT.

Chez le xénope, cette signalisation joue un rôle dans la détermination de la région ventrale de l'embryon en début de gastrulation, et peut inhiber la transduction du signal par la voie canonique (Saneyoshi *et al*, 2002). Il semble que la situation soit la même chez le poisson zèbre (Westfall *et al*, 2003).

### **V.2.d. Utilisation de co-récepteurs**

Plusieurs protéines membranaires jouent un rôle essentiel pour la transduction du signal Wnt. En particulier, la voie canonique requiert les molécules trans-membranaires LRP5/6 (Lipoprotein-Receptor-Related Protein 5 et 6) et Kremen1/2 (Wehrli *et al*, 2000; Tamai *et al*, 2000; Pinson *et al*, 2000; Mao *et al*, 2002). Ces molécules sont d'une importance particulière car elles sont les cibles de l'antagoniste extracellulaire Dickkopf (Bafico *et al*; 2001; Mao *et al*, 2001; Semenov *et al*, 2001; Davidson *et al*, 2002; Mao *et al*, 2002). Il n'est pas établi que ces molécules jouent un rôle pour la transduction de la voie du Calcium.



**Intro - Figure 13: La signalisation FGF**

Cette figure est illustration simplifiée de la transduction du signal des FGF qui fait intervenir de nombreuses autres molécules. Abréviations: FGF-R=Récepteur aux FGF. SH2=protéines adaptatrice à domaine SH2.

### **V.2.e. Les antagonistes extracellulaires**

La régulation de la voie de signalisation des Wnt est étroitement contrôlée par plusieurs familles d'antagonistes sécrétés (Fig.12; Huelsken et Birchmeier, 2001).

Tout d'abord, les ligands Wnt peuvent se lier directement à des protéines homologues au récepteur Frizzled mais qui ne comporte pas les domaines transmembranaires (Secreted Frizzled Related Protein - SFRP). Ces protéines constituent donc des antagonistes compétitifs des ligands Wnt vis-à-vis du récepteur Frizzled. La molécule SFRP3/Frzb1 est particulièrement importante car elle est sécrétée par les cellules de l'organisateur de Spemann (Leyns *et al*, 1997; Wang *et al*, 1997).

L'activité des facteurs Wnt est aussi bloquée par les antagonistes multifonctionnels de la famille DAN/cerberus (Piccolo *et al*, 1999). Chez le xénope, le gène *cerberus* est exprimé précocement dans les cellules de l'organisateur puis dans l'endoderme antérieur et il est impliqué dans la formation de la tête.

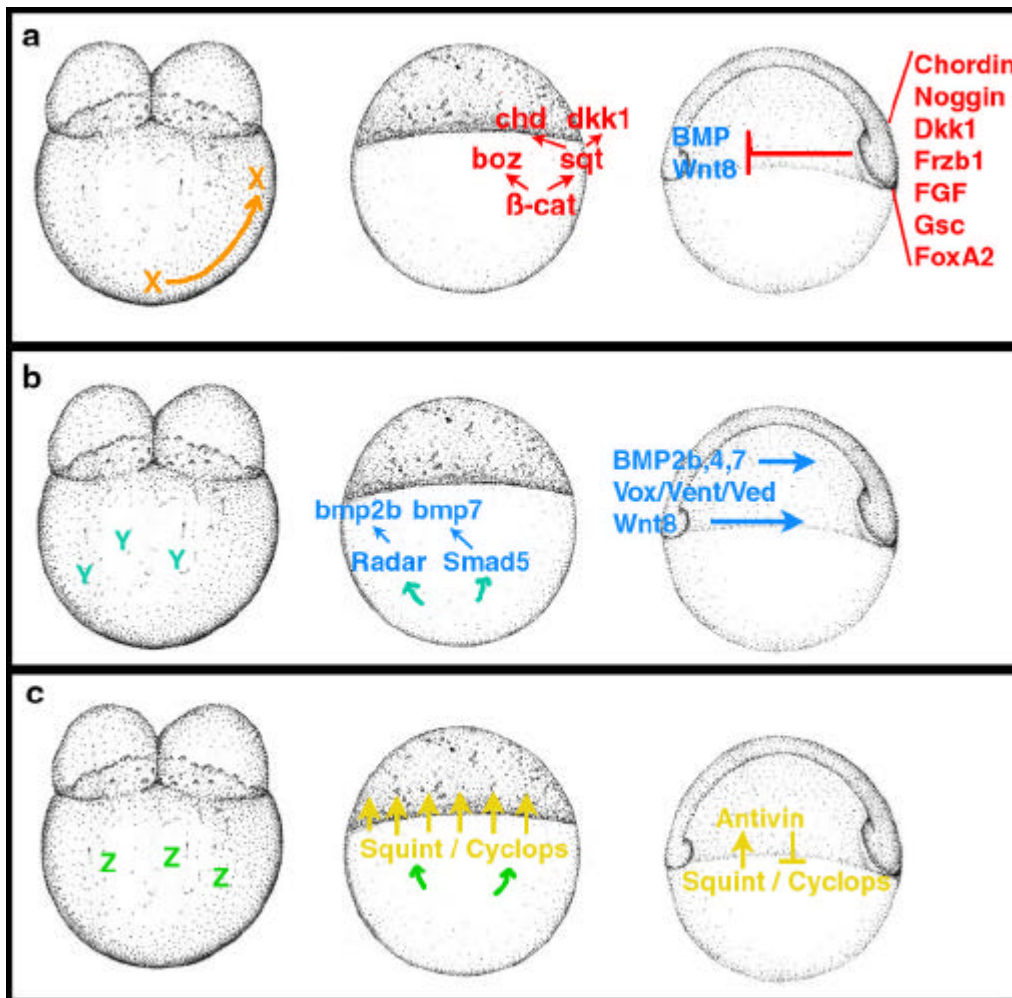
Enfin, Dickkopf1 (Dkk1) peut bloquer la transduction du signal Wnt par interaction directe avec le co-récepteur LRP5/6 - Kremen1/2. L'activité de cet inhibiteur est requise pour la formation de la tête chez le xénope et la souris (Glinka *et al*, 1996; del Barco Barrantes *et al*, 2003).

### **V.3 La signalisation des MAPK**

J'aimerais aborder dernièrement la voie de transduction impliquant les MAP kinase qui joue divers rôles au cours de l'embryogenèse précoce (Dent *et al*, 2003).

L'activation de cette voie peut se faire par plusieurs facteurs de croissance distincts, dont les FGF. Tous interagissent avec des récepteurs à domaine Tyrosine-kinase qui activent la protéine kinase membranaire Ras par l'intermédiaire de protéines adaptatrices (Fig.13). L'activation de Ras initie la phosphorylation en cascade des MAP kinases. En aval, de multiples facteurs de transcription peuvent être recrutés. Cette signalisation est contrôlée en retour par les antagonistes induits, Sprouty et Sef (Hacohen *et al*, 1998; Fürthauer *et al*, 2001; Fürthauer *et al*, 2002).

Cette signalisation est impliquée à plusieurs étapes au cours du développement précoce, ce qui rend l'analyse de leur rôle exact très complexe. Il apparaît néanmoins clairement que les FGF sont impliqués dans la postériorisation du système nerveux (Munoz-Sanjuan et Hemmati-Brivanlou, 2001). De plus, chez le poisson zèbre, l'activité des FGF est requise *in vivo* pour contrôler la signalisation BMP, par répression directe des gènes *bmp* ou par



**Intro - Figure 14: Mise en place des axes embryonnaires chez le poisson zèbre**

a: Détermination du côté dorsal: Juste après la fécondation un facteur X d'identité inconnue est transporté du pôle végétal vers un côté de l'embryon par les microtubules. Cette migration stabilise la  $\beta$ -catenin qui migre dans les noyaux situés du côté dorsal juste avant la MBT. La  $\beta$ -catenin initie toute une cascade de gènes (dont *sqt* et *boz*). L'organisateur de Spemann exprime un ensemble de molécules dont l'activité de plusieurs d'entre elles est requise pour inhiber la signalisation BMP et Wnt. b: Détermination du côté ventral: Un facteur Y maternel d'identité inconnue active la molécule Smad5 et le facteur de croissance Radar. Ces derniers initient l'expression de *bmp2b* et *bmp7*. A leur tour, les BMP initient l'expression de nombreux gènes dont *bmp4*, *vox*, *vent* et *ved*. Wnt8a est aussi exprimé ventralement mais les facteurs impliqués dans son initiation sont inconnus. c: Détermination des feuillettes embryonnaires: maternellement, un facteur Z d'identité inconnue initie l'expression des gènes Nodal au niveau de la YSL et des cellules de la marge. Les facteurs Nodal déterminent par la suite l'identité des cellules le long de l'axe animal-végétal selon un gradient d'activité dirigé vers le pôle animal. Stades et orientations: a,b,c: de la gauche vers la droite: stade 2 cellules, vue latérale; stade Sphère (4hpf), vue latérale; stade Shield (6hpf), vue latérale, côté dorsal à droite.

inhibition de la transduction de leur signal au niveau de Smad (Pera *et al*, 2003; Fürthauer *et al*, 2004).

#### **V.4 Autres signalisations**

D'autres signalisations jouent des rôles importants au cours de l'embryogenèse telles que celle des voies Notch-Delta, Hedgehog ou de l'acide rétinoïque. N'ayant pas travaillé dessus pendant ma thèse, je n'aborderai pas leur description dans ce manuscrit.

### **VI. La détermination des axes embryonnaires chez le poisson zèbre**

Cette partie expose brièvement l'implication des différents facteurs de croissance évoqués ci-dessus pour la mise en place des axes Dorso-Ventral (D/V), Animal-Végétal (A/V) et Antéro-Postérieur (A/P) au cours de l'embryogenèse précoce du poisson zèbre.

#### **VI.1 Détermination de la face dorsale (Fig.14a)**

Le côté dorsal est déterminé maternellement par des signaux d'identité inconnue, situés au pôle végétal du vitellus qui subissent une translocation en direction du pôle animal d'un côté de l'embryon (Jesuthasan et Strahle, 1997; Ober et Schulte-Merker, 1999). Ce mouvement cytoplasmique, probablement initié par l'entrée du spermatozoïde, est dépendant des microtubules et se déroule entre la première et la deuxième division cellulaire (Jesuthasan et Strahle, 1997). Cette première asymétrie induit la translocation nucléaire de la  $\beta$ -catenin observée dans la YSL dorsale juste après le début de l'expression du génome du zygote (Schneider *et al*, 1996). C'est pourquoi la YSL dorsale est considérée comme la structure équivalente au centre de Nieuwkoop des amphibiens. Cette activation de la  $\beta$ -catenin est indépendante des ligands Wnt et de Dsh. La stabilisation de la  $\beta$ -catenin dépend de l'activité du gène *ichabod*, dont l'identité est encore inconnue (Kelly *et al*, 2000).

Ensuite, la  $\beta$ -catenin active directement la transcription des gènes *squint/znr2* et *dharma* au niveau de la YSL dorsale (Sirotkin *et al*, 2000a). Squint initie à son tour l'expression d'un ensemble de gènes cibles spécifiques du centre organisateur de Spemann. Les gènes *dkk1* et *chordin* sont induits très précocement au niveau dorsal et semblent régulés à la fois par la  $\beta$ -catenin et Squint (Sirotkin *et al*, 2000a; Shimizu *et al*, 2000; Hashimoto *et al*, 2000; Shinya *et al*, 2000)

Dharma est un facteur de transcription à homéodomaine ayant une activité de répression requise pour bloquer l'expression des gènes *bmp2b*, *vox/vent*, *ved* et *wnt8a*, impliqués dans la détermination ventrale (Fekany-Lee *et al*, 2000, Erter *et al*, 2001, Imai *et al*, 2001; Shimizu *et al*, 2002).

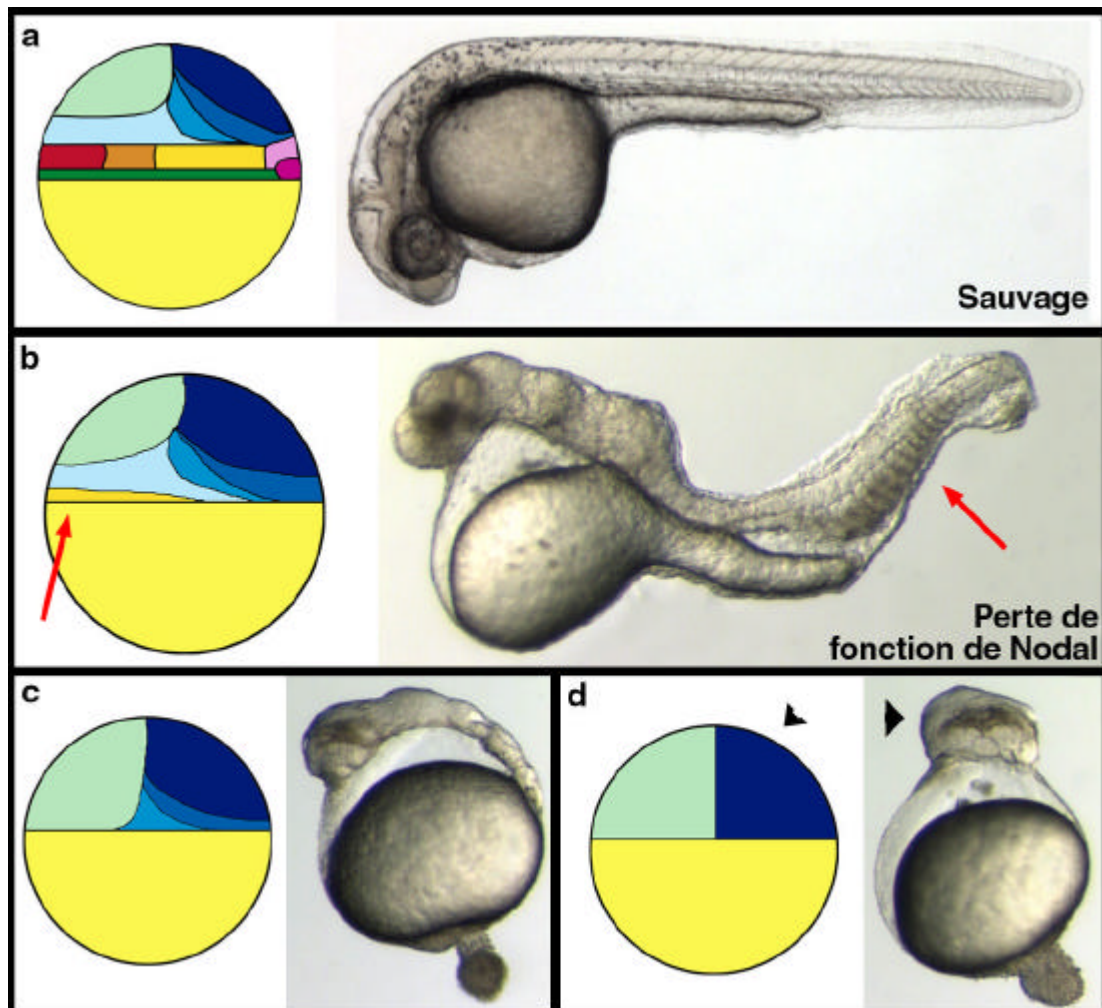
Les cellules de la marge dorsale, qui forment l'organisateur de Spemann, expriment ensuite fortement des gènes codant pour des FGF (*fgf3,8* et *24*), pour des antagonistes sécrétés des BMP (*chordin*, *noggin1*) et pour des antagonistes sécrétés de Wnt (*dkk1*, *frzb1*) (Fürthauer *et al*, 1997; Schulte-Merker *et al*, 1997; Fürthauer *et al*, 1999; Hashimoto *et al*, 2000; Fürthauer, 2001; Thisse *et al*, 2001; Draper *et al*, 2003). De nombreux facteurs de transcription sont aussi présents spécifiquement au niveau de l'organisateur dorsal tels que *gooseoid* (*gsc*), *foxa2/hnf3 $\beta$*  ou *foxA3/hnf3 $\alpha$*  (Strähle *et al*, 1993; Schulte-Merker *et al*, 1994; Dirksen *et al*, 1995)

La région dorsale de l'organisateur est donc un territoire où toute activité Wnt et BMP est inhibée par la présence d'antagonistes spécifiques.

De manière étonnante, les gènes *bmp2b*, *bmp4* et *bmp7* sont tous exprimés pendant la gastrulation dans une fraction des cellules du mésoderme axial, à l'origine de la plaque préchordale (Martinez-Barbera, *et al* 1997; Dick *et al*, 2000 ; Schmid *et al*, 2000). La présence de transcrits BMP dans cette région demeure énigmatique car l'activité des BMP est nécessaire et suffisante pour restreindre la taille cette région.

## **VI.2 Détermination de la face ventrale (Fig.14b)**

Le côté ventral des embryons a longtemps été considéré comme l'état de détermination par défaut, ne nécessitant donc pas de signaux inducteurs précoces. Cependant, si les ARN synthétisés au niveau de la YSL au moment de la MBT sont dégradés de manière spécifique, cela inhibe la formation des cellules marginales ventrales, le côté dorsal étant toujours induit, suggérant qu'il existe un signal précoce instructif essentiel pour la détermination du côté ventral (Chen et Kimelman, 2000). L'identité moléculaire de ce signal a été en partie élucidée chez le poisson zèbre. Le facteur de croissance Radar de type TGF $\beta$  est synthétisé maternellement et nécessaire pour l'initiation de la transcription de *bmp2b* et *bmp4* (Sidi *et al*, 2003). En parallèle, la molécule Smad5, produite aussi maternellement, est activée par un signal d'origine inconnu et initie l'expression de *bmp7* (Kramer *et al*, 2002). Par la suite, les facteurs de croissance BMP induisent un large spectre de gènes cibles (ex: *vox*, *vent*, *ved*) dont



**Intro - Figure 15: La perte de fonction de Nodal va plus loin ...**

La perte de fonction partielle des facteurs Nodal bloque la formation de tout l'endoderme et la majeure partie du mésoderme. Seule une petite partie du mésoderme subsiste en position ventrale (flèche en b). Dans des phénotypes plus forts de perte de fonction de la voie Nodal, les embryons n'ont plus d'endoderme, de mésoderme et de système nerveux postérieur (c). Enfin, l'inhibition totale de la signalisation Nodal ne permet qu'aux territoires neuraux les plus antérieurs de se développer (d).



l'activité est nécessaire pour la bonne différenciation des cellules ventrales (Pour revue voir Dale et Wardle, 1999 et Schier, 2001).

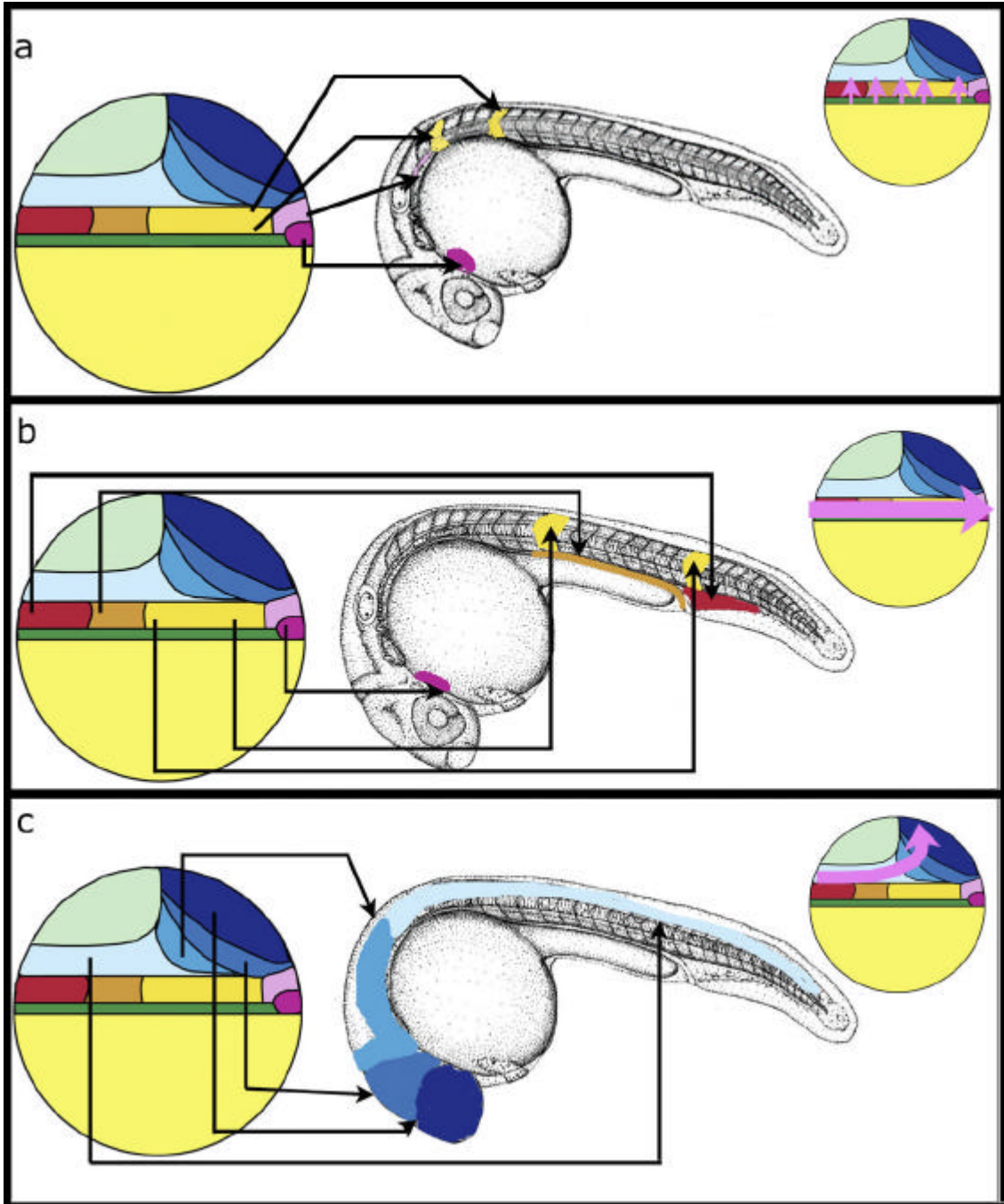
Chez le xénope, il a été récemment proposé que la voie Wnt/Ca<sup>2+</sup> utilisant le facteur de transcription NF-AT pourrait jouer ce rôle précoce (Itoh et Sokol, 1999; Kuhl *et al*, 2000; Saneyoshi *et al*, 2002). Chez le poisson zèbre, le gène *wnt8a* est exprimé dès la MBT au niveau de la YSL ventrale suggérant qu'une activité Wnt ventrale précoce existe. Cependant, les relations entre les signaux BMP et Wnt restent à être élucidées.

### **VI.3. Mise en place de l'axe animal-végétal (Fig.14c)**

Chez le poisson zèbre, la mise en place de l'axe animal - végétal repose en grande partie sur l'activité des facteurs Activin/Nodal. Au cours du stade blastula, les gènes Nodal *sqt* et *cyc* sont exprimés tout autour de la marge. Contrairement à l'activation dorsale de *sqt*, cette expression ne dépend pas de la  $\beta$ -catenin et est induite par un facteur maternel provenant du vitellus, d'origine inconnue (Mizuno *et al*, 1996).

Il est communément admis que les Nodal agissent de manière graduelle pour la détermination des cellules de la marge à l'origine de l'endoderme du mésoderme, avec la plus forte stimulation pour les cellules de l'endoderme et de la plaque préchordale. Cette donnée provient indépendamment d'approches génétiques et de sur-expression. En effet, la perte de fonction de la voie Nodal (double mutant *cyclops/squint*, mutant maternel-zygotique de *oep* et sur-expression de l'antagoniste Antivin1) conduit à la disparition totale de l'endoderme ainsi que de la majeure partie du mésoderme (Fig.15a,b; Feldman *et al*, 1998; Gristman *et al*, 1999; Gristman *et al*, 2000; Thisse *et al*, 2000). De plus, les facteurs Activin/Nodal agissent en tant que morphogènes et peuvent donc induire différents types de gènes en fonction de leur dose (Green *et al*, 1992; Gurdon *et al*, 1994; Chen et Schier, 2001).

Cependant plusieurs données indiquent que le spectre d'activité des facteurs Activin/Nodal ne se résume pas qu'à la détermination des cellules de la marge. En effet, la sur-expression de doses graduelles de l'inhibiteur compétitif Antivin1 conduit à la perte progressive des territoires de l'embryon le long de l'axe animal-végétal (Fig.15c,d; Thisse *et al*, 2000). Seul le territoire situé le plus au pôle animal, à l'origine du prosencéphale, est insensible à cette inhibition suggérant que ces cellules ne sont soumises à aucun signal Activin/Nodal (Fig.15d).



**Intro - Figure 16: Régionalisation antéro-postérieure du mésoderme et de l'ectoderme**

a,b: régionalisation A/P du mésoderme en début de gastrulation. a: au sein de la marge, plus une cellule a une position végétale, plus elle adoptera à 24hpf une position antérieure (comparer les cellules de la plaque préchordale en violet, et les cellules de la notochorde en rose). b: le long de l'axe dorso-ventral, plus une cellule est située ventralement, plus elle adoptera une position postérieure à 24hpf. Comparer le territoire du sang (en rouge) et de la plaque préchordale en violet). c: Par contre, en début de gastrulation, la régionalisation A/P du système nerveux est moins claire. Les cellules situées ventralement juste au dessus de la marge formeront les tissus neuraux les plus postérieurs (b). Les cellules situées au pôle animal se différencieront en système nerveux antérieur (b). Ainsi la régionalisation A/P du système nerveux en début de gastrulation est organisée selon une courbe partant du côté ventral au dessus de la marge et allant vers le pôle animal (b).

#### **VI.4 Mise en place de l'axe antéro-postérieur**

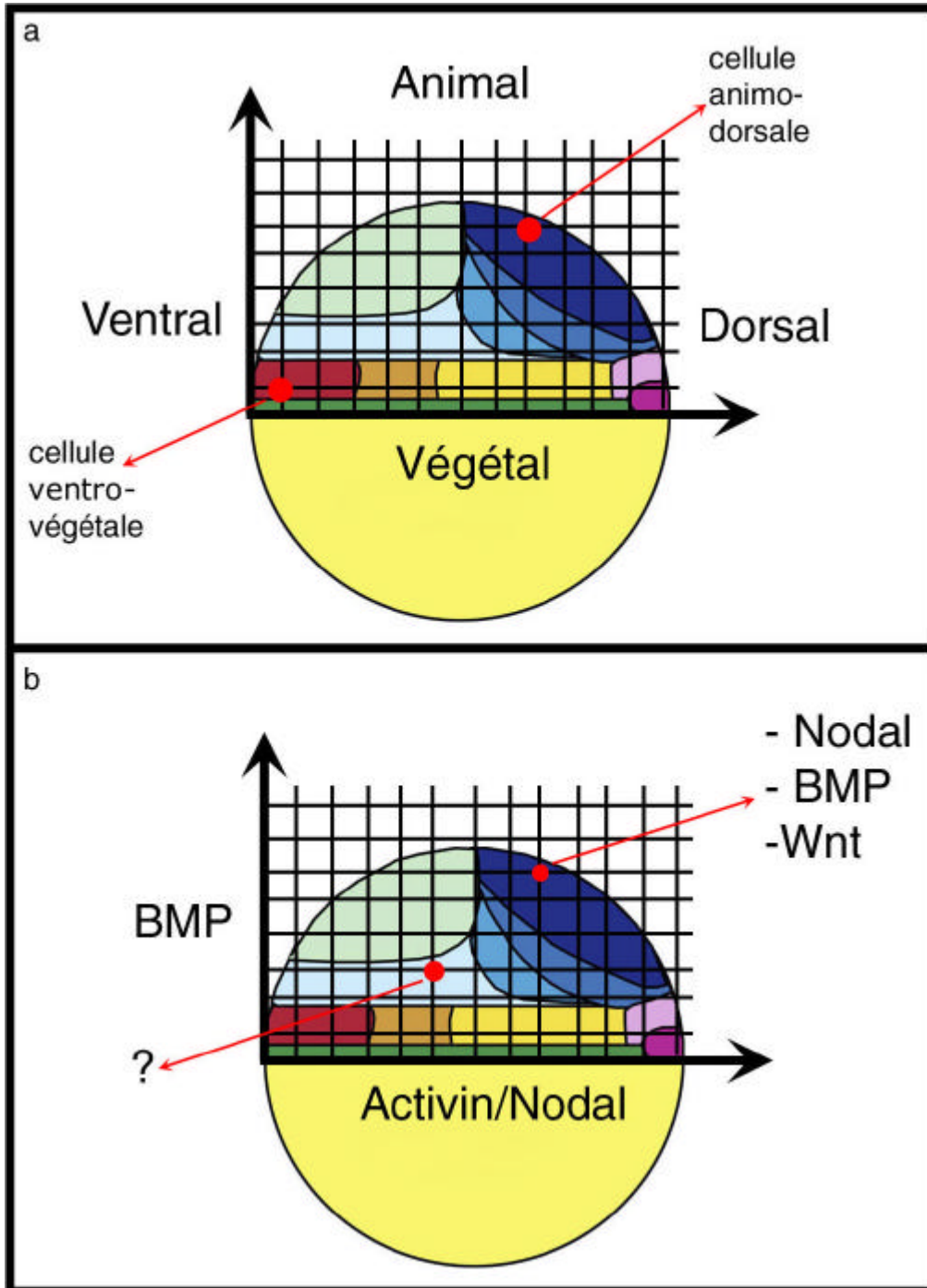
Chez le poisson zèbre, l'axe antéro-postérieur n'est clairement visualisable qu'en fin de gastrulation. Afin de comprendre la mise en place de l'axe antéro-postérieur, il est nécessaire de considérer le mésoderme et l'ectoderme de manière séparée.

Considérons tout d'abord le mésoderme. Au cours de la gastrulation, plus une cellule se trouve proche de la marge, plus elle va adopter une position antérieure (car elle sera la première à involuer sous l'épiblaste). Cela suggère donc que les régionalisations du mésoderme le long de l'axe A/P et de l'axe animal-végétal sont équivalentes (Fig.16a). Cependant, les cellules du mésoderme ne possèdent pas toutes les mêmes capacités de mouvements le long de l'axe dorso-ventral, ce qui introduit un biais. En effet, les cellules se situant vers le côté ventral ont tendance à adopter une position plus postérieure que les cellules latérales (Fig.16b). Par conséquent pour concevoir la régionalisation A/P du mésoderme il faut intégrer deux mouvements cellulaires complémentaires le long des axes D/V et A/V (Fig.16a,b).

En ce qui concerne l'ectoderme, la situation est différente, puisque plus la régionalisation antéro-postérieure de la plaque neurale correspond globalement à la régionalisation le long de l'axe animal-végétal, les cellules les plus animales se différenciant en territoires les plus antérieurs. Cependant cet alignement des deux axes n'est pas aussi parfait que cela car, au sein de la plaque neurale, il existe aussi une certaine distorsion le long de l'axe D/V: plus les cellules sont situées ventralement, plus elles participent à la formation du système nerveux postérieur. Il faut donc imaginer que l'axe antéro-postérieur au sein de la plaque neurale en début de gastrulation est organisé selon une courbe qui part depuis le côté ventral et qui va dorsalement vers le pôle animal (Fig.16b). Les cellules adoptent leur position finale correcte en fin de gastrulation par des mouvements de convergence vers le côté dorsal (Warga et Kimmel, 1990).

Ainsi les signalisations impliquées dans la détermination de l'axe dorso-ventral en début de gastrula influence aussi la régionalisation le long de l'axe antéro-postérieur. Cette superposition rend délicate l'interprétation des phénotypes à 24h.

Par ailleurs, la régionalisation antéro-postérieure de l'embryon fait intervenir d'autres voies de signalisation, dont les Wnt, les FGF et l'Acide Rétinoïque, qui jouent un rôle de postériorisation de la plaque neurale (Pour revue voir Appel, 2000 et Niehrs, 2004). Ces données seront détaillées en Partie III.



**Intro - Figure17: Information de position le long des axes D/V et A/V**

a: la détermination des axes dorso-ventral et animal-végétal se fait de manière indépendante. Les cellules au sein de l'embryon peuvent donc être identifiées selon deux coordonnées selon les deux axes. b: l'axe dorso-ventral est déterminé par la signalisation BMP et l'axe animal-végétal par la signalisation Activin/Nodal. La signalisation Wnt est requise pour la mise en place des axes dorso-ventral et antéro-postérieur. Par conséquent, une cellule est déterminée par différents niveaux de signalisation BMP, Nodal et Wnt.

## V. Problématique

Chez le poisson zèbre, plusieurs études suggèrent que les axes dorso-ventral et animal-végétal sont mis en place de manière indépendante pendant le stade blastula (Fürthauer *et al*, 1997; Thisse *et al*, 2000). Ceci signifie que toute modification des informations le long d'un axe ne perturbe pas la régionalisation des cellules le long de l'autre axe. Par conséquent, on peut postuler que les cellules au sein d'un embryon en fin de blastula sont définies par des coordonnées spatiales le long des axes animal-végétal et dorso-ventral (Fig.17a). Comme nous l'avons évoqué dans la section précédente, ces deux axes sont mis en place par des signaux BMP, Activin/Nodal et Wnt. Ainsi, une coordonnée spatiale correspond à un niveau de stimulation précis par les voies BMP, Activin/Nodal et Wnt (Fig.17b). Par exemple une cellule située au pôle animal ne reçoit ni signal BMP, Wnt ou Activin/Nodal (Fig.17b). A partir de ce modèle il convient donc de se demander comment une cellule soumise à différents niveaux de signalisation peut acquérir sa propre identité en intégrant ses signaux.

Dans la première partie de ce manuscrit, j'ai analysé l'importance du rétrocontrôle de la signalisation Nodal par les antagonistes sécrétés Antivin1 et Antivin2 pour la détermination des cellules le long de l'axe animal-végétal. J'ai montré que l'augmentation de la signalisation Nodal depuis leur site endogène de transcription n'affecte pas la régionalisation des cellules le long de l'axe dorso-ventral.

Dans une seconde partie j'ai étudié un facteur de transcription activé par la voie Nodal et essentiel pour la différenciation de l'endoderme. J'ai analysé le mécanisme moléculaire mis en jeu pour maintenir un haut niveau de signalisation Nodal dans ces cellules, requis pour la différenciation en endoderme.

Finalement, j'ai travaillé sur l'intégration des signalisations BMP, Nodal et Wnt dans les cellules situées le plus à la marge de l'embryon. J'ai montré que la triple stimulation d'un tissu par ces facteurs définissent l'activité du centre organisateur de la queue au sein des cellules de la marge ventrale.

***A une Mendiante Rousse***  
*(C.Baudelaire - La Tordue)*

*Blanche fille aux cheveux roux,  
dont la robe par les trous  
laisse voir la pauvreté  
et la beauté*

*Pour moi poète chétif,  
ton jeune corps maladif,  
plein de tâches de rousseur,  
à sa douceur*

*Tu portes plus galamment  
qu'une reine de roman  
ses cothurnes de velours  
tes sabots lourds*

*Au lieu d'un haillon trop court,  
qu'un superbe habit de cour  
traîne à plis bruyants et longs  
sur tes talons;*

*En place de bas troués  
que pour les yeux des roués  
sur ta jambe un poignard d'or  
reluise encor;*

*Que des nœuds mal attachés  
dévoilent pour nos péchés  
tes deux beaux seins radieux  
comme des yeux;*

*Que pour te déshabiller  
tes bras se fassent prier  
et chassent à coups mutins  
les doigts lutins*

*Perles de la plus belle eau  
sonnet de maître Belleau  
par tes galants mis aux fers  
sans cesse offerts ;*

*Valetaille de rimeurs  
te dédiant leurs primeurs  
en contemplant ton soulier  
sous l'escalier,*

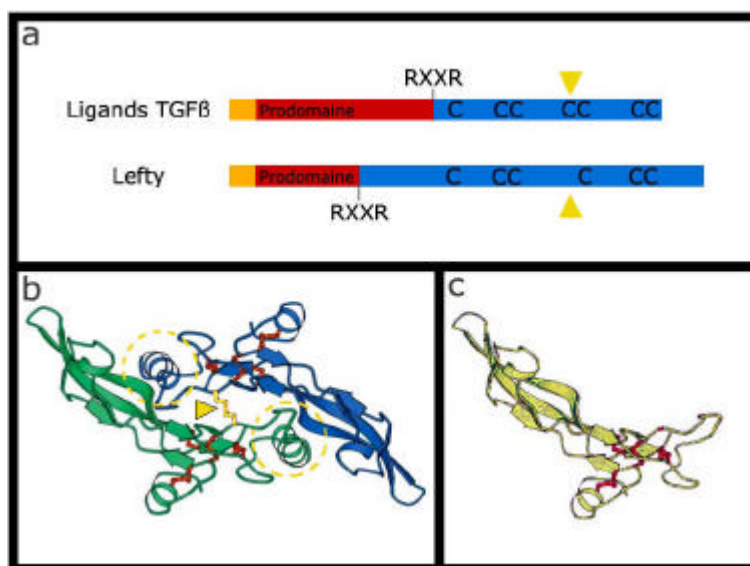
*Maint page épris du hasard  
maint seigneur et maint Ronsard  
épieraient pour le déduit  
ton frais réduit !*

*Tu compterais dans tes lits  
plus de baisers que de lys  
et rangerais sous tes lois  
plus d'un valois*

*Cependant tu vas gueusant  
quelque vieux débris gisant  
au seuil de quelques véfours  
de carrefour*

*Tu vas lorgnant en dessous  
des bijoux de vingt-neuf sous  
dont je ne puis, oh ! pardon !  
te faire don*

*Va donc sans autre ornement  
parfum, perles diamant,  
que ta maigre nudité,  
ô ma beauté*



**I-Figure 1: Les protéines Lefty sont des TGFβ ne pouvant former d'hétérodimères**

Les TGFβ forment des hétérodimères grâce à la 4<sup>e</sup> cystéine (flèche jaune en a et b) et à l'hélice alpha (cercle jaune en b). La taille du prodomaine est définie par le site consensus de clivage RXXR. Les protéines Lefty possèdent toutes les caractéristiques des TGFβ mais sont dépourvues de la 4<sup>e</sup> cystéine et de l'hélice alpha (triangle en a et c). Le site de clivage du prodomaine est plus proche de l'extrémité C-terminale. Figure adaptée de Shi et Massagué, 2002.

# **PARTIE I: Contribution des gènes *atv1* et *atv2* à la mise en place de l'axe animal-végétal**

## **I. Introduction: identification des protéines Lefty/Antivin**

### **I.1. Un TGFβ aux caractéristiques particulières**

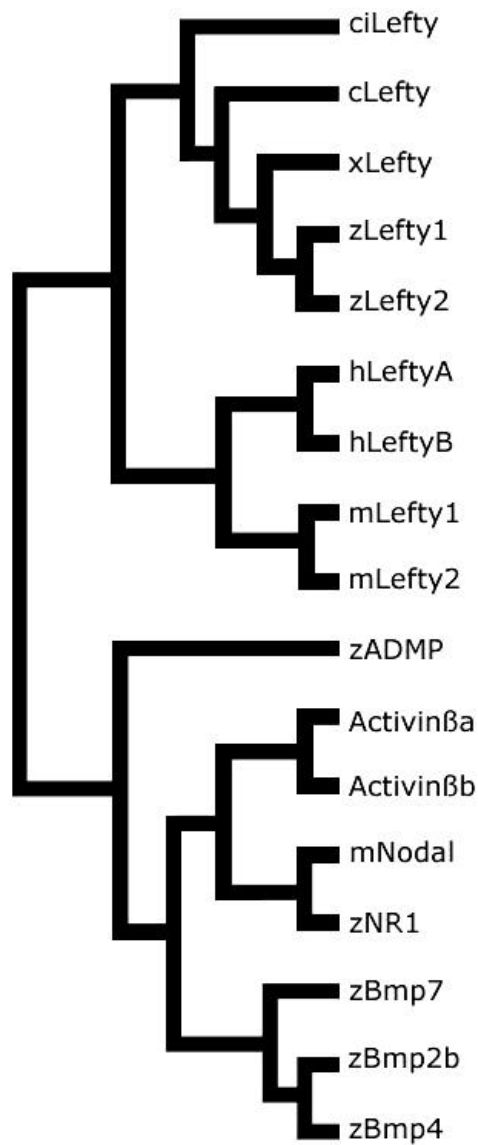
En 1996, lors d'un crible soustractif mené dans des cellules cancéreuses, l'équipe de H. Hamada a isolé le gène *lefty*, nouveau membre de la superfamille des TGFβ (Meno *et al*, 1996). Bien que possédant les caractères spécifiques des TGFβ (telles que les cystéines essentielles pour la formation du nœud cystéine), la protéine codée par ce gène présente des traits particuliers suggérant un mode d'action différent de celui des TGFβ classiques (Fig.1). En effet, parmi les sept cystéines caractéristiques de la superfamille des TGFβ, seules 6 sont conservées; la 4e cystéine, requise pour la dimérisation des ligands, est absente (Meno *et al*, 1996). La formation des dimères est d'autant plus impossible que l'hélice alpha située entre les cystéines 3 et 4 est absente (Thisse et Thisse, 1999). De plus, bien que la taille de l'ARNm soit plus ou moins équivalente à celle d'autres TGFβ, le peptide mature est plus grand, le site de clivage du pro-peptide se trouvant plus en amont de la protéine. Et enfin, alors que la séquence polypeptique C-terminale est conservée chez les autres TGFβ (CX<sub>1</sub>CX<sub>1</sub>), Lefty possède une extrémité plus longue: CX<sub>1</sub>CX<sub>13</sub> (Meno *et al*, 1996).

### **I.2. Conservation chez les Deutérostomiens**

Des homologues de *lefty* ont été clonés dans la plupart des organismes vertébrés étudiés. Deux gènes *lefty* (*lefty1* et 2) sont présents chez la souris (Meno *et al*, 1996, 1997), le poisson zèbre (Thisse et Thisse, 1999; Bisgrove *et al*, 1999) et l'homme (Yashiro *et al*, 2000), un seul chez le xénope (Cheng *et al*, 2000; Tanegashima *et al*, 2000), le poulet (Ishimaru *et al*, 2000), l'ascidie (Imai, 2003) et l'oursin (Duboc *et al*, 2004) (Fig. 2). Chez le poisson zèbre, ces gènes sont aussi nommés *antivin* (*atv*).

Toutes les caractéristiques décrites précédemment sont conservées dans tous les gènes isolés.





**I-Figure 2: La famille des protéines Lefty**

La construction d'un arbre phylogénétique avec différents représentants de la superfamille des TGFβ indique que les protéines Lefty constituent un groupe à part. Les protéines Lefty n'ont été clonées que dans des organismes Chordés. z=poisson zèbre (*Danio rerio*); m=souris (*Mus musculus*); h= Homme (*Homo sapiens*); x=xénope (*Xenopus laevis*); c=poulet (*Gallus gallus*); ci= ascidie (*Ciona intestinalis*).

### **I.3. Antagoniste compétitif des TGFβ**

#### **I.3.a Inhibition de la signalisation Activin/Nodal**

L'activité des protéines Lefty a été éclaircie par des expériences de sur-expression chez le poisson zèbre. En effet, l'injection de doses graduelles de l'ARN codant pour *lefty* conduit tout d'abord à la perte de l'endoderme et ensuite à celle du mésoderme (Bisgrove *et al*, 1999; Thisse et Thisse, 1999). La sur-expression de *atv/lefty* à des doses plus élevées perturbe par la suite le développement de l'ectoderme (Thisse *et al*, 2000).

Or les ligands TGFβ du type Activin ou Nodal ont une forte activité inductrice de mésoderme, suggérant que les protéines Lefty pourraient bloquer leur activité (Schier et Shen, 2000; Whitman 2001). En effet, alors que la sur-expression d'Activin ou de Nodal induit très fortement des gènes spécifiques du mésoderme et de l'endoderme, la co-injection de l'ARNm codant pour *lefty* bloque graduellement cette activité (Thisse et Thisse, 1999; Bisgrove et al, 1999; ).

Les protéines Lefty peuvent inhiber l'activité d'autres TGFβ tels que Vg1 et GDF1 (homologue de Vg1 chez la souris) (Cheng *et al*, 2004).

Bien que la compétition entre les protéines Lefty et Activin ait été décrite par plusieurs équipes indépendantes (Thisse et Thisse 1999, Cheng *et al* 2000, Ishimaru *et al* 2000, Tanegashima *et al* 2000), une étude récente a proposé que Lefty ne pouvait inhiber que Nodal, Vg1 et GDF1 et pas les ActivinβA et βB (Cheng *et al*, 2004). Cette différence demeure inexplicée.

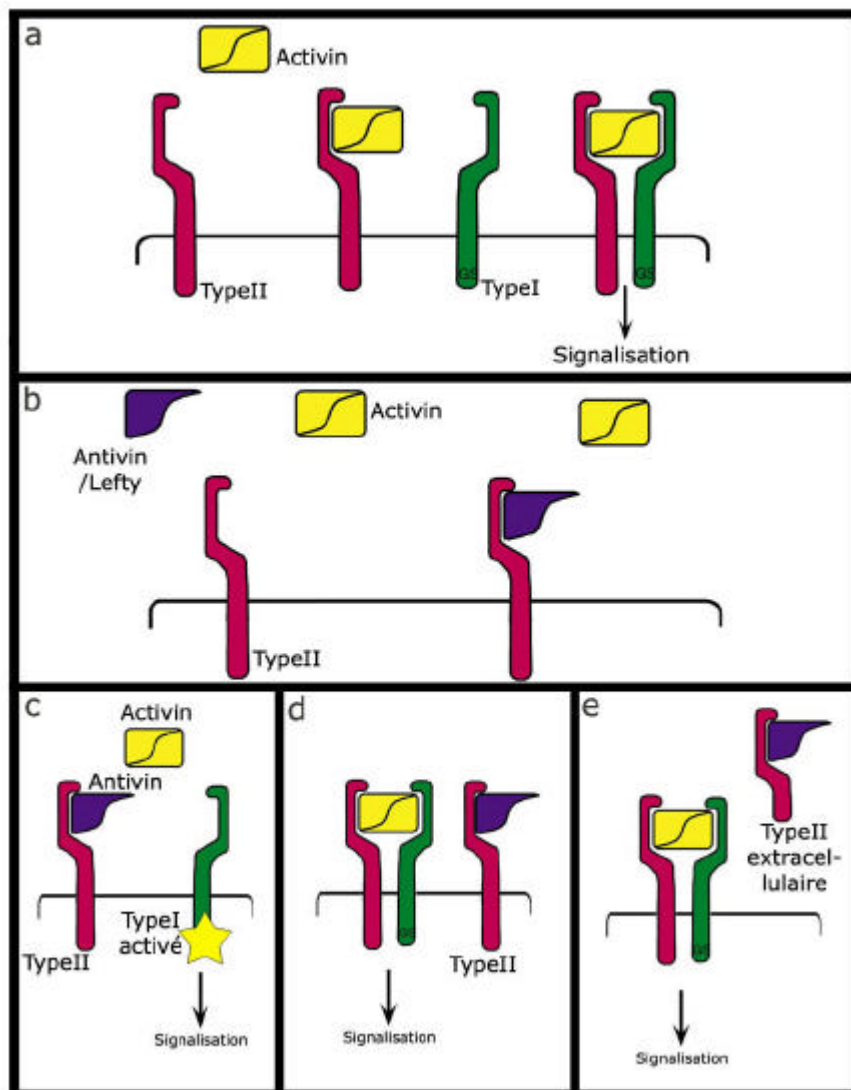
#### **I.3.b Mode d'action des protéines Lefty**

Puisque que les protéines Lefty sont des TGFβ ne pouvant former de dimères, cela suggère que ces molécules peuvent interagir avec les récepteurs sans les activer et donc inhiber l'activité Activin/Nodal (Fig.3a,b).

Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation de formes modifiées des récepteurs à l'Activin de type I (ARI) et de type II (ARII) (Thisse et Thisse, 1999; Meno *et al*, 1999).

En effet, dans des embryons injectés par Antivin1, la sur-expression d'une forme activée constitutive du récepteur de type IA (ARIA\*) permet de restaurer la formation du mésoderme, montrant qu'Antivin agit en amont du récepteur de type IA (Thisse et Thisse, 1999) (Fig.3c).

Le même résultat est obtenu après co-injection des ARNm codant pour Antivin1 et la partie extracellulaire du récepteur de type IIB (ActRIIB). Cette protéine tronquée est incapable de stimuler la signalisation Act/Nodal et ne peut interagir qu'avec des ligands TGFβ. Ainsi,



**I-Figure 3: Mécanismes d'action des antagonistes Antivin/Lefty**

Les ligands TGF $\beta$  de type Activin/Nodal se fixent au récepteur de type II qui recrute alors le récepteur de type I et permet la signalisation (a). Les protéines Antivin/Lefty ne peuvent former d'hétérodimères mais peuvent se fixer au récepteur de type II et empêcher l'interaction avec les ligands Activin/Nodal (b). La sur-expression d'une forme constitutivement activée du récepteur de type I permet de surpasser l'inhibition d'Antivin/Lefty en activant directement les Smad dans le cytoplasme (c). La sur-expression d'une forme sauvage ou tronquée du récepteur de type II permet de titrer les protéines Antivin/Lefty et assurer ainsi l'interaction des ligands Act/Nodal avec les récepteurs (d,e).

ARIIB pourrait titrer les protéines *Atv1* présentes dans le milieu extracellulaire et bloquer ainsi leur activité (Thisse et Thisse, 1999; Meno *et al*, 1999, Sakuma *et al*, 2002) (Fig.3d,e). Le modèle actuel postule que les protéines Antivin/Lefty peuvent bloquer la signalisation Activin/Nodal par compétition directe vis-à-vis du récepteur de type II (Fig.3b).

Récemment, il a été proposé que les protéines Lefty pourraient interagir directement avec Oep, co-récepteur des Nodal, et bloquer ainsi la signalisation Nodal sans affecter l'activité de l'Activin (Chen et Shen, 2004 ; Cheng *et al*, 2004). Cependant un tel modèle explique difficilement les résultats décrits ci-dessus. Ainsi le mode d'action exact des protéines *Atv/Lefty* reste à être précisé.

### **I.3.c Lefty rétro-inhibiteur**

Il a été montré chez la souris et le poisson que les gènes *atv/lefty* répondaient directement à la signalisation Activin/Nodal, suggérant qu'ils pourraient agir comme rétro-inhibiteurs. En effet l'expression de *atv1* est fortement induite après sur-expression d'un ligand Nodal et absente dans des mutants *MZoep* déficients pour toute signalisation Nodal (Meno *et al*, 1999).

De même, chez des souris dont le gène *lefty2* a été inactivé, des sites ectopiques d'expression de Nodal sont détectés, suggérant que l'activité de Lefty2 est requise pour restreindre le domaine d'expression de Nodal (Meno *et al*, 1999).

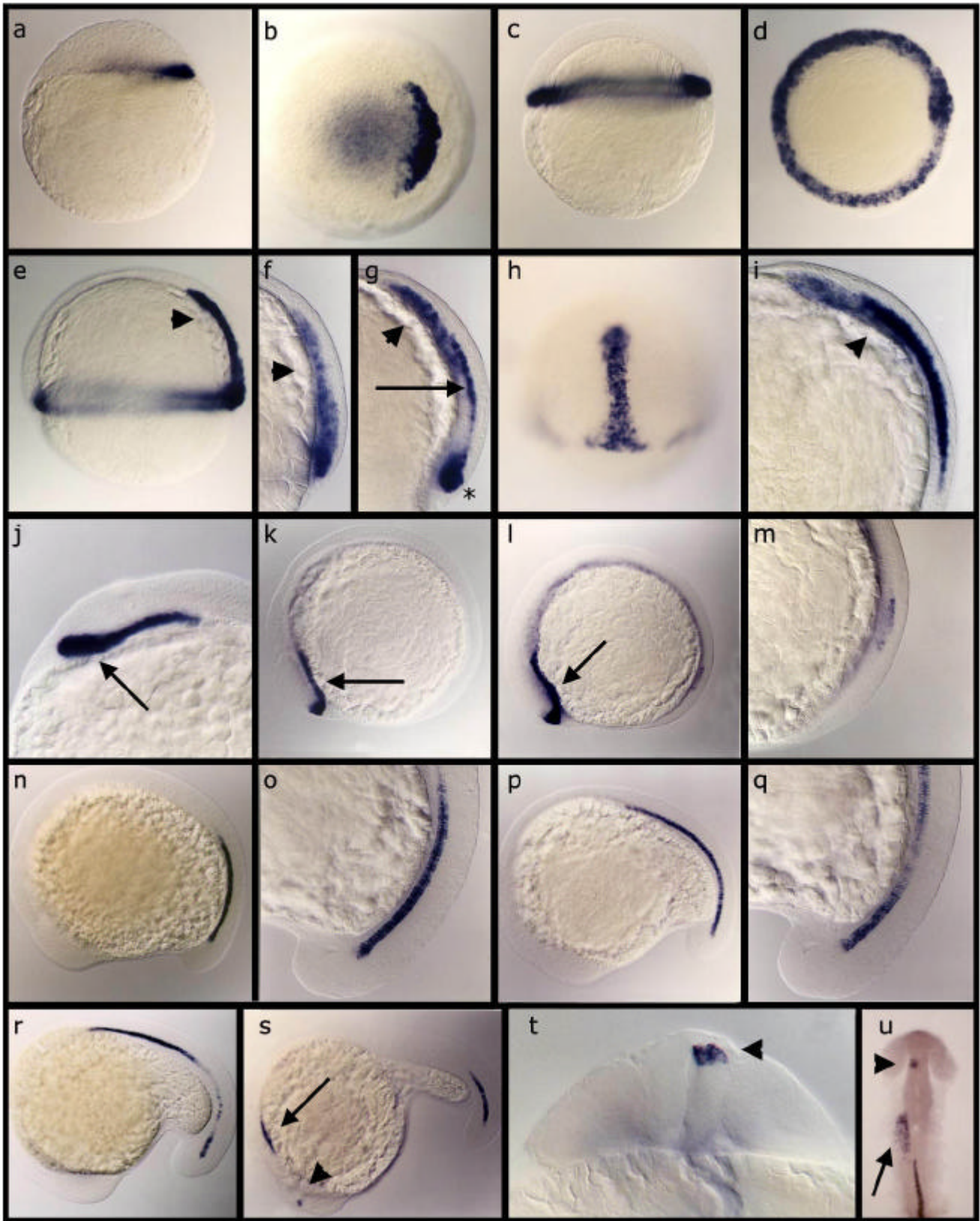
## **I.4. Les domaines d'expression des gènes *lefty***

### **I.4.a Chez la souris et le poulet, *lefty1* est exprimé dans les cellules du sillon primitif**

Les patrons d'expression de *lefty1* chez le poulet et la souris sont très similaires. Les transcrits de *lefty1* sont détectés en début de gastrulation au niveau du sillon primitif, zone d'involution des cellules au cours de la gastrulation. Pendant la gastrulation *lefty1* s'exprime dans le mésoderme axial ainsi que dans les cellules du nœud. En début de neurulation, l'expression de *lefty1* est détectée dans la plaque du plancher mais uniquement dans sa moitié gauche. Par la suite, *lefty1* s'exprime de façon asymétrique dans la partie gauche du mésoderme para-axial.

Chez la souris, *lefty1* est aussi exprimé dans l'endoderme viscéral dès la fin du stade blastula et pendant la gastrulation, territoire d'expression extra-embryonnaire non détecté chez le poulet.

*lefty2* s'exprime de manière très semblable à *lefty1*, sauf dans la plaque de plancher où il n'est pas détecté.



**I-Figure 4: Patron d'expression d'*antivin1***

*atv1* est exprimé dès le stade Sphère (4hpf) dans les cellules de la marge dorsale (a et b) puis tout autour de la marge juste avant la gastrulation (5,5hpf, c et d). En début de gastrulation (7hpf), *atv1* s'exprime dans le mésoderme axial (triangle en e et f). En cours de gastrulation cette expression est restreinte aux cellules de la plaque préchordale (triangle en g et i) ainsi qu'aux cellules de la marge dorsale (étoile en g). Quelques cellules précurseurs de la plaque du plancher expriment aussi *atv1* (flèche en g). En début de somitogénèse *atv1* s'exprime antérieurement dans les cellules du tube neural ventral (flèche en j-m) ainsi que dans quelques cellules de la notochorde postérieurement (m). En fin de somitogénèse, seul le domaine d'expression dans la notochorde postérieure est conservé (n-r). A 22h de développement, les cellules situées dans la partie gauche de l'habenula exprime *atv1* (triangle en s,t et u) ainsi que les cellules du mésoderme para-axial antérieur gauche (flèche en s et u).  
Orientations: a,c,e-g,i et j: vue latérale côté dorsal à droite; b et d: vue animale côté dorsal à droite; h: vue dorsale; k-s: vues latérales côté antérieur à gauche; t: coupe transversale, dorsal vers le haut; u: vue dorsale antérieur vers le haut.

#### **I.4.b Les territoires d'expression des gènes *Atv1* et *Atv2* chez le poisson zèbre**

*antivin1* (*atv1*) s'exprime dès le stade Sphère au niveau des cellules marginales dorsales (Fig.4a,b). En fin de stade blastula, les transcrits sont détectés tout autour de la marge (Fig.4c,d). Pendant la gastrulation, l'expression d'*atv1* est toujours visible autour de la marge ainsi que dans le mésoderme axial (Fig.4e-i). Il est possible de distinguer une forte expression dans la plaque préchordale et la marge dorsale ainsi que dans l'ectoderme situé juste au-dessus de l'axe (Fig.4g). En fin de gastrulation, seule la partie ventrale du prosencéphale présomptif continue d'exprimer *atv1* (Fig.4j,k). Cette expression disparaît en cours de somitogenèse alors que les cellules notochordales expriment *atv1* (d'abord postérieurement, puis antérieurement). En fin de somitogenèse, deux nouveaux domaines d'expression sont détectés, l'un dans le primordium cardiaque gauche, l'autre dans la partie gauche d'un noyau diencéphalique dorsal (l'habénula) (Fig.4s-u). A 24h de développement, *atv1* n'est plus exprimé (Thisse et Thisse, 1999).

Le patron d'expression d'*atv2* est très similaire à celui d'*atv1* (Bisgrove *et al*, 1999; Thisse *et al*, 2001). Cependant, au stade sphère, *atv2* est exprimé tout autour de la marge très faiblement (Fig.5a-f). De plus, en cours de gastrulation l'expression de *atv2* est maintenue tout le long du mésoderme axial, mais s'éteint en début de somitogenèse (Fig.5g-n). Les transcrits ne sont détectés qu'après le stade 20 somites au niveau du primordium cardiaque, du côté gauche (Fig.5o-s).

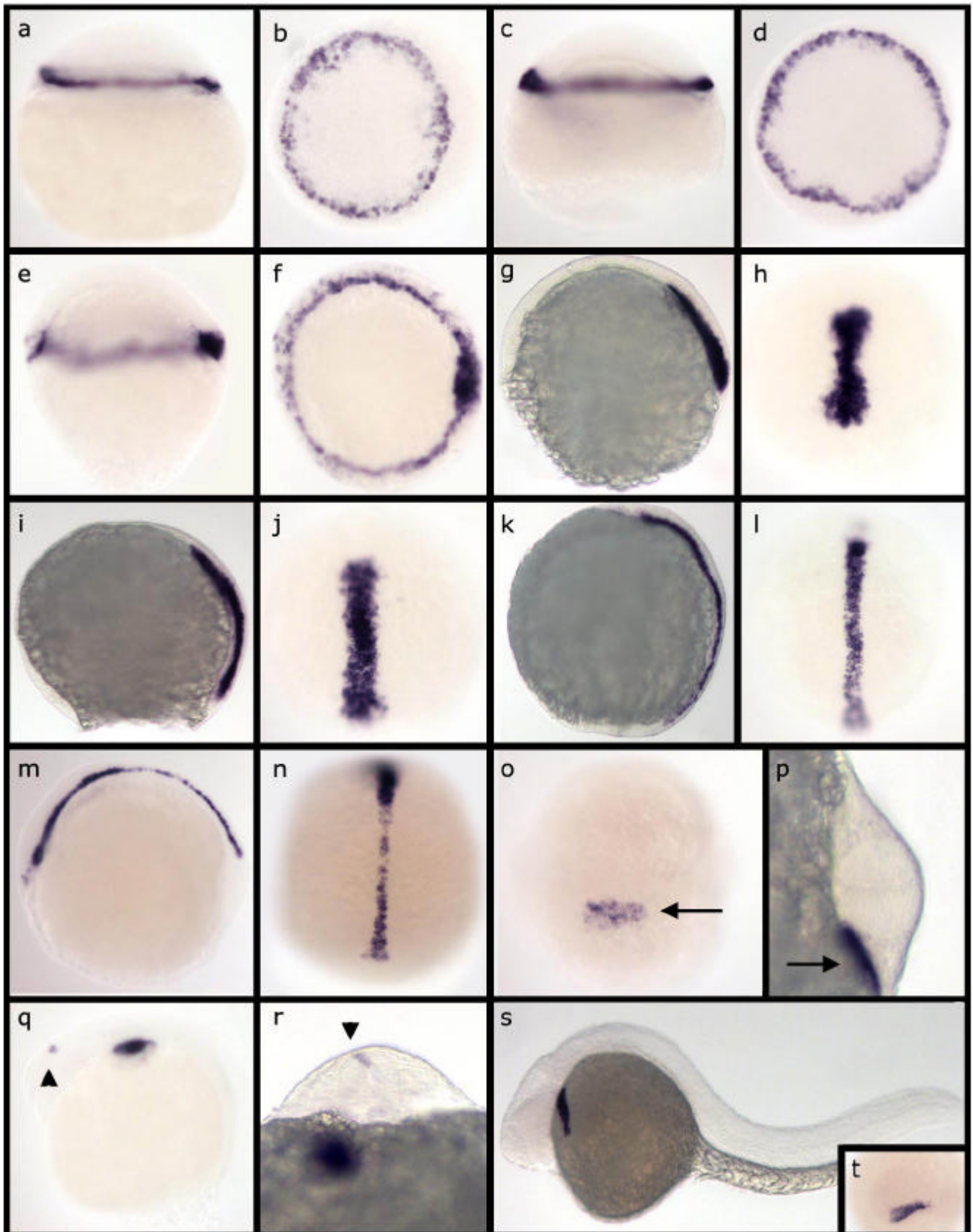
#### **I.4.c Conservation des domaines d'expression**

Chez le xénope, le gène *atv* a un patron d'expression similaire à celui des gènes *atv* décrits chez le poisson zèbre (zone marginale, notochorde, mésoderme para-axial gauche)(Cheng *et al*, 2000; Tanegashima *et al*, 2000).

Ainsi les domaines d'expression des gènes *atv/lefty* possèdent des caractéristiques communes suggérant la conservation de leur activité au cours du développement embryonnaire

Tous ces gènes s'expriment dans la zone d'involution en début de gastrulation (sillon primitif, marge et zone marginale), dans le mésoderme axial pendant la gastrulation et de manière asymétrique du côté gauche pendant la neurulation.

Il est aussi à noter que les gènes *atv/lefty* sont co-exprimés avec les gènes nodal (zone d'involution, notochorde, expression asymétrique) chez tous les organismes cités. Ceci



### **I-Figure 5: Patron d'expression d'*antivin2***

*atv2* est exprimé dès le stade sphère dans toutes les cellules de la marge jusqu'en début de gastrulation (a-f). En cours de gastrulation, l'expression d'*atv2* est détectée dans les cellules du mésoderme axial et y est maintenue jusqu'en début de somitogenèse (g-n). En fin de somitogenèse, *atv2* s'exprime dans la partie antérieure gauche du mésoderme para-axial (flèche en o et p), puis dans la partie gauche de l'habenule (triangle en q et r). A 24h de développement, *atv2* s'exprime uniquement dans le priordium cardiaque (flèche en s et t).

**Stades:** a,b: Stade Sphère (4hpf); c,d: 30% epibolie (5hpf); e,f: Shield (6hpf); g,h: 60% epibolie (7hpf) ; i,j: 90% epibolie (9hpf); k,l: 100% epibolie (10hpf); m,n: 5 somites (12hpf); o,p: 20somites (18hpf);q,r: 24 somites (18hpf); s,t: 24hpf.

**Orientation:** a,c,e,g,i,k: vues latérales, côté dorsal à droite; b,d,f: vues animales côté dorsal à droite; h,j,l,n: vues dorsales antérieur vers le haut; m,q,s: vues latérales antérieur vers la gauche; o,t: vues dorsales antérieur vers la gauche; p: coupe transversale dorsal à droite; r: coupe transversale dorsal vers le haut.

renforce l'hypothèse concernant le rôle de ces protéines en tant que rétro-inhibiteurs des facteurs Nodal.

### **I.5. Rôle des gènes *lefty* au cours de l'embryogenèse**

La plupart des études menées avec les gènes *lefty* ont été réalisées antérieurement par sur-expression, sauf chez la souris où l'inactivation des gènes *lefty1* et *lefty2* a été décrite par l'équipe de H. Hamada.

#### **I.5.a Les protéines Lefty contrôlent la mise en place de l'asymétrie droite-gauche**

Les souris mutantes pour le gène *lefty1* n'ont pas de défauts au cours de la gastrulation mais présentent des altérations de leur asymétrie droite-gauche (Meno *et al*, 1998). Ces défauts de latéralisation sont caractérisés par des inversions de positionnement des organes (cœur ou foie) ainsi que par une expression anormale des gènes exprimés normalement de manière asymétrique (tels que *nodal* ou *pitx2*). De même la délétion de la région régulatrice contrôlant l'expression de *lefty2* du côté gauche du mésoderme para-axial, produit les mêmes phénotypes (Meno *et al*, 2001). Dans les deux cas, *nodal* s'exprime de manière ectopique et stimule ainsi les cellules du côté droit de l'embryon.

Ainsi les gènes *lefty1* et *lefty2* sont requis pour maintenir l'expression de *nodal* du côté gauche de l'embryon afin de déterminer l'asymétrie droite-gauche.

#### **I.5.b Lefty2 et la formation du mésoderme**

L'inactivation totale du gène *lefty2* chez la souris entraîne des défauts sévères lors de la gastrulation, dus à la formation d'un excès de mésoderme. Des malformations similaires sont observées par une sur-stimulation de la voie Nodal. En effet, des souris *lefty2*<sup>-/-</sup>;*nodal*<sup>+/-</sup> présentent des défauts beaucoup plus faibles que les souris *lefty2*<sup>-/-</sup>;*nodal*<sup>+/+</sup> suggérant que l'excès de mésoderme est dépendant du niveau d'activité de *Nodal* (Meno *et al*, 1999).

Cette hypothèse est renforcée par le phénotype des souris mutantes *nodal*<sup>-/-</sup> qui sont dépourvues de mésoderme et possèdent donc un phénotype inverse aux souris *lefty2*<sup>-/-</sup> (Colon *et al*, 1994).

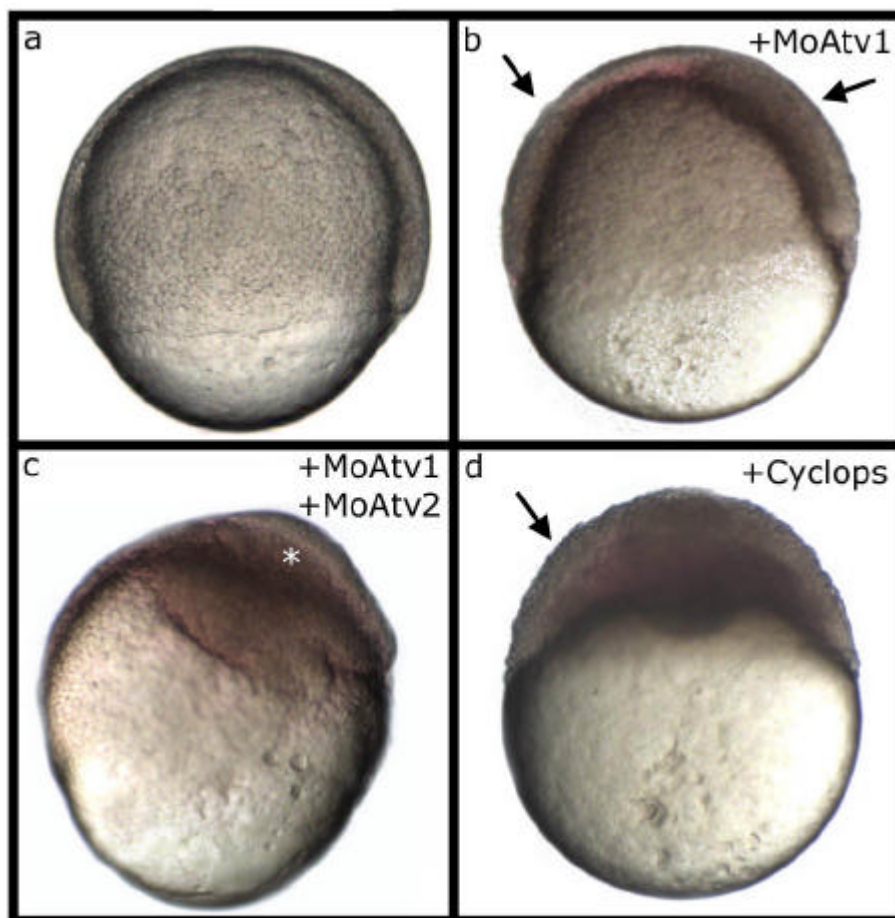
Ainsi, au cours de l'embryogenèse, il apparaît que *lefty2* contrôle la signalisation Nodal au moment de la gastrulation et que *lefty1* et *lefty2* sont requis pour la mise en place de l'asymétrie droite - gauche.



### **I.5.c Le rôles des gènes *lefty* chez le poisson zèbre**

Chez le poisson zèbre, il a été clairement établi par plusieurs équipes que les gènes *nodal* sont requis précocement le long de l'axe animal-végétal pour la détermination de l'endoderme et du mésoderme (Schier et Shen, 2000; Whitman et al, 2001).

Même si la sur-expression des gènes *atv1* et *atv2* bloque la différenciation de ces tissus (Bisgrove *et al*, 1999; Thisse et Thisse, 1999; Thisse *et al*, 2000), il n'était pas établi que le rôle de ces gènes soit essentiel *in vivo* pour contrôler la signalisation Nodal au moment la mise en place de l'endoderme et du mésoderme.



**I-Figure 6: Effet de l'injection des morpholinos MoAtv1 et MoAtv2 et de la sur-expression de Cyclops en cours de gastrulation.**

Dans les embryons injectés par le MoAtv1, le blastoderme est épaissi (flèche en b). La double injection de deux morpholinos déforme complètement l'embryon et les cellules forment un amas au pôle animal (étoile en c). La sur-expression de Cyclops épaissit très fortement le blastoderme (flèche en d). Stades et orientations: Tous les embryons ont été photographiés en milieu de gastrulation et sont en vue latérale.

## **II. Résultats: contribution des antagonistes Atv1 et Atv2 à la mise en place des feuillets embryonnaires**

### **II.1. Les gènes Atv1 et Atv2 sont essentiels pour la détermination de l'endoderme et du mésoderme chez le poisson zèbre.**

Afin d'analyser le rôle des gènes *antivin1* et *antivin2* chez le poisson zèbre au cours de la mise en place des feuillets embryonnaires, j'ai étudié l'effet d'une perte de fonction de ces gènes en utilisant les morpholinos pour bloquer leur traduction (Nasevicius et Ekker, 2000).

#### **II.1.a L'utilisation des morpholinos® (GeneTools)**

Les morpholinos sont des oligonucléotides anti-sens dont le squelette ribose-phosphate a été modifié. Le ribose est remplacé par un cycle à 6 atomes (cycle morpholine) sur lequel sont fixées les bases azotées. Les liaisons phosphates sont aussi modifiées. Cette composition chimique particulière rend l'oligonucléotide très stable et résistant aux DNase ou RNase.

Pour réaliser des pertes de fonction, le morpholino est synthétisé pour s'hybrider sur une vingtaine de paires de bases dans la partie 5' de l'ARNm. Une fois introduit dans les cellules, le morpholino se lie à l'ARN cible et empêche la formation ou la progression du ribosome, bloquant ainsi la traduction en protéine. Ces molécules permettent de réaliser une perte de fonction reproductible et spécifique par simple injection du produit dans l'embryon au stade 1-2 cellules.

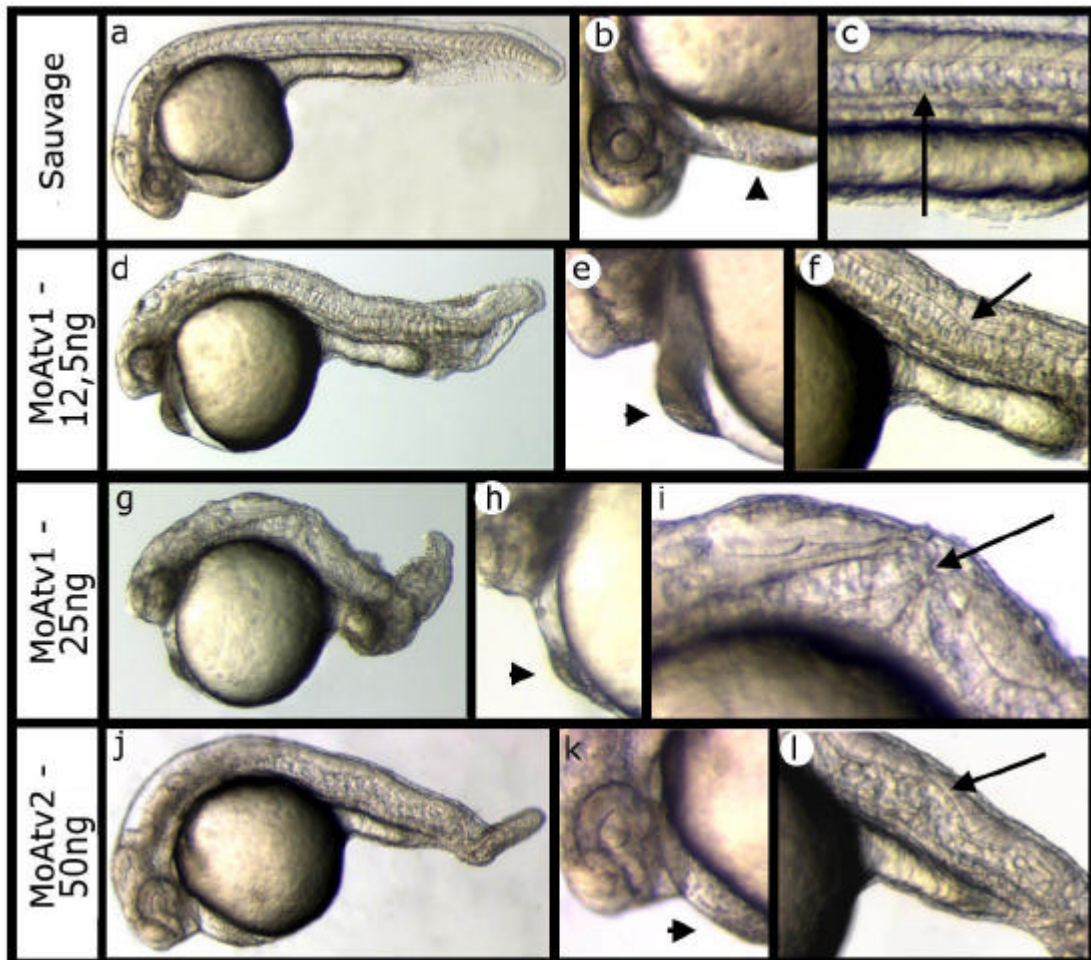
Nous avons utilisé deux morpholinos dirigés contre les gènes *atv1* et *atv2*, en amont de l'ATG initiateur, et nous les avons injectés au stade 1-2 cellules (voir Matériel et Méthode).

#### **II.1.b La perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* mime la sur-expression de Nodal**

Pour chaque gène, j'ai injecté une gamme du morpholino correspondant (12,5ng, 25ng et 50ng) afin d'observer les phénotypes obtenus après la perte de fonction d'*atv1* ou *atv2*.

##### **II.1.b.1 La perte de fonction d'*atv1* ou d'*atv2* perturbe la gastrulation**

L'injection du morpholino dirigé contre Atv1 (MoAtv1) produit des malformations visibles dès la gastrulation. Le blastoderme apparaît plus épais et la marge de l'embryon peut présenter des déformations (Fig.6a,b). Le taux de mortalité à 24h de développement est de l'ordre de



**I-Figure 7: Effet de l'injection des morpholinos MoAtv1 et MoAtv2 à 24hpf**

Les embryons injectés avec 12,5ng ou 25 ng de MoAtv1 ou 50ng de MoAtv2 ont une taille plus courte, une glande d'éclosion hypertrophiée (comparer b,e,h,k) et une notochorde ondulée (comparer c,f,i,l). Stades et orientations: Tous les embryons ont été photographiés à 24hpf et sont en vue latérale, côté antérieur vers la gauche.

35% des embryons (Table1), mais atteint plus de 90% de la population pour les doses les plus fortes (50ng). A 24h de développement après l'injection de 12,5ng et 25ng de MoAtv1 les embryons ont un axe embryonnaire plus court et globalement déformé. La glande d'éclosion, territoire dérivant de la plaque préchordale, est hypertrophiée. La notochorde est ondulée sur toute la longueur de l'animal (Fig.7a-i). Une telle observation suggère que les cellules notochordales sont en excès par rapport à la taille de l'embryon. En effet, chez les embryons sauvages, la notochorde est parallèle à l'axe embryonnaire et est présente depuis le tronc jusque dans la queue. Si la taille de l'embryon est trop courte par rapport au nombre de cellules de la notochorde, alors cette dernière ne peut s'allonger correctement et est déformée tout le long de l'animal.

Cela indique que dans des embryons injectés par MoAtv1 tout le mésoderme axial (plaque préchordale et notochorde) est hypertrophié. Les quelques embryons qui survivent après injection de 50ng de MoAtv1 ont tous de fortes malformations dont une absence de queue et une tête réduite. La notochorde et la plaque préchordale sont toujours hypertrophiées (non montré).

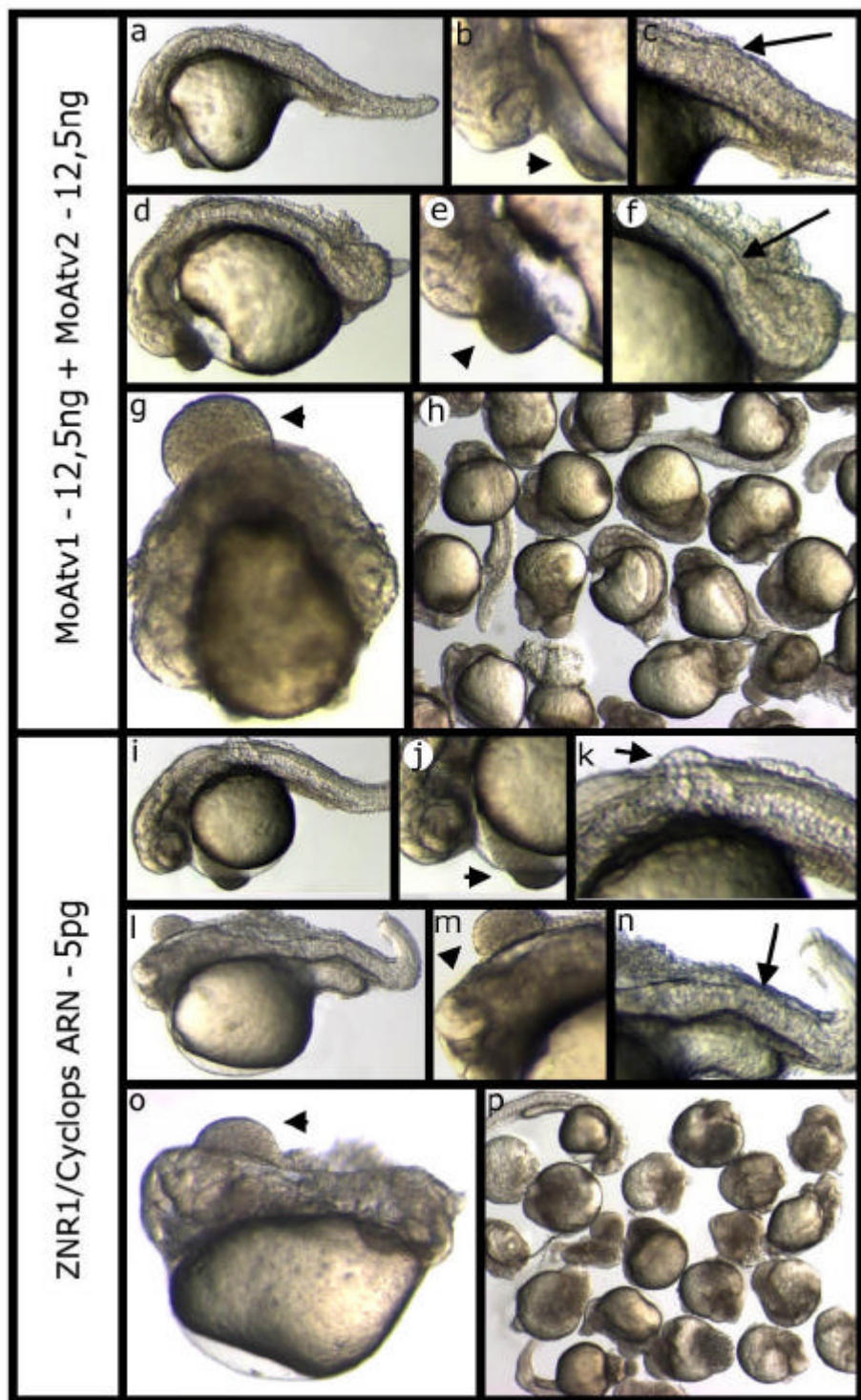
L'injection du morpholino dirigé contre *atv2* (MoAtv2) produit le même type de phénotype, bien que les effets soient plus faibles (Fig.7j-l). En effet, la mortalité est moins forte (voir Table) et les déformations à 24h sont moins prononcées, même à la dose la plus forte (50ng).

### **II.1.b.2 Les gènes *atv1* et *atv2* ont une activité redondante**

Afin d'analyser si les gènes *atv1* et *atv2* possèdent des activités redondantes, j'ai réalisé une double inactivation en injectant les morpholinos MoAtv1 et MoAtv2, à des concentrations pour lesquelles leur simple injection ne produit que peu d'effets (12,5ng chacun).

La double injection induit chez les embryons des malformations très sévères au cours de la gastrulation. Une énorme masse de cellules se trouve au pôle animal et la marge de l'embryon est fortement déformée (Fig.6c). A 24h, la mortalité est beaucoup plus grande (97,2% n=173) que pour les simples injections. Les embryons qui parviennent à se développer jusqu'à 24h ont des anomalies de développement très sévères (Fig.8a-h). Alors que le développement de la queue est fortement perturbé, au niveau troncal, la notochorde est largement hypertrophiée et présente des ondulations (Fig.8c,f). De plus, la glande d'éclosion est très élargie. La tête des individus est aussi affectée. Certains embryons n'ont plus aucune structure reconnaissable, mis à part des cellules de type glande d'éclosion (Fig.8g).

Ainsi la double perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* produit un phénotype similaire aux simples injections, mais beaucoup plus fort et pénétrant. Cela suggère que les gènes *atv1* et



**I-Figure 8: Effet de l'injection des morpholinos MoAtv1 + MoAtv2 et de la sur-expression de Cyclops à 24 hpf**

Les embryons injectés par 12,5ng de MoAtv1 et MoAtv2 ou sur-exprimant Cyclops présentent une hypertrophie de la glande d'éclosion (triangle en h,e,g,i,j,m,o) et une notochorde fortement ondulée et agrandie (flèche en c,f,k,n). Une forte proportion de la population présente des malformations sévères (g,h,o,p). Stades et orientations: Tous les embryons ont été photographiés à 24hpf en vue latérale, côté antérieur à gauche.

*atv2* agissent de manière redondante au cours de la gastrulation. Il semble que leurs rôles respectifs ne soient pas identiques puisque la perte de fonction d'*atv2* est moins sévère que celle d'*atv1*. Il n'est cependant pas exclu que l'efficacité des deux morpholinos ne soit pas identique, induisant éventuellement un biais expérimental.

### **II.1.b.3 La sur-expression de Nodal mime l'injection de MoAtv1 et MoAtv2**

Il a été établi chez la souris que les gènes *antivin/lefty* jouent un rôle de rétro-inhibiteur de nodal. Ainsi la perte de fonction des gènes *atv/lefty* correspond à un gain de fonction d'activité Nodal. Pour étudier ce point chez le poisson zèbre, j'ai injecté l'ARNm codant pour *cyclops* et comparé les phénotypes obtenus avec ceux générés après injections des MoAtv1 et MoAtv2. Les embryons sur-exprimant *cyclops* ont des malformations au cours de la gastrulation et à 24h, qui ressemblent à celles obtenues après injections des MoAtv1 et MoAtv2 (Fig.6d). Ces défauts de développement ainsi que la mortalité à 24h dépendent de la dose d'ARNm injecté (voir Table). Notamment, l'injection de 125pg d'ARNm conduit à 74,4% de mortalité et les survivants ont une hypertrophie de la notochorde et de la glande d'éclosion (Fig.8i-p). De plus, le développement de la queue est altéré.

Ainsi la sur-expression de *cyclops* mime la perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2*. Cela suggère que les phénotypes obtenus après injection des deux morpholinos résultent d'une augmentation de la signalisation Nodal.

### **II.1.c Quantification des effets en cours de gastrulation**

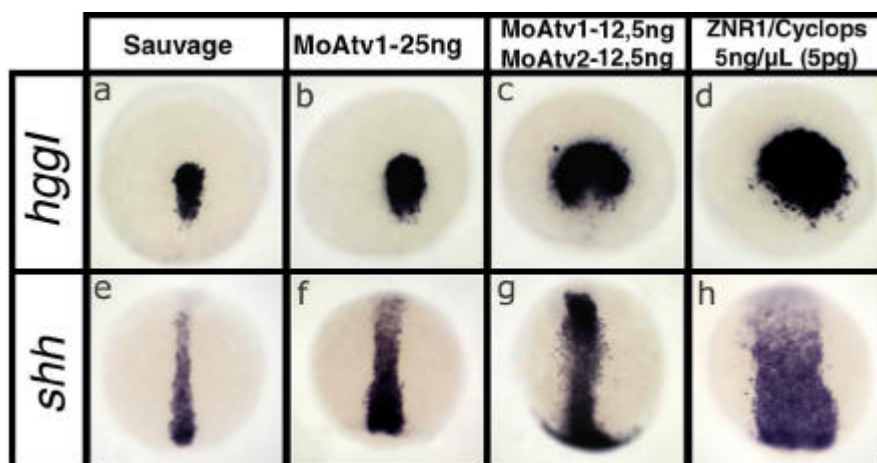
Afin de comparer la pénétrance des phénotypes obtenus, j'ai réalisé des séries d'injection de l'ARNm codant pour *cyclops* et des morpholinos MoAtv1 et MoAtv2 seuls ou combinés. Les embryons ont été fixés en cours de gastrulation et analysés par hybridation *in situ* avec deux marqueurs moléculaires dont l'expression permet de visualiser le mésoderme axial. J'ai utilisé les gènes *hgg1* et *shh* exprimés respectivement dans la glande d'éclosion et la notochorde, territoires qui apparaissent hypertrophiés à 24h dans les embryons injectés (Fig.9 et Table).

Les résultats obtenus confirment les observations faites précédemment à 24h. En effet, après la simple injection de MoAtv1 ou MoAtv2 à la dose la plus forte (50ng), 36,4% (n=120) et 20,7% (n=140) de la population présente un élargissement de la plaque préchordale. La double injection des morpholinos (12,5ng+12,5ng) provoque ce phénotype dans toute la population (100%, n=102) (Table1; Fig.9a-c). De même, le territoire d'expression de *shh* est élargi chez 73,5% (n=117) et 58,7% (n=157) des embryons après injection des morpholinos MoAtv1 et MoAtv2 respectivement (50ng). Après double injection (12,5ng+12,5ng), 95,1%

	<b>Plaques préchordales</b>	<b>Notochorde</b>		<b>Mortalité à 24h</b>
	<b>élargie (en %)</b>	<b>élargie (en %)</b>		<b>(en %)</b>
MoAtv1 (12.5ng)	19.4 (51/263)	42.9 (84/195)		35.6 (57/161)
MoAtv1 (25ng)	40.0 (60/150)	45.6 (78/171)		38.1 (85/224)
MoAtv1 (50ng)	36.4 (44/120)	73.5 (86/117)		96 (139/145)
MoAtv2 (12.5ng)	18.0 (50/278)	35.1 (37/105)		8.5 (11/129)
MoAtv2 (25ng)	17.0 (52/306)	51.9 (54/104)		16.1 (25/155)
MoAtv2 (50ng)	20.7 (58/280)	58.7 (92/157)		28.6 (53/185)
MoAtv1 (12.5ng)+MoAtv2 (12.5ng)	100.0 (102/102)	95.1 (122/128)		97.2 (168/173)
+ Atv1 sense RNA (5ng)	90.1 (120/133)	96.7 (120/124)		86.2 (112/130)
+ Atv1 sense RNA (25ng)	70.0 (99/141)	68.6 (99/144)		8.5 (16/188)
+ Atv1 sense RNA (125ng)	24.0 (25/104)	50.0 (63/126)		5.7 (8/140)
Znr1 sense RNA (5pg)	19.1 (47/246)	61.7 (94/152)		14.3 (24/168)
Znr1 sense RNA (25pg)	65.4 (78/119)	100.0 (114/114)		68.4 (134/196)
Znr1 sense RNA (125pg)	100.0 (112/112)	100.0 (161/161)		74.4 (116/156)

**I - Table: Effet dose - réponse de la perte de fonction des gènes *atv* et récupération du phénotype**

Les phénotypes des embryons après les différents traitements ont été analysés par quantification des embryons présentant un territoire hypertrophié de la plaque préchordale (marqué par *hgg1* - colonne 1) et de la notochorde (marquée par *shh* - colonne 2) en milieu de gastrulation. Pour chaque combinaison, le nombre d'embryon injectés survivant à 24h a été reportés (colonne 3). Les résultats sont données en pourcentage avec le s valeur absolue sentre parenthèses



**I-Figure 9: Effets de l'injection des MoAtv1 et MoAtv2 et de la sur-expression de Cyclops sur le mésoderme axial en cours de gastrulation**

Tous les embryons sont vue dorsale pôle animal vers le haut.



de la population présente un territoire notochordal hypertrophié (Table 1; Fig.9e-g). De manière similaire, la sur-expression de l'ARNm codant pour *cyclops* induit fortement ces deux marqueurs pour toutes les doses utilisées (Table1; Fig.9d,h).

Ainsi la perte de fonction d'*atv1* et *atv2* élargit le mésoderme axial, et l'augmentation de la force du phénotype dans les doubles perte de fonction montre leur activité est partiellement redondante. Les phénotypes obtenus sont similaires à ceux d'un gain d'activité Nodal, suggérant qu'ils résultent de l'absence de rétrocontrôle négatif des molécules Atv vers les facteurs Nodal.

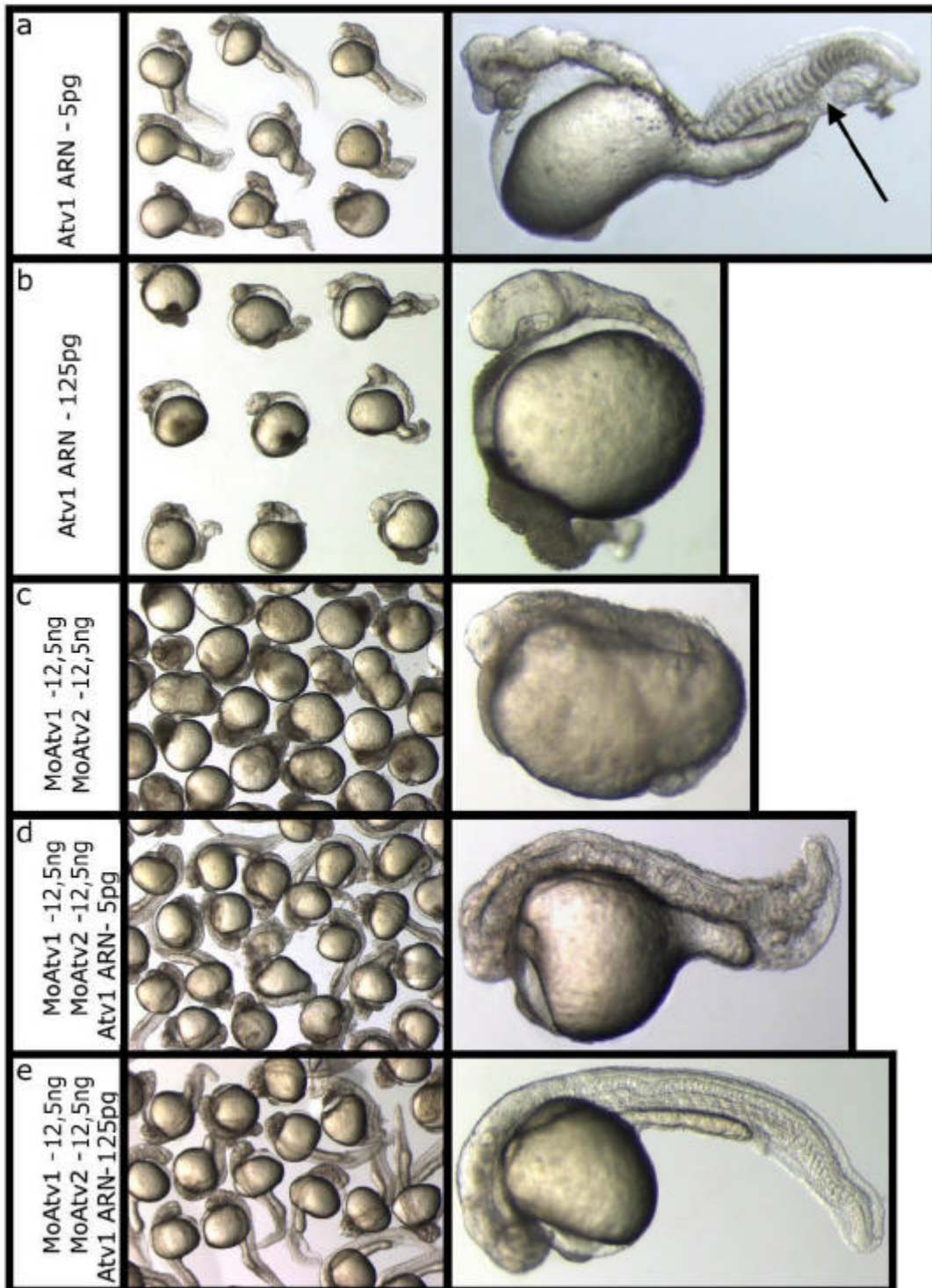
#### **II.1.d Spécificité des morpholinos**

En l'absence de mutants génétiques déficients pour les gènes *atv1* et *atv2*, il est nécessaire de vérifier la spécificité des phénotypes obtenus par les injections des morpholinos. En effet, il est possible que les morpholinos interfèrent avec d'autres ARN et perturbe ainsi de manière non-spécifique le développement embryonnaire. Pour cela, j'ai réalisé des expériences de sauvetage du phénotype de perte de fonction. L'ARNm codant pour le gène *atv1* a été co-injecté avec les deux morpholinos MoAtv1 (12,5ng) et MoAtv2 (12,5ng), et les phénotypes obtenus ont été analysés morphologiquement et par hybridation *in situ*.

L'injection de doses croissantes de l'ARNm codant pour *atv1* avec les deux morpholinos réduit de manière graduelle la mortalité et permet de restaurer l'expression sauvage des gènes *shh* (50% n=126) et *hgg1* (76%, n=104) (voir Table).

A un jour de développement, l'injection de 5ng d'ARNm codant pour *atv1* conduit à un blocage de la différenciation de l'endoderme et d'une partie du mésoderme (Fig.10a), alors qu'à une dose plus élevée (125pg), tout le mésendoderme et la partie postérieure du système nerveux sont absents (Fig.10b). Les embryons déficients pour *atv1* et *atv2* ne possèdent plus de queue, et les différentes parties de l'embryon ne sont pratiquement plus reconnaissables (92,6%, n=27; Fig.10c). La co-injection de 5ng d'ARNm codant pour *atv1* avec les deux morpholinos permet de restaurer le développement de la queue et de la tête. Même si 100% (n=34) des embryons possèdent une queue développée, l'axe embryonnaire est encore très malformé (Fig.10d). Les embryons injectés avec 125ng d'ARNm codant pour *atv1* et les MoAtv1 et MoAtv2 ont une queue bien développée et une tête reconnaissable dans 100% des cas (=29). La morphologie générale des embryons se rapproche de celle des sauvages (Fig.10e).

Ainsi la sur-expression d'*atv1* dans des embryons déficients pour les gènes *atv1* et *atv2* permet de restaurer une morphologie sauvage.



**I-Figure 10: La sur-expression d'Atv1 permet de récupérer le phénotype des embryons déficients pour *atv1* et *atv2*.**

La sur-expression d'Atv1 à faible dose abolit la formation de tout l'endoderme et de pratiquement tout le mésoderme, sauf au niveau de la queue (flèche en a). La sur-expression d'Atv1 à forte dose bloque la différenciation de tout l'endoderme, du mésoderme ainsi que du tube neural sauf au niveau de la tête (b). La co-injection des MoAtv1 et MoAtv2 induit de fortes malformations (c) qui peuvent être diminuées par la sur-expression d'Atv1 (d et e). Stades et orientations: Tous les embryons ont été photographiés à 24hpf en vue latérale, antérieur à gauche.

### **II.1.e La perte de fonction de *Atv1* et *Atv2* affecte le mésoderme et l'endoderme**

Chez le poisson zèbre, les gènes *nodal* sont impliqués dans la détermination du mésendoderme le long de l'axe animal-végétal (Schier et Shen, 2000). Afin d'analyser si l'activité des protéines Antivin endogènes est requise pour contrôler ces événements, j'ai analysé l'expression de plusieurs marqueurs moléculaires spécifiques du mésoderme et de l'endoderme, dans des embryons injectés par les MoAtv1 et MoAtv2 (12,5ng pour chaque morpholino).

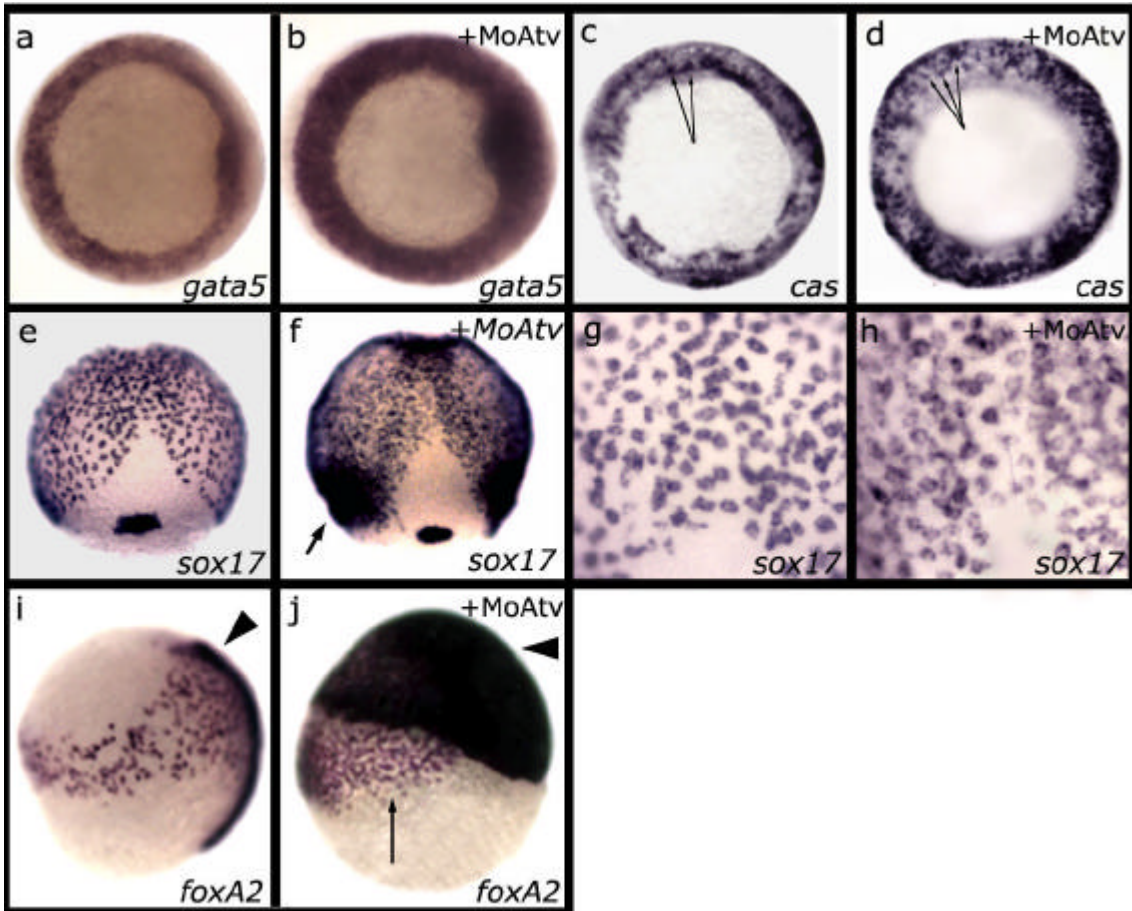
#### **II.1.e.1 Effet sur l'endoderme**

En fin de stade blastula les cellules situées le plus à la marge sont les premières à involuer et participent essentiellement à l'endoderme mais aussi au mésoderme. Le gène *gata5* s'exprime dans toutes les cellules du mésendoderme. Au stade Shield (6hpf), *gata5* est détecté dans une couche de cellules involuées tout autour de l'embryon. Les autres cellules marginales sont négatives pour ce gène (Fig.11a). La double injection des morpholinos MoAtv1 et MoAtv2 étend le domaine d'expression de ce gène à toute l'épaisseur de la marge (Fig.11b). Les gènes *cas*, *sox17* et *foxA2* s'expriment spécifiquement dans les cellules de l'endoderme. La perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* conduit à une forte augmentation du nombre de cellules positives pour l'expression de ces gènes (Fig.11c-j).

Les gènes *gata5* et *cas* sont essentiels pour le développement de l'endoderme puisque leur mutation bloque le développement correct de ce feuillet (Stainier, 2002). Ces deux gènes sont contrôlés directement par la signalisation Nodal, suggérant que l'élargissement de l'endoderme dans les embryons déficients pour les gènes *atv1* et *atv2* est dû à une activation de cette signalisation.

#### **II.1.e.2 Effet sur le mésoderme**

En fin de stade blastula, le gène *ntl* (homologue de *T/bra*) s'exprime tout autour de la marge dans les cellules à l'origine du mésoderme et de l'endoderme. La double injection des morpholinos MoAtv1 et MoAtv2 élargit le territoire d'expression de *ntl* vers le pôle animal (Fig.12a,b). En cours de gastrulation, nous avons déjà observé que les territoires d'expression des gènes *hgg1* et *shh*, marqueurs de mésoderme axial, étaient élargis, après perte de fonction de *atv1* et *atv2* (Fig.9). Le gène codant pour le facteur de croissance *wnt8a* s'exprime dans les cellules de la marge à l'exception du côté dorsal depuis le stade Sphère (4hpf) jusqu'en fin de gastrulation. Comme pour *ntl*, le territoire d'expression de *wnt8a* est élargi vers le pôle animal



**I-Figure 11: Effet de la perte de fonction de atv1 et atv2 sur l'endoderme**

L'injection des morpholinos dirigés contre atv1 et atv2 augmente le nombre de cellules de l'endoderme exprimant *gata5* (a,b), *cas* (c,d, flèches), *sox17* (e-h, flèche) et *foxA2* (i,j, flèche). Le gène *foxA2* s'exprime aussi dans le mésoderme axial et est aussi fortement élargi dans les embryons co-injectés par les deux morpholinos (triangle en i et j). **Orientations:** a-d: vues animales côté dorsal vers la droite; e-h: vue dorsales; i,j: vues latérales, côté dorsal à droite. **Stades:** a-d: début de gastrulation (6hpf); e-j: fin de gastrulation (90% epibolie - 9hpf).

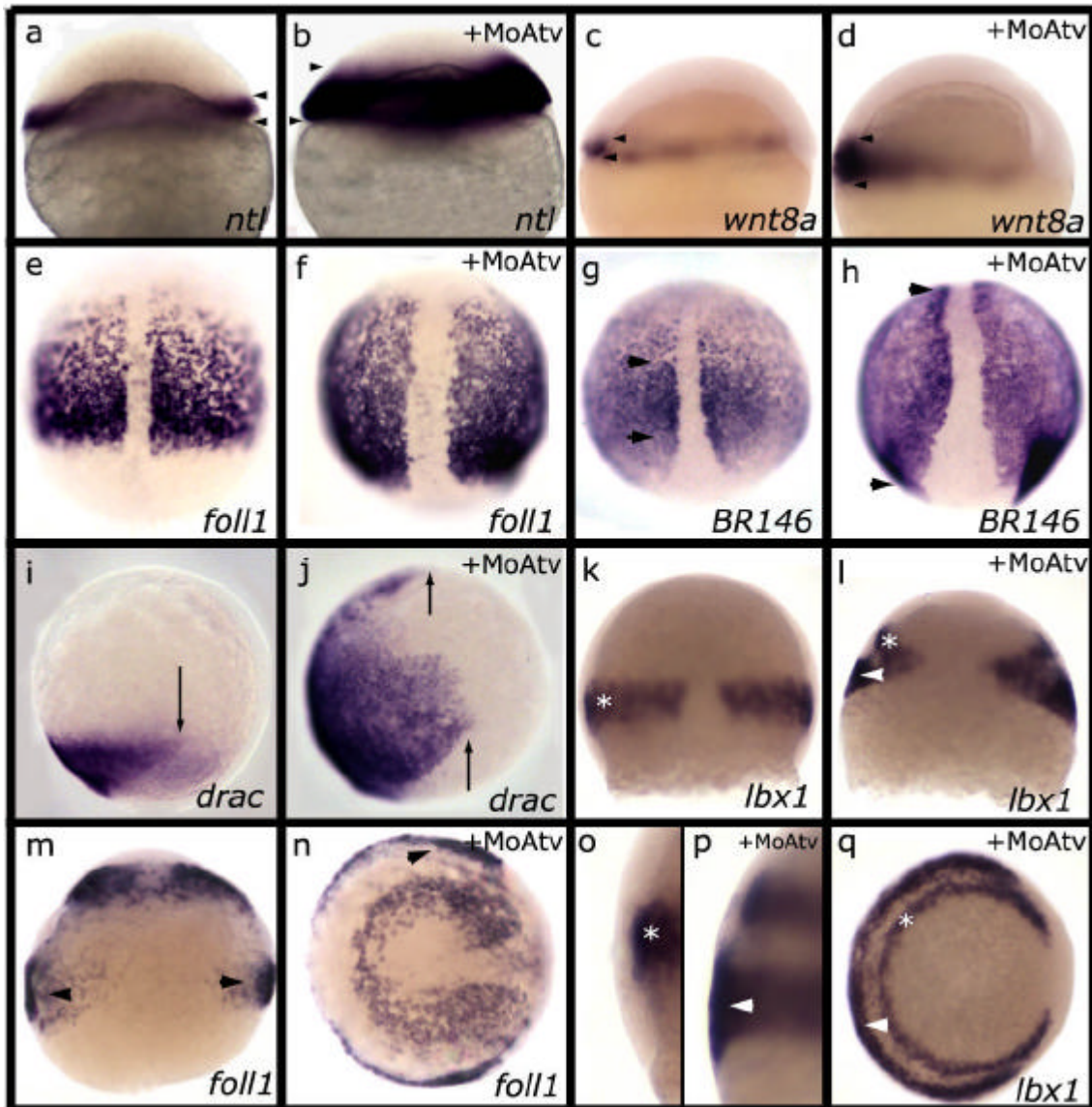
après co-injection des deux morpholinos (Fig.13c,d). De même, après injection des morpholinos MoAtv1 et MoAtv2, les marqueurs *spadetail* (*spt*), *br146* (spécifiques de la plaque segmentale) et *folll* (spécifique du mésenchyme céphalique), indiquent que le mésoderme para-axial est hypertrophié (Fig.12e-h). La même observation a été faite pour le territoire hématopoïétique présomptif marqué avec le gène *draculin* (Fig.12i,j).

Dans tous les cas, l'injection des morpholinos élargit les territoires d'expression des gènes vers le pôle animal, sans modification apparente suivant l'axe dorso-ventral.

Le gène *lhx1* (homologue du gène *ladybird* de drosophile) s'exprime en cours de gastrulation dans tout le mésoderme non-axial. L'injection des morpholinos MoAtv1 et MoAtv2 n'affecte pas de manière significative le domaine d'expression endogène de *lhx1*, situé dans l'hypoblaste. Cependant, tous les embryons (n=14) possèdent un domaine d'expression ectopique à la marge, dans toute l'épaisseur du blastoderme (Fig.12k,l,o-q). Ce domaine supplémentaire ressemble à celui de *lhx1* en début de gastrulation, puisqu'il fait tout le tour de la marge à l'exception du côté dorsal. Une observation similaire a été réalisée pour le gène *folll* qui peut présenter aussi des sites d'expression ectopiques après injection des morpholinos (Fig.12e,m,n).

Nous pouvons proposer deux hypothèses pour expliquer ces observations: (1) après injection des MoAtv1 et MoAtv2, les territoires d'expression de ces gènes au niveau du mésoderme sont fortement élargis en début de gastrulation, puis divisés en deux domaines distincts en cours de gastrulation. (2) ces gènes sont induits une deuxième fois au cours de la gastrulation, de manière indépendante à la première vague d'induction. Cette question n'a pas été étudiée plus en détails.

L'ensemble de ces résultats indiquent que la perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* conduit à l'élargissement de tout le mésoderme, dès le début de la gastrulation. De plus, les territoires d'expression des gènes testés sont tous élargis le long de l'axe animal-végétal, sans affecter l'axe dorso-ventral. Etant donné que les Nodal sont les inducteurs endogènes du mésoderme et que *ntl* est directement induit par leur signalisation (Vogel et Gerster, 1999), nous pouvons supposer que la perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* correspond à une augmentation de l'activité des facteurs Nodal.



**I-Figure 12: Effet de la perte de fonction de *atv1* et *atv2* sur le mésoderme**

L'injection des morpholinos dirigés contre les gènes *atv1* et *atv2* ont plus de cellules qui expriment *ntl/bra* (a,b), *wnt8a* (c,d), *foll1* (e,f), *br146* (g,h) et *drac* (i,j). Remarquer que l'agrandissement du territoire d'expression de *drac* se fait vers le pôle animal et pas vers le côté dorsal (flèche en j). Dans certains cas, un peut détecter un territoire d'expression ectopique de *foll1* dans l'épiblaste (triangle en m et n). De même alors que le gène *lhx1* s'exprime dans les cellules de l'hypoblaste tout autour de la marge sauf dorsalement (k,o; étoile), dans des embryons déficients pour *atv1* et *atv2*, *lhx1* s'exprime dans une autre rangée de cellules situées dans l'épiblaste (l,p,q, triangle). Orientations: a-d,i,j: vues latérales côté dorsal à droite; e-h,k-m,o,p: vue dorsales; n,q: vues animales côté dorsal à droite. Stades: a,b: 30% epibolie; c,d: Shield (6hpf); e-j: 100% epibolie (10hpf); k-q: 80% epibolie.

### II.1.e.3 Effet sur les cellules "forerunner"

Les cellules « forerunner » constituent une population de cellules particulières puisqu'elles sont situées à la marge dorsale de l'embryon en cours de gastrulation mais ne subissent aucun mouvement d'involution (Cooper et d'Amico, 1996). Ces cellules semblent impliquées dans la mise en place de l'asymétrie droite-gauche (Essner *et al*, 2002).

Or, le gène *sqt* est exprimé dans ces cellules "forerunner" (Reabgliato *et al*, 1998a). Afin d'analyser si cette population cellulaire est affectée par la perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2*, j'ai analysé le domaine d'expression du gène *cg3024*, présents dans ce territoire pendant la gastrulation (Thisse *et al*, 2001).

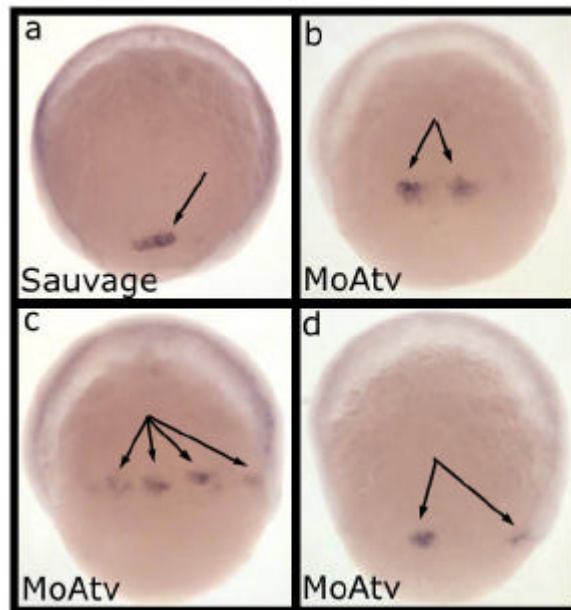
L'injection des deux morpholinos induit de multiples sites d'expression de ce gène, indiquant une augmentation du nombre de cellules "forerunner" (Fig.13) indiquant que ce territoire est aussi affecté par la perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2*.

### II.1.e.4 Effet sur l'expression des Nodal

Chez la souris, les gènes *lefty* sont requis pour contrôler l'activité de Nodal mais aussi pour limiter ses domaines d'expression (Meno *et al*, 1998, 1999 et 2001). En effet, il a été démontré que le gain d'activité Nodal, obtenu après la perte de fonction des gènes *lefty*, induit l'expression du gène *nodal* de manière ectopique. Afin de tester si la perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* modifie le patron d'expression des gènes *nodal*, j'ai injecté les morpholinos MoAtv1 et MoAtv2 et analysé l'expression de *cyclops* et *squint* à 50% epibolie (début de la gastrulation).

Alors que la co-injection des deux morpholinos augmente légèrement le nombre de cellules exprimant *cyclops* au niveau marginal (Fig.14a-d), l'expression de *squint* est induite dans toutes les cellules de la marge (Fig.14e-h).

De l'ensemble de ces observations nous pouvons conclure que la perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* augmente l'activité des gènes *squint* et *cyclops* depuis leur site endogène de transcription, élargissant en conséquence l'endoderme, le mésoderme ainsi que leur propre territoire d'expression. Ainsi la boucle de rétroaction des gènes *atv1* et *atv2* vers les Nodal est requise pour la mise en place correcte de l'endoderme et du mésoderme.



**I-Figure 13: Effet de la perte de fonction de *atv1* et *atv2* sur les cellules "forerunner"**

Les cellules "forerunner" sont situées à la marge dorsale en cours de gastrulation et n'invoquent jamais sous l'épiblaste (flèche en a). Elles expriment spécifiquement le gène *cg3024*. L'injection des MoAtv1 et MoAtv2 augmente le nombre de cellules positives pour *cg3024* indiquant que le nombre de cellules "forerunner" est augmenté à la marge (flèches en b-d). Stades et orientation: Tous les embryons sont en vue dorsale à 75% epibolie.



## **II.2. Les gènes *atv1* et *atv2* et la détermination de l'ectoderme**

Alors que le rôle des facteurs Nodal a été clairement établi et démontré pour l'induction de l'endoderme et du mésoderme, l'importance de la signalisation Activin/Nodal est moins claire pour la détermination de l'ectoderme. Cependant, chez le poisson et la souris cette signalisation semble jouer un rôle dans ce processus car leur perte de fonction perturbe la régionalisation A/P de l'embryon au niveau neural (Thisse *et al*, 2000; Vincent *et al*, 2003). Afin d'obtenir des informations sur cette question par une approche distincte, j'ai analysé les effets sur l'ectoderme de la perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2*.

### **II.2.a. En gastrulation, l'ectoderme présomptif est réduit**

Dans des embryons injectés avec les morpholinos MoAtv1 et MoAtv2 le territoire marginal (marqué par l'expression du gène *ntl*) est élargi vers le pôle animal, suggérant que le territoire animal (ectoderme présomptif) est réduit (Fig.12).

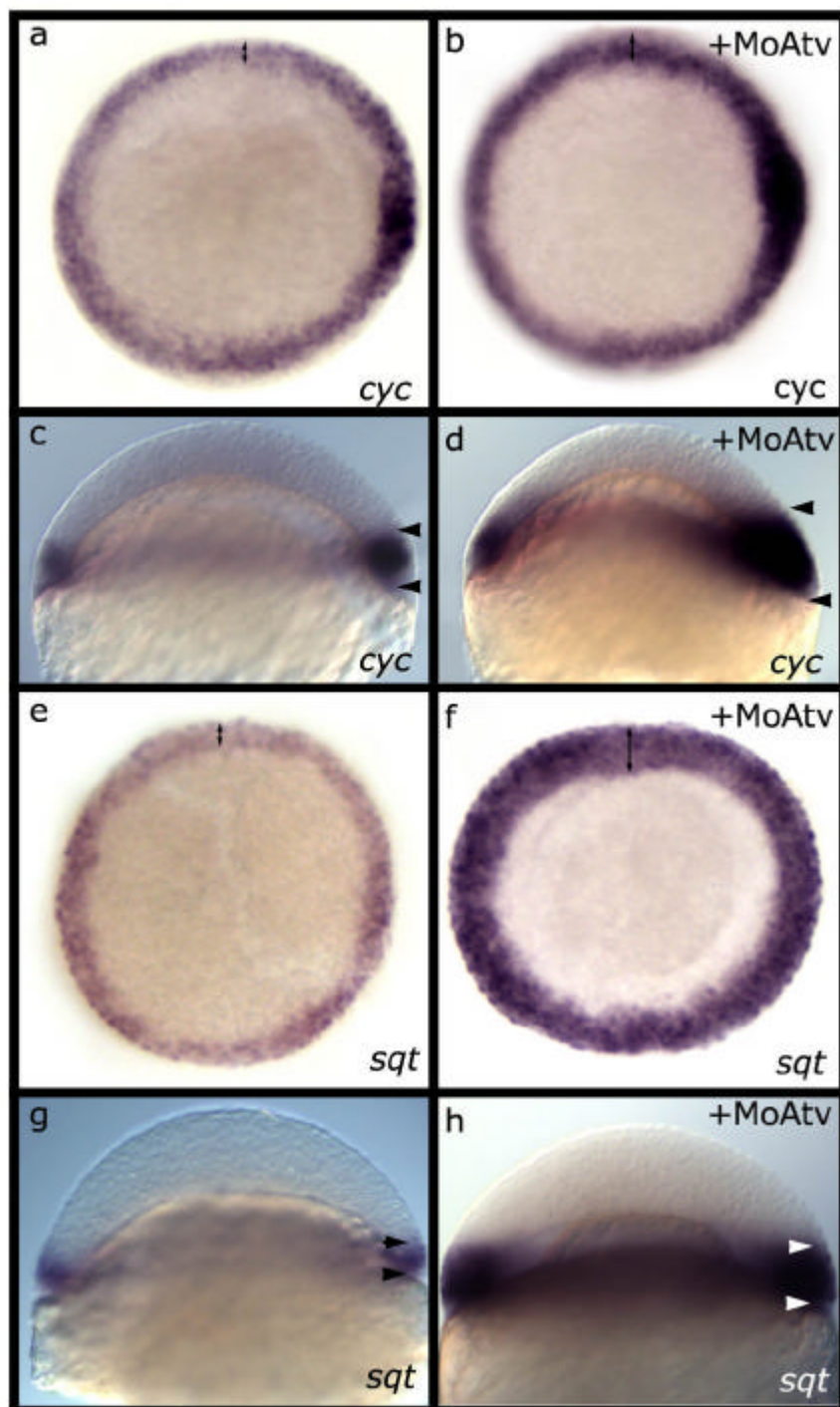
Le gène *sfrp1* s'exprime à 50% épibolie dans les cellules de l'hémisphère animal, qui vont se différencier en ectoderme. L'injection des MoAtv1 et MoAtv2 diminue la taille du territoire animal d'expression de *sfrp1* (Fig.15a,b).

Cela montre que parallèlement à l'élargissement du territoire marginal, la perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* réduit la taille de l'ectoderme. A partir de ce phénotype, nous pouvons nous demander si l'ensemble de l'ectoderme est réduit ou si seules certaines régions sont affectées, ce qui modifierait la régionalisation antéro-postérieure du système nerveux central.

#### **II.2.a.1 Effet sur l'épiderme**

Le gène *ap2* (facteur de transcription) s'exprime dans l'ectoderme ventral (épiderme présomptif) en cours de gastrulation. On remarque que dans les embryons injectés par les morpholinos, son domaine d'expression est déplacé vers le pôle animal, mais aussi exclu au niveau animal, de telle manière qu'il ne forme plus qu'un croissant fin (Fig.15c,d). Dans certains cas, *ap2* n'est plus du tout exprimé.

En gastrula, le gène *ga716* (codant pour une protéine G de la famille ras) est transcrit dans des cellules se situant dans une zone frontière entre la marge embryonnaire et l'épiderme (Fig.15e). La perte de fonction de *atv1* et *atv2* induit un déplacement de cette zone frontière vers le pôle animal, de manière identique au marquage d'*ap2*, mettant clairement en évidence l'extension de la zone marginale (Fig.15f).



**I-Figure 14: Atv1 et Atv2 contrôlent le niveau d'expression des *nodal***

La perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* augmente le nombre de cellules qui expriment *cyc/znr1*(a-d) et *sqt/znr2* (e-h) à la marge.  
Orientations et stades: a,b,e,f,: vue animale; c,d,g,h: vues latérales.  
 Tous les embryons sont en fin de stade blastula (50% epibolie).

### II.2.a.2 Effet sur le système nerveux antérieur

*cyp26a* (gène codant pour une enzyme du catabolisme de l'acide rétinoïque) est exprimé dans la partie dorsale de l'ectoderme (cerveau antérieur présomptif). Après injection des deux morpholinos, son territoire d'expression est déplacé vers le pôle animal, comme pour l'épiderme (Fig.15g,h,k,l). Dans un embryon sauvage, le gène *cyp26a* ne s'exprime pas dans les cellules les plus dorsales du neuro-ectoderme, à l'origine du tube nerveux ventral. Dans les embryons injectés par les morpholinos MoAtv1 et MoAtv2, cette zone d'exclusion, correspondant à la partie axiale, est très fortement élargie, et le territoire d'expression de *cyp26a* adopte une forme de boomerang (Fig.15k,l). Au pôle animal, le domaine d'expression de *cyp26a* est légèrement déplacé vers le côté ventral de l'embryon, zone dans laquelle *ap2* avait disparu.

De manière similaire, après co-injection des deux morpholinos, le domaine d'expression du gène *sox2*, situé au niveau du prosencéphale présomptif, présente une zone d'exclusion située au niveau dorsal de l'ectoderme (Fig.15i,j). L'intensité du marquage est fortement diminuée et certains embryons n'expriment plus ce gène.

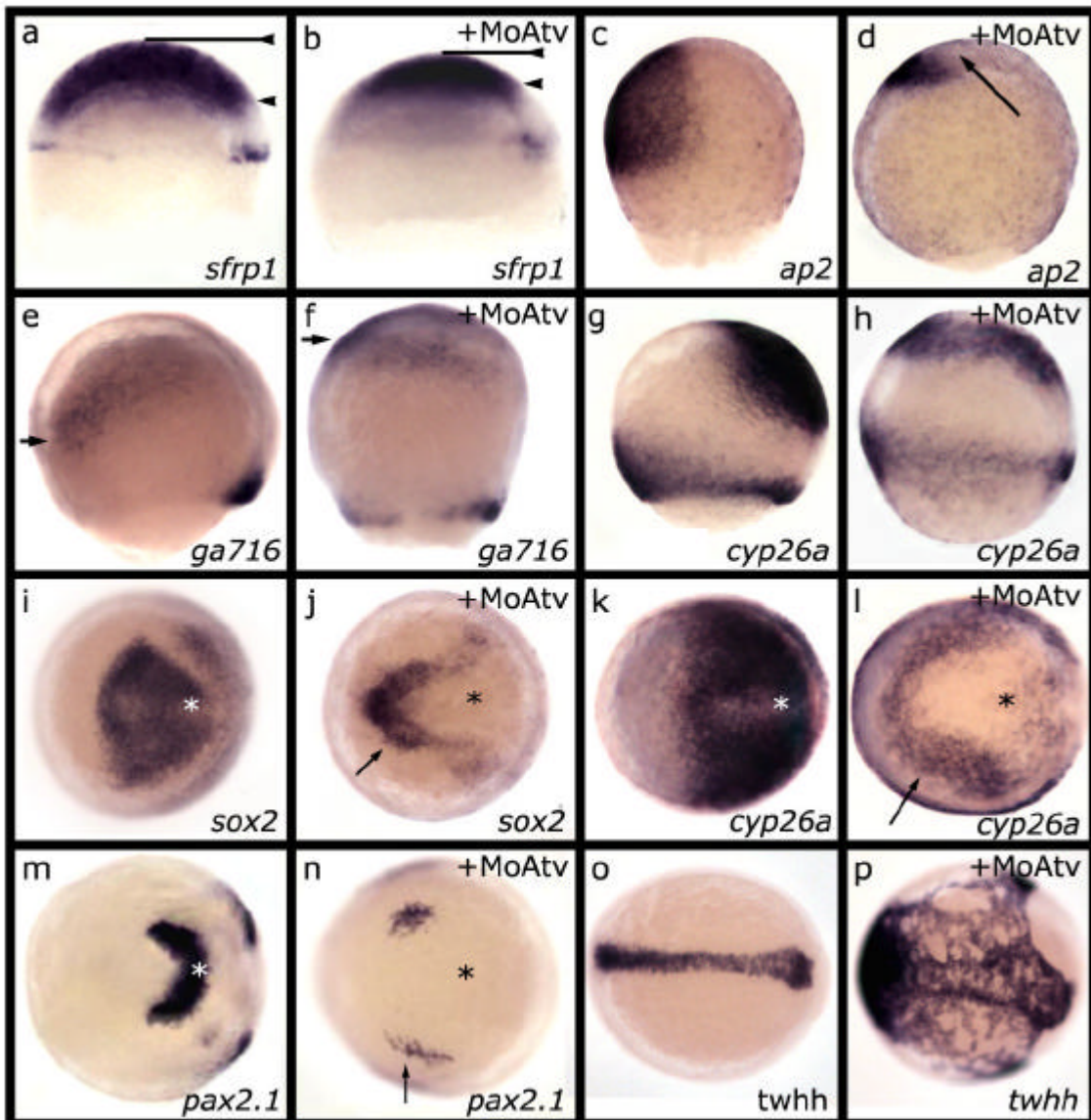
En fin de gastrulation, *pax2.1* s'exprime dans la zone frontière entre les cerveaux moyen et postérieur. L'injection des MoAtv1 et MoAtv2 diminue le niveau d'expression de ce gène et les cellules l'exprimant forment deux blocs situés dans des zones latérales de l'embryon (Fig.15m,n). Dans les phénotypes le plus extrêmes, ces deux blocs sont retrouvés du côté ventral.

Le gène *emx1*, qui s'expriment dans les cellules du télencéphale présomptif en début de somitogenèse, indique que le territoire neural le plus antérieur est aussi fortement réduit (non montré).

### II.2.a.3 Effet sur la plaque du plancher

La partie axiale de la plaque neurale constitue une population à part puisqu'elle dérive des cellules de la marge dorsale (Melby *et al*, 1996). Ces cellules forment la partie la plus ventrale du tube neural (plaque du plancher). Ce territoire exprime les gènes *cyclops* et *atv1*. Le gène *twhh* s'exprime dans cette population cellulaire depuis le début de la gastrulation jusqu'à un jour de développement. La co-injection des deux morpholinos élargit massivement ce territoire tout le long de l'embryon (Fig.15o,p).

Ainsi la partie axiale de la plaque neurale qui correspond à la zone d'exclusion de tous les marqueurs neuraux antérieurs testés précédemment (*cyp26a*, *sox2*, *pax2.1*), est fortement étendue.



**I-Figure 15: Effet de la perte de fonction de *atv1* et *atv2* sur l'ectoderme**

L'injection des morpholinos dirigés contre *atv1* et *atv2* diminue la taille des territoires d'expression de *sfrp1* (a,b) et *ap2* (c,d) qui sont repoussés vers le pôle animal. De plus, *ap2* est exclu des cellules les plus animales (flèche en d). La perte de fonction de *atv1* et 2 conduit au déplacement des territoires d'expression de *ga716* et *cyp26A* vers le pôle animal (e-h). Dans les embryons injectés par les morpholinos, les territoires d'expression de *cyp26*, *sox2* et *pax2.1* sont déformés et largement déplacés vers les bords latéraux de l'embryon (flèches en i-n) en étant exclus de la zone dorsale (étoile en i-n). Cette exclusion est due à l'agrandissement du territoire axial de la plaque neural qui exprime *twhh* (o,p). Orientations: a-h: vues latérales, côté dorsal à droite; i-n: vues animales, côté dorsal à droite; o,p: vues dorsale, côté antérieur à gauche. Stades: a,b: Fin de stade blastula (50% epibolie); c-l: Milieu de gastrulation (80% epibolie); m-p: Début de somitogenèse (11hpf).

### **II.2.b. Réduction de la tête à 24h**

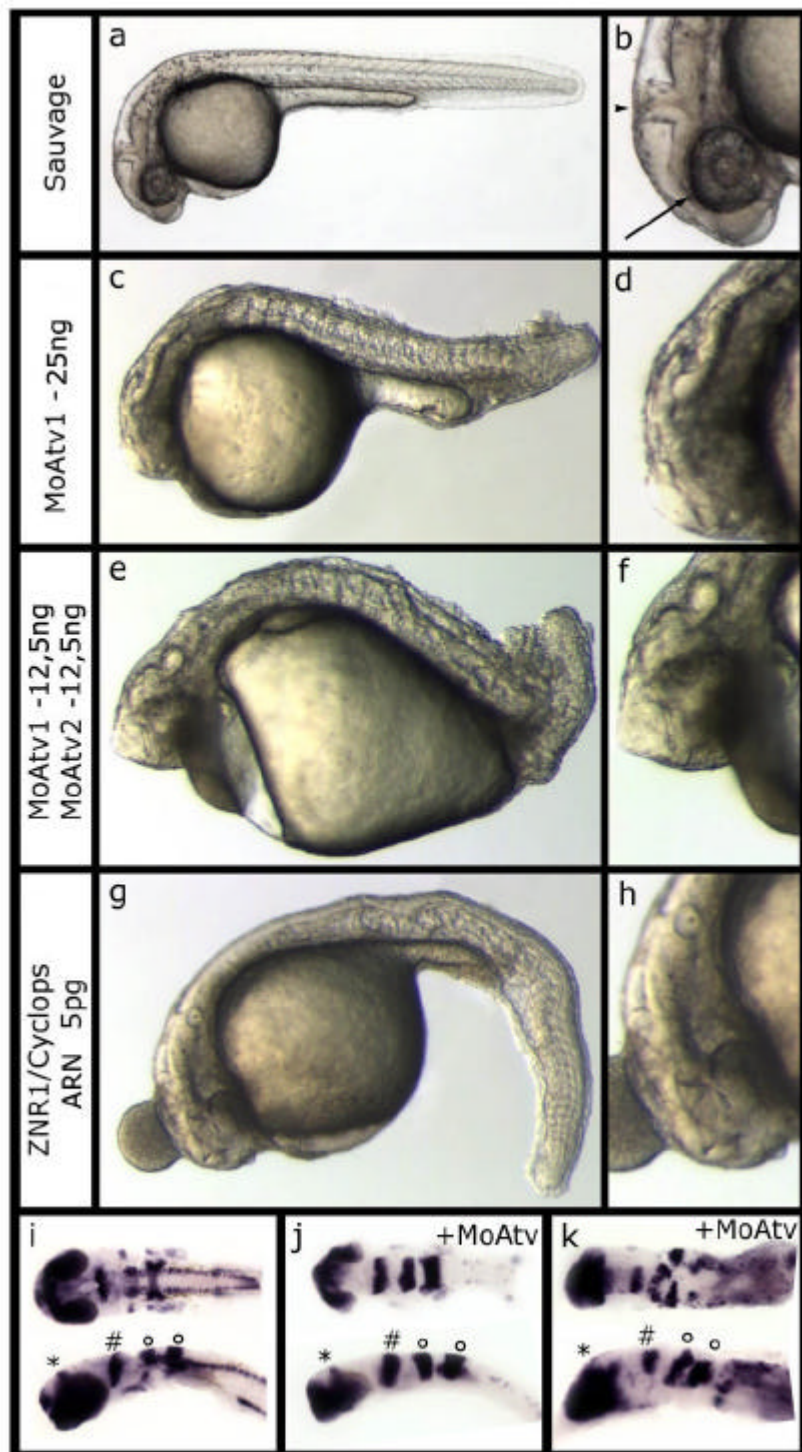
A un jour de développement, les embryons survivants possèdent de fortes malformations avec une tête réduite voire absente (Fig.16a-h). Cependant l'analyse par hybridation *in situ* révèle que les différentes parties du système nerveux se différencient et sont correctement régionalisées, même s'elles sont très réduites et affectées. Ceci est illustré en Fig.16i-k avec les gènes *six3*, *pax2.1* et *krox20* qui s'expriment respectivement dans le télencéphale, la barrière mésencéphale-rhombencéphale et les rhombomères 3 et 5.

### **II.2.c. Bilan des effets observés sur l'ectoderme**

La perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* réduit la taille du territoire animal avant la gastrulation. Cette réduction affecte à la fois l'épiderme et le neuro-ectoderme.

En cours de gastrulation, le territoire à l'origine de la plaque du plancher est fortement élargi et les cellules exprimant les marqueurs neuraux antérieurs sont repoussées latéralement (Fig.17a,b). De plus au pôle animal alors que l'on peut détecter normalement des gènes de l'épiderme et du neuro-ectoderme antérieur, les cellules n'expriment plus que des gènes neuraux. Finalement, dans les phénotypes extrêmes, seul le territoire présomptif du télencéphale disparaît (Fig.17a,b). A 24h de développement, la tête des embryons est réduite voire absente alors que tous les territoires de la plaque neurale sont présents et régionalisés correctement.

De l'ensemble de ces observations, on peut donc conclure que la perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* réduit la taille de l'ectoderme mais ne conduit pas à un changement de la régionalisation A/P de la plaque neurale. Etant donné que notre étude a été réalisée en milieu ou en fin de gastrulation, il n'est pas exclu que les défauts observés proviennent aussi de problèmes de mouvements cellulaires.



**I-Figure 16: Effet de la perte de fonction de *atv1* et *atv2* sur la tête**

Au niveau de la tête d'un embryon sauvage, il est possible de reconnaître facilement les yeux (flèche en b) ainsi que la frontière entre le mésencéphale et le rhombencéphale (triangle en b). La perte de fonction de *atv1* ou de *atv1* et *atv2* ne permet plus de reconnaître ces signes morphologiques (c-f). Le même type de phénotype peut être obtenu par sur-expression de Cyclops (g,h). Cependant, l'analyse par hybridation *in situ* sur les embryons injectés avec les deux morpholinos indique que le télencéphale et les yeux sont bien présents (marqués par le gène *six3*, \* en i-k), que les cellules de la frontière entre le mésencéphale et le rhombencéphale sont présentes (marquées par *pax2.1*, # en i-k) et que les rhombomères r3 et r5 sont correctement déterminés (marqués par *krox20*, ° en i-k). Orientations: a-h: vues latérale côté antérieur à gauche; i-k: dissections de la tête d'embryons en vue dorsale (haut) et latérales (bas) côté antérieur vers la gauche. Stades: tous les embryons sont à 30h de développement

### **III. DISCUSSION**

Nous avons montré que les gènes *atv1* et *atv2* sont essentiels pour la mise en place de l'endoderme et du mésoderme et que, contrairement à l'observation faite chez la souris (Meno *et al*, 1999, 2002), leur rôle est partiellement redondant au cours de la gastrulation,.

#### **III.1 La perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* perturbe la gastrulation**

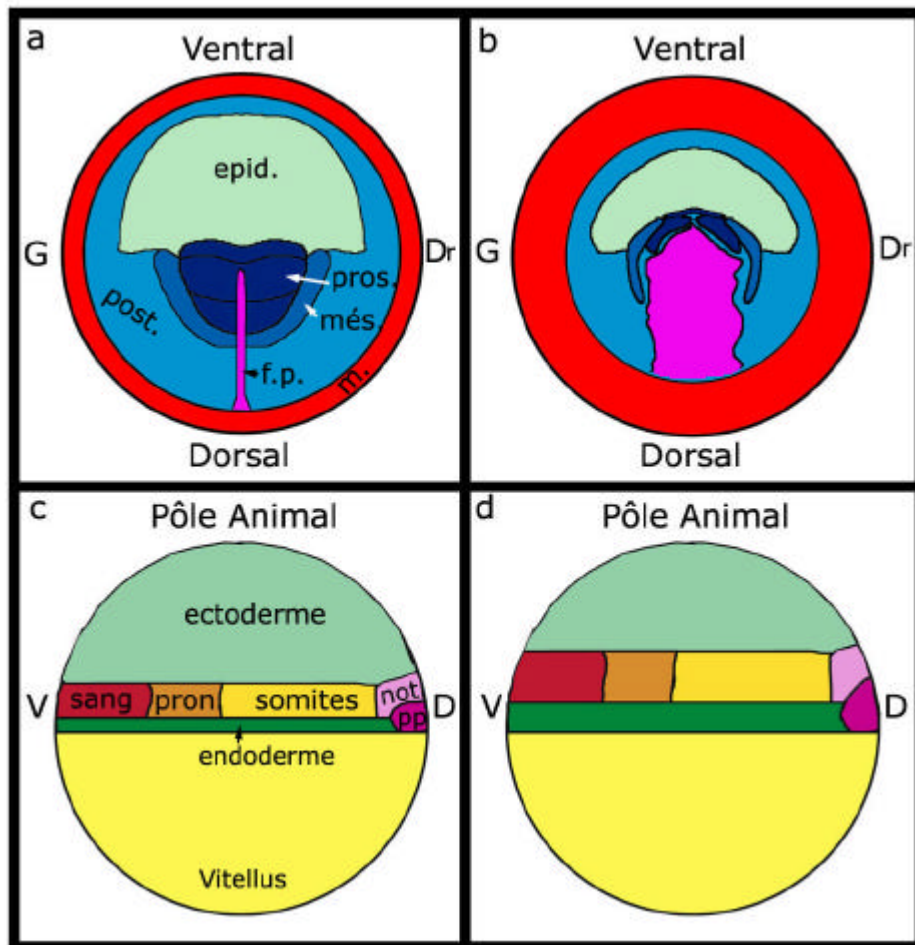
Nous avons observé que la double injection des morpholinos MoAtv1 et MoAtv2 perturbe la morphologie du blastoderme en cours de gastrulation, avec notamment une accumulation de cellules au pôle animal. De plus, le taux de mortalité des embryons est très élevé, ce qui est probablement une conséquence des malformations observées précocement (Fig.6 et Table).

Il a été montré à la suite de notre étude que ces défauts observés au niveau du blastoderme proviennent d'une anomalie des mouvements d'involution au cours de la gastrulation (Feldman *et al*, 2002). En effet, chez les embryons sauvages, l'epibolie marque une pause en début de gastrulation, ce qui correspond à un stade d'involution rapide des cellules. Après cette phase, d'une vingtaine de minutes, la vitesse d'internalisation des cellules diminue et l'epibolie reprend. Afin que la gastrulation se fasse correctement, le blastoderme, les cellules "forerunner" et les noyaux de la YSL opèrent leurs mouvements d'epibolie de manière coordonnée (Feldman *et al*, 2002). Dans les embryons injectés par les morpholinos MoAtv1 et MoAtv2, le temps d'internalisation rapide est plus que doublé ce qui augmente le nombre de cellules hypoblastiques et désynchronise tous les mouvements d'epibolie de la gastrula (Fig.6 et Feldman *et al*, 2002).

Cette observation est à relier avec celle faite chez des mutants pour la voie Nodal (mutants *MZoep*) dans lesquels l'internalisation des cellules au cours de la gastrulation est abolie (Carmany-Rampey *et al*, 2001).

#### **III.2 Les gènes *atv1* et *atv2* sont requis pour la détermination correcte de l'endoderme et du mésoderme**

Nous avons observé que les territoires de l'endoderme et du mésoderme sont élargis selon l'axe animal-végétal et ce, dès le début de gastrulation. Il est important de noter que tous les territoires du mésoderme sont agrandis, montrant que la régionalisation le long de l'axe dorso-ventral n'est pas modifié (Fig.17c,d). Cette observation confirme que la signalisation Nodal chez le poisson zèbre agit précocement sur la différenciation des cellules le long de l'axe



**I-Figure 17: Interprétation des phénotypes de perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2***

a,b: effets sur l'ectoderme. En vue du pôle animal, sur la carte des territoires présomptifs d'un embryon en cours de gastrulation (a) on peut voir les territoires présomptifs de l'épiderme en position ventrale (épid. en vert), le cerveau antérieur (pros. en bleu foncé), le cerveau moyen (mes. en bleu) et le cerveau postérieur et la moelle épinière (post. en bleu clair). Les cellules de la marge sont représentées en rouge (m.). Les cellules axiales à l'origine de la plaque du plancher du tube neural sont représentées en rose (f.p.). La perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2* (b) élargit fortement le territoire des cellules axiales ce qui repousse le cerveau moyen et antérieur sur les côtés. L'épiderme et le reste du tube neural sont repoussés vers le pôle animal car la marge est plus grande.

c,d: effet sur les cellules de la marge. En vue latérale sur la carte des territoires présomptifs d'un embryon en début de gastrulation, on peut distinguer que les cellules de la marge sont régionalisées le long de l'axe D/V. Après l'injection des morpholino MoAtv1 et MoAtv2, tous les territoires de la marge sont agrandis en direction du pôle animal. La régionalisation le long de l'axe D/V n'est pas modifiée. **Abréviations:** pros: prosencéphale; més: mésencéphale; post. système nerveux postérieur; epid. :épiderme; m: marge; f.p.: plaque du plancher; G: gauche; Dr: Droit; pron: pronéphros; not: notochorde; pp:plaque préchordale; V: ventral; D: Dorsal.



animal-végétal, mais pas le long de l'axe dorso-ventral (Thisse *et al*, 2000; Gristman *et al*, 2000; Dougan *et al*, 2003).

Nous avons observé que dans les embryons déficients pour *atv1* et *atv2*, certains gènes s'expriment de manière ectopique à la marge de l'embryon (Fig.12). Etant donné que dans ces embryons le temps d'internalisation des cellules est plus important (Feldman *et al*, 2002), il est possible que plusieurs vagues d'induction de ces gènes aient lieu à la marge. Cette observation pourrait être mise en relation avec l'induction de sillons primitifs surnuméraires observés dans les souris mutantes pour *lefty2* (Meno *et al*, 1999). En effet, chez la souris, cette région est la zone d'invagination des cellules hypoblastiques, comme l'est la marge chez des embryons de poisson zèbre.

### **III.3 La signalisation Nodal est augmentée dans des embryons déficients pour les gènes *atv1* et *atv2***

Les phénotypes des embryons déficients pour les gènes *atv1* et *atv2* sont reproduits par la sur-expression de *cyclops* (Fig.8,9 et Table1). De plus, le niveau d'expression des gènes nodal (essentiellement de *squint*) est augmenté dans les embryons injectés avec les MoAtv1 et MoAtv2 (Fig.14). Etant donné que les *nodal* sont requis pour la mise en place de l'endoderme et du mésoderme au cours de l'embryogenèse et que les gènes *atv* sont des inhibiteurs induits par la signalisation Nodal, nous pouvons conclure que les phénotypes observés dans les embryons injectés avec les MoAtv1 et MoAtv2 sont dus entièrement ou en partie à une augmentation de la signalisation Nodal depuis le site endogène d'expression des gènes, c'est-à-dire la marge. Il a été montré dans deux études complémentaires que le gain d'activité Nodal conduisant aux phénotypes précoces que nous avons observés est dû essentiellement à *squint* (Chen et Schier, 2002; Feldman *et al*, 2002). Par contre, l'élargissement de la partie ventrale du tube neural (marquée par *twhh*) est causé par une augmentation du signal *Cyclops* (Feldman *et al*, 2002). De ces résultats, nous pouvons conclure qu'au cours de la gastrulation, l'induction du mésoderme requiert principalement *sqt*, dont l'activité est contrôlée par les rétro-inhibiteurs *Atv1* et *Atv2*. Par la suite, la partie ventrale du tube neural est déterminée par l'activité de *Cyclops*, dès la gastrulation, sous le rétro-contrôle d'*Atv1* et *Atv2*. Dans un troisième temps les *nodal* et leur inhibiteurs sont requis pour la mise en place de l'axe droite-gauche (Feldman *et al*, 2002). Par ailleurs, Chen et Schier ont montré que l'activité de *Atv1* et *Atv2* est requise pour la formation correcte du gradient morphogénétique de *sqt* (Chen et Schier, 2002).

### **III.4 Les effets sur l'ectoderme dans les embryons déficients pour les gènes *atv1* et *atv2*.**

Nous avons montré que la taille de l'ectoderme était réduite avant le début de la gastrulation (Fig.15). Cette observation est corrélée à l'élargissement de la marge en direction du pôle animal (Fig.12) ainsi qu'à l'augmentation du temps d'internalisation rapide des cellules pendant la gastrulation (Feldman *et al*, 2002). Moins de cellules peuvent participer à la formation de l'ectoderme.

Toutefois, la régionalisation de l'ectoderme ne semble pas affectée puisque tous les marqueurs moléculaires testés s'expriment en cours de gastrulation ainsi qu'à 24h. Cependant, en cours de gastrulation, les différentes régions de l'ectoderme sont déformées, dû notamment à l'agrandissement du territoire présomptif de la plaque du plancher (territoire axial). L'élargissement de ce tissu pourrait paraître contradictoire puisque la taille de la plaque neurale est réduite. Cependant, la formation des cellules du tube neural ventral est liée à celle du mésoderme axial, puisqu'elles semblent partager la même origine au départ (Appel *et al*, 1998; Teillet *et al*, 1998). Ainsi l'augmentation du nombre de cellules marginales dans les embryons déficients pour *atv1* et *atv2* conduit aussi à l'augmentation du nombre de cellules participant à la plaque du plancher.

Dans les phénotypes les plus extrêmes, nous avons observé certains gènes ne s'exprimant plus ou avec un niveau d'expression très faible (Fig.15). On peut suggérer que l'induction de ces territoires est correcte mais ces derniers se désorganisent progressivement au cours de la gastrulation en raison de mouvements cellulaires anormaux. Ce cas a été observé notamment pour la formation du bourgeon caudal chez les mutants *ppt* et *kny* défectueux pour les mouvements de convergence et d'extension au cours de la gastrulation (Solnica-Krezel *et al*, 1996; Marlow *et al*, 1998; Sepich *et al*, 2000). En effet, alors que des gènes spécifiques de ce territoire sont correctement induits chez des embryons mutants *ppt* ou *kny*, la queue ne se forme pas correctement à 24h. Il semble que les cellules du bourgeon caudal soient désorganisées et ne peuvent maintenir leur identité. Dans les embryons défectueux pour *atv1* et *atv2*, un mécanisme similaire pourrait intervenir, en particulier au niveau du prosencéphale, ce qui conduirait à une absence de tête à 24h.

Les mêmes effets sur l'ectoderme ont aussi été observés par une autre équipe (Feldman *et al*, 2002). De plus ces observations chez le poisson zèbre sont en accord avec la perte de fonction du gène *lefty2* chez la souris dont l'ectoderme est correctement régionalisé malgré certaines malformations au niveau de la tête (Meno *et al*, 1999).

## **IV. Autres facteurs impliqués dans l'inhibition de Nodal pendant la gastrulation**

Chez la souris et le poulet, il a été montré de manière similaire que l'inhibition de l'activité Nodal est essentielle pour le bon déroulement de la gastrulation. Cependant cette inhibition peut se faire par d'autres facteurs que les protéines Lefty.

### **IV.1 Le couple Cerberus - Lefty**

Les molécules de la famille Cerberus/DAN sont capables d'inhiber l'activité des protéines Nodal (Piccolo *et al*, 1999), mais aussi des ligands BMP et Wnt (Glinka *et al*, 1997; Piccolo *et al*, 1999).

Chez la souris, parmi les gènes qui codent pour des antagonistes de Nodal, *ceberus* et *lefty1* sont ceux qui sont exprimés le plus précocement dans l'embryon. En fin de stade blastula (E5.5), ils sont co-transcrits dans les cellules situées dans la partie distale de l'endoderme viscéral. Juste avant le début de gastrulation (E5.7), ces cellules migrent vers le futur côté antérieur, constituant ainsi l'endoderme viscéral antérieur, structure essentielle pour la formation de la tête. Les simples pertes de fonction de ces gènes ne produisent pas de perturbation précoce en gastrulation, suggérant une redondance fonctionnelle de ces deux gènes au niveau de l'endoderme viscéral (Meno *et al*, 1998; Shawlot *et al*, 2000).

Perea-Gomez *et al* (2003) ont montré que les embryons double mutants pour *cerberus* et *lefty1* ont un excès de mésoderme et dans certains cas des sillons primitifs ectopiques. Ce phénotype ressemble à celui des souris *lefty2*<sup>-/-</sup>. De même, dans un fond génétique *nodal* +/-, la perte de fonction de ces deux gènes est moins sévère, indiquant que le phénotype est dû à un gain d'activité de Nodal (Perea-Gomez *et al*, 2003).

De plus, le contrôle de l'activité Nodal par ces deux gènes est essentielle pour la migration correcte de l'endoderme viscéral distal en position antérieure. Dans les embryons *cer*<sup>-/-</sup>;*lefty1*<sup>-/-</sup> ce mouvement ne se fait plus. Sachant que ce tissu est requis pour la formation correcte de la tête, les antagonistes de Nodal sont donc aussi requis pour la mise en place correcte de l'axe antéro-postérieur (Yamamoto *et al*, 2004).

En conséquence, comme pour le poisson zèbre, l'analyse des embryons déficients pour les antagonistes Lefty et Cerberus permet d'analyser les multiples rôles de la signalisation Nodal. Il apparaît que lors de l'embryogenèse précoce de la souris, l'inhibition de Nodal est donc

essentielle à, au moins, trois étapes:

- inhibition par Cerberus et Lefty1 dans l'endoderme viscéral distal pour la formation de la tête et l'induction correcte du mésoderme.
- inhibition par Lefty2 au niveau du sillon primitif, afin de contrôler le niveau d'expression de Nodal. Ce contrôle semble aussi dérégulé dans les double mutants Cer/Lefty.
- mise en place de l'axe droite-gauche, par Lefty1 et Lefty2.

#### **IV.2 Le rôle de l'hypoblaste chez le Poulet**

Chez le poulet, il semble que les antagonistes de Nodal soient aussi requis pour contrôler leur niveau d'activité au cours de la gastrulation.

Avant l'apparition du sillon primitif postérieurement, l'embryon de poulet est composé de deux feuillets superposés, l'épiblaste et l'hypoblaste. Comme l'endoderme viscéral de la souris, l'hypoblaste ne participe pas réellement à l'embryon mais est essentiel pour son bon développement.

L'équipe de C. Stern a montré que l'ablation de l'hypoblaste conduit à l'apparition de sillons primitifs surnuméraires (Bertocchini et Stern, 2002). Or ce tissu exprime fortement *cerberus*. Par des expériences de gain et de perte de fonction, les auteurs ont montré que l'inhibition de Nodal est nécessaire pour contrôler la formation du sillon primitif. Les auteurs proposent que cette inhibition est réalisée par Cerberus depuis l'hypoblaste, structure équivalente de l'endoderme viscéral de souris.

### **V. CONCLUSION**

J'ai montré que les gènes *atv1* et *atv2* sont requis pour contrôler le niveau d'activité des gènes *nodal* au cours de la détermination de l'endoderme et du mésoderme. Ainsi l'activité des *Atv1* et *Atv2* en tant que rétro-inhibiteurs des Nodal est essentielle au cours du développement embryonnaire.

**Ces gens-là**  
(Jacques Brel)

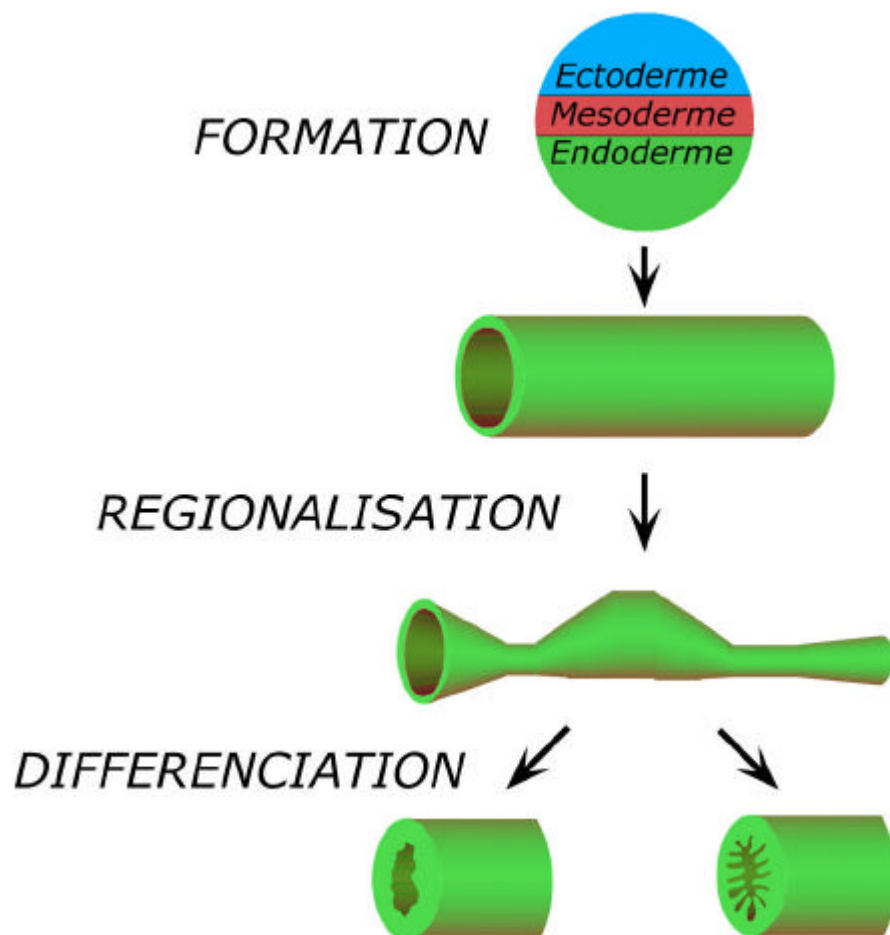
D'abord il y a l'aîné  
Lui qui est comme un melon  
Lui qui a un gros nez  
Lui qui sait plus son nom  
Monsieur tellement qui boit  
Ou tellement qu'il a bu  
Qui fait rien de ses dix doigts  
Mais lui qui n'en peut plus  
Lui qui est complètement cuit  
Et qui se prend pour le roi  
Qui se saoule toutes les nuits  
Avec du mauvais vin  
Mais qu'on retrouve matin  
Dans l'église qui roupille  
Raide comme une saillie  
Blanc comme un cierge de Pâques  
Et puis qui balbutie  
Et qui a l'œil qui divague  
Faut vous dire Monsieur  
Que chez ces gens-là  
On ne pense pas Monsieur  
On ne pense pas on prie

Et puis, il y a l'autre  
Des carottes dans les cheveux  
Qu'a jamais vu un peigne  
Oust méchant comme une teigne  
Même qu'il donnerait sa chemise  
A des pauvres gens heureux  
Qui a marié la Denise  
Une fille de la ville  
Enfin d'une autre ville  
Et que c'est pas fini  
Qui fait ses petites affaires  
Avec son petit chapeau  
Avec son petit manteau  
Avec sa petite auto  
Qu'aimerait bien avoir l'air  
Mais qui n'a pas l'air du tout  
Faut pas jouer les riches  
Quand on n'a pas le sou  
Faut vous dire Monsieur  
Que chez ces gens-là  
On ne vit pas Monsieur  
On ne vit pas on triche

Et puis, il y a les autres  
La mère qui ne dit rien  
Ou bien n'importe quoi  
Et du soir au matin  
Sous sa belle gueule d'apôtre  
Et dans son cadre en bois  
Il y a la moustache du père

Qui est mort d'une glissade  
Et qui recarde son troupeau  
Bouffer la soupe froide  
Et ça fait des grands flichss  
Et ça fait des grands flichss  
Et puis il y a la toute vieille  
Qu'en finit pas de vibrer  
Et qu'on attend qu'elle crève  
Vu que c'est elle qu'a l'oseille  
Et qu'on écoute même pas  
Ce que ses pauvres mains racontent  
Faut vous dire Monsieur  
Que chez ces gens-là  
On ne cause pas Monsieur  
On ne cause pas on compte

Et puis et puis  
Et puis il y a Frida  
Qui est belle comme un soleil  
Et qui m'aime pareil  
Que moi j'aime Frida  
Même qu'on se dit souvent  
Qu'on aura une maison  
Avec des tas de fenêtres  
Avec presque pas de murs  
Et qu'on vivra dedans  
Et qu'il fera bon y être  
Et que si c'est pas sûr  
C'est quand même peut-être  
Parce que les autres veulent pas  
Parce que les autres veulent pas  
Les autres ils disent comme ça  
Qu'elle est trop belle pour moi  
Que je suis tout juste bon  
A égorger les chats  
J'ai jamais tué de chats  
Ou alors y a longtemps  
Ou bien j'ai oublié  
Ou ils sentaient pas bon  
Enfin ils ne veulent pas  
Parfois quand on se voit  
Semblant que c'est pas exprès  
Avec ses yeux mouillants  
Elle dit qu'elle partira  
Elle dit qu'elle me suivra  
Alors pour un instant  
Pour un instant seulement  
Alors moi je la crois Monsieur  
Pour un instant  
Pour un instant seulement  
Parce que chez ces gens-là  
Monsieur on ne s'en va pas  
On ne s'en va pas Monsieur  
On ne s'en va pas  
Mais il est tard Monsieur  
Il faut que je rentre chez moi.



**II-Figure 1: De la formation à la différenciation de l'endoderme.**

FORMATION: L'endoderme est déterminé pendant la gastrulation et s'individualise du mésoderme pour former l'intestin primitif. REGIONALISATION: L'intestin primitif est régionalisé le long de l'axe antéro-postérieur. DIFFERENCIATION: Les cellules au sein du tube digestif acquièrent leur spécificité. Elles participeront à divers épithéliums ou des glandes digestives.

## **PARTIE II: *Casanova*, effecteur des Nodal au cours de la différenciation de l'endoderme**

### *I. Introduction: Différenciation de l'endoderme chez les Vertébrés : aspects cellulaires et moléculaires*

#### I.1 Description embryologique

##### **I.1.a Les dérivés de l'endoderme**

L'endoderme est défini comme le feuillet embryonnaire tapissant les cavités internes des embryons. Comme l'ectoderme, il se présente sous la forme d'un tissu épithélial organisé en une couche homogène, puis, au cours de l'embryogenèse, se différencie en divers organes de natures histologiques variées (Grapin-Botton et Melton, 2000).

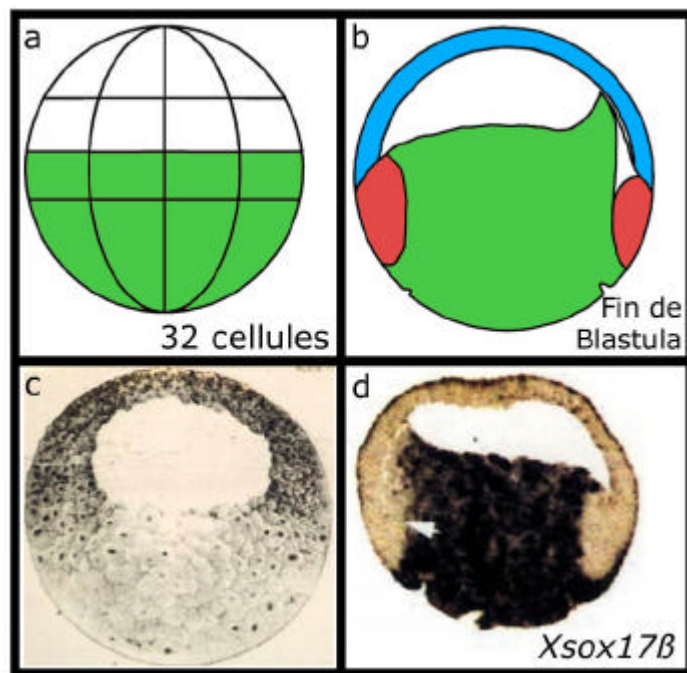
Initialement, il forme un tube digestif primitif depuis lequel plusieurs glandes vont se différencier. Cette individualisation glandulaire se fait par bourgeonnement à partir de l'épithélium de recouvrement du tube digestif primitif. La connexion glande – épithélium est maintenue pour le système exocrine (pancréas et foie), et rompue pour le système endocrine (thymus, thyroïde). Parallèlement, le tube digestif acquiert progressivement sa forme (replis) et se régionalise (œsophage – estomac – duodénum – intestin).

En plus de former le système digestif, l'endoderme est à l'origine du système respiratoire.

##### **I.1.b Les étapes du développement de l'endoderme**

Il est possible de distinguer trois grandes étapes au cours du développement de l'endoderme, des blastomères non différenciés jusqu'aux organes formés (Fig.1). Tout d'abord, l'endoderme se forme, en tant que feuillet embryonnaire. C'est l'étape initiale sur laquelle je me concentrerai dans cette partie de ce manuscrit. Chez les Vertébrés, les précurseurs de l'endoderme et du mésoderme sont étroitement liés en début de gastrulation. La compréhension des mécanismes de ségrégation des cellules entre ces deux destinées est donc une question récurrente pour comprendre ce processus initial de formation de l'endoderme (Stainier, 2002).

Dans un second temps, l'endoderme est régionalisé le long de l'axe antéro-postérieur. Des études chez le Xénope, la Souris et le Poulet proposent que cette régionalisation se fasse par interaction avec le mésoderme associé au tube digestif. Cependant, il n'est pas exclu que le tube digestif possède une pré-régionalisation endogène qui soit maintenue et affinée par le mésoderme associé (Horb, 2000; Horb et Slack, 2001).



**II-Figure 2: Les précurseurs de l'endoderme chez le xénope.**

Chez le xénope, les précurseurs de l'endoderme sont localisés au pôle végétal au stade 32 cellules (blastomères verts - a) et ainsi qu'en début de gastrulation (région verte - b). Les blastomères végétaux, très chargés en réserves vitellines, sont distinguables par leur couleur claire (c) ou par l'expression de gènes spécifiques (d).



La troisième étape est la différenciation finale des organes. Par exemple, alors que l'épithélium stomacal est kératinisé, les cellules intestinales possèdent des micro-villosités essentielles pour réaliser l'absorption intestinale.

### **I.1.c Formation de l'intestin primitif chez le Xénope**

#### **I.1.c.1 Détermination de l'endoderme**

Chez le Xénope, il est possible, dès le stade 32 cellules, d'établir une carte des territoires présomptifs (Dale et Slack, 1987). Les embryons possèdent une polarisation bien visible puisque les blastomères animaux sont très pigmentés, à l'inverse du pôle végétal, beaucoup plus clair. L'hémisphère végétal se différencie en endoderme et ses blastomères sont plus gros car ils sont fortement chargés de réserves vitellines (Fig.2 - Chalmers et Slack 1998). Les blastomères de l'endoderme sont induits par des signaux maternels et leur identité est maintenue par des signaux zygotiques (Nieuwkoop, 1977; Heasman *et al*, 1984; Wylie *et al*, 1987)

#### **I.1.c.2 Individualisation de l'endoderme**

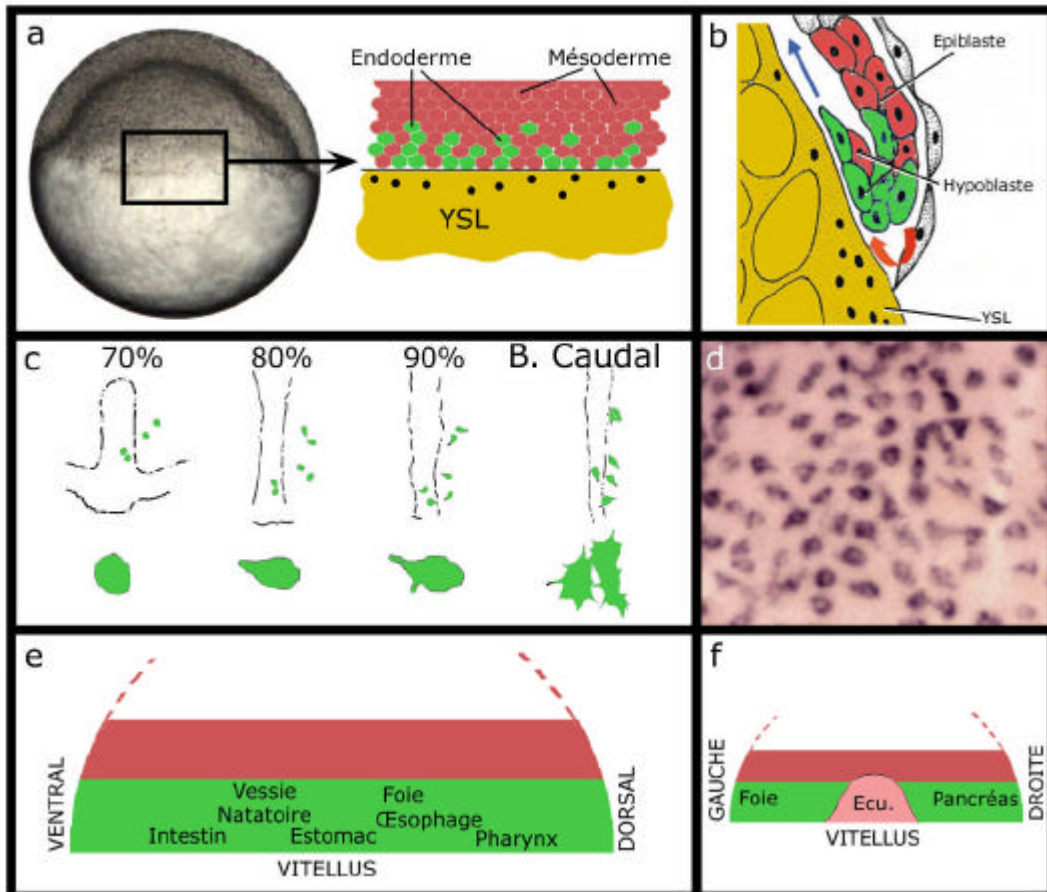
En fin de stade blastula, la répartition des trois feuillet embryonnaires au sein de l'embryon est la même qu'au stade 32-cellules: au pôle animal, l'ectoderme, dans la région équatoriale le mésoderme et au pôle végétal, l'endoderme. Les cellules endodermiques représentent près de la moitié de l'embryon (Fig. 2, Chalmers et Slack 2000).

Au cours de la gastrulation, les cellules s'invaginent par le blastopore et forment l'archentéron (intestin primitif), tapissé par l'épithélium endodermale. Ainsi, dès la gastrulation l'endoderme est bien visualisable et l'intestin primitif déjà formé.

Les cellules du pôle végétal ne participent pas toutes à la formation de l'épithélium de l'archentéron. En effet, alors que les cellules équatoriales superficielles forment principalement l'intestin primitif, les autres blastomères, très chargés en vitellus, conservent une localisation interne dans l'embryon. Les réserves vitellines sont digérées au cours de la croissance de l'embryon et finalement, ces cellules se différencient en dérivés endodermiques (Chalmers et Slack, 2000).

### **I.1.d Formation de l'intestin primitif chez le Poisson Zèbre**

L'individualisation de l'endoderme en tant que feuillet embryonnaire est beaucoup moins évidente chez le poisson que chez le Xénope. En effet, les cellules de l'hypoblaste, formant le mésoderme et l'endoderme, sont mélangées au cours de la gastrulation (Fig.3a; Warga et



### **II-Figure 3: Individualisation de l'endoderme au cours de la gastrulation chez le poisson zèbre.**

Dans l'embryon de poisson zèbre en fin de stade blastula (50% epibolie), les cellules précurseurs de l'endoderme sont situées à la marge en contact avec la couche vitelline syncytiale (YSL) et étroitement liés avec les cellules du mésoderme (a). Pendant la gastrulation, les cellules de l'endoderme sont les premières à involuer sous l'épiblaste (b) et adoptent progressivement une forme aplatie avec de fines extensions cytoplasmiques (c). La détection de l'expression de gènes spécifiques de l'endoderme en cours de gastrulation montre qu'il ne forme pas un feuillet continu (d). En fin de stade blastula, l'endoderme est régionalisé le long de l'axe dorso-ventral (e) et droite-gauche (f).

Kimmel, 1990; Warga et Nüsslein-Volhard, 1999). L'endoderme n'est réellement visualisable que lors de stades tardifs (après un jour de développement).

#### **I.1.d.1 Carte des territoires présomptifs**

En fin de blastula, les cellules se situant à la marge se différencient en endoderme et mésoderme. Cependant, les blastomères involuant les premiers (se situant donc le plus à la marge), donnent essentiellement de l'endoderme (Fig.3a,b; Warga et Kimmel 1990).

Dès 50% épibolie, la régionalisation antéro-postérieure de l'endoderme peut être mise en évidence par suivi cellulaire. Au cours de la gastrulation, plus les cellules ont une position dorsale, plus elles migrent vers le pôle animal (antérieur) de l'embryon (Warga et Kimmel, 1990; Myers *et al*, 2002b). Ainsi, la régionalisation antéro-postérieure de l'endoderme observée à 24h est superposée à l'axe dorso-ventral du début de gastrula. (Fig.3e). De plus, les organes adoptant une position asymétrique à 24h (pancréas et foie) sont déjà latéralisés avant la gastrulation (Fig.3f; Warga et Nüsslein-Volhard, 1999).

#### **I.1.d.2 La forme des cellules de l'endoderme**

Au moment de leur involution, les blastomères du mésendoderme subissent une transition épithélio-mésenchymateuse passant donc d'une forme aplatie à sphérique. Aucun signe morphologique n'indique leur destinée. En milieu de gastrulation (75% épibolie), les cellules de l'endoderme adoptent une forme qui les distingue des cellules du mésoderme. Elles s'aplatissent et développent des extensions fines du cytoplasme. Alors qu'à 60% épibolie les cellules de l'endoderme sont éparpillées et séparées les unes des autres, en fin de gastrulation, elles forment un tissu homogène en contact direct avec le vitellus (et donc avec la YSL), leur substrat de migration (Fig.3c,d; Warga et Nusslein-Wolhard, 1999).

### **I.2 L'induction de l'endoderme : données moléculaires et génétiques chez le Poisson Zèbre**

Les mécanismes moléculaires précoces conduisant à la formation de l'endoderme ont commencé à être élucidés tardivement par rapport au mésoderme et à l'ectoderme. Ces analyses moléculaires ont été menées initialement chez le xénope et ont permis d'isoler de nombreux facteurs spécifiques de l'endoderme dont l'activité est essentielle pour la bonne différenciation de ses cellules (Dale, 1999; Shivdasani, 2000).

En plus de l'analyse du développement de l'endoderme par des approches moléculaires similaires à celles faites chez le xénope, plusieurs mutants génétiques ne possédant pas d'endoderme ont été décrits et analysés chez le poisson zèbre.

### **I.2.a Les mutants dépourvus d'endoderme**

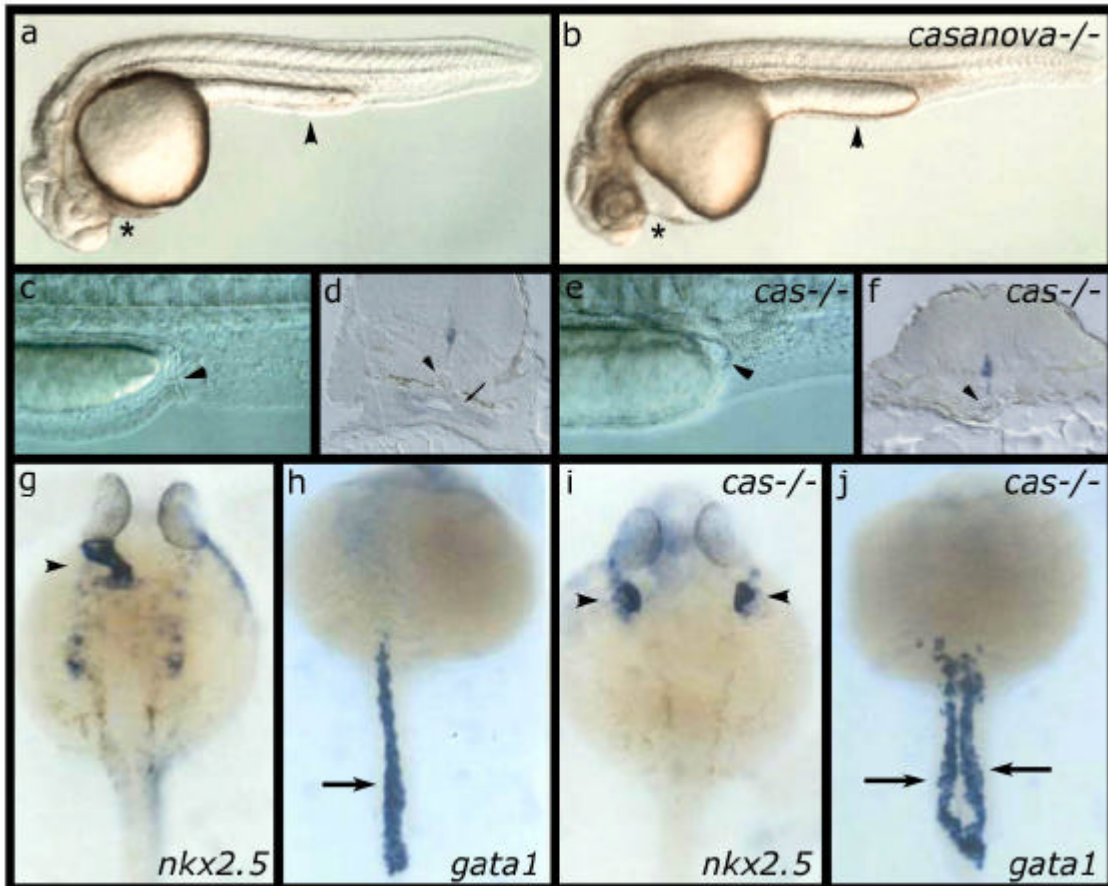
Au cours du crible de mutagenèse à ENU grande échelle réalisé en 1996 (Haffter *et al*, 1996), plusieurs mutants génétiques ne possédant plus de dérivés endodermiques ont été identifiés (Fig.4a-f). Trois mutants interviennent dans la signalisation Nodal : *one-eye pinhead* (*oep*), *cyclops* (*cyc*) et *squint* (*sqt*) (Sampath *et al*, 1998; Feldman *et al*, 1998; Gritsman *et al*, 1999; Schier et Shen, 2000). En plus de l'absence totale d'endoderme, ces mutants possèdent des défauts au niveau du mésoderme, les Nodal étant requis pour la mise en place des feuilletts embryonnaires le long de l'axe animal-végétal. Trois autres mutants déficients principalement pour la formation de l'endoderme ont été décrits : *bonnie & clyde* (*bon*), *faust* (*fau*) et *casanova* (*cas*) (Alexander *et al*, 1999; Alexander et Stainier, 1999; Kikuchi *et al*, 2000; Reiter *et al*, 1999 et 2001) .

#### **I.2.a.1 Les caractéristiques phénotypiques des mutants déficients en endoderme**

En plus de l'absence de dérivés endodermiques, les mutants d'endoderme présentent d'autres phénotypes (Fig.4g-j). En particulier, leur territoire cardiaque est divisé en deux (Fig.4g,i). Cette région se forme à partir de la partie antérieure du mésoderme paraxial. En début de somitogenèse, l'embryon possède donc deux primordia cardiaques de chaque côté de l'axe. Progressivement, les deux populations de cellules migrent l'une vers l'autre et, finalement, fusionnent pour former un cœur unique. Ce processus de fusion est altéré chez les mutants dépourvus d'endoderme, mais les deux parties du cœur sont correctement formées et fonctionnent normalement ; il est possible de les voir battre à un jour de développement. Il semble que ce phénotype soit causé par l'absence d'endoderme. Ce feuillet pourrait constituer un substrat important pour la fusion des deux populations de cellules cardiaques.

Ces mutants déficients pour la formation de l'endoderme présentent aussi une extension du vitellus plus courte et plus large que chez les embryons sauvages (Fig.4a,b).

Chez le mutant *casanova* la fusion d'autres territoires d'origine latérale qui converge normalement vers la ligne médiane, comme la région hématopoïétique, est abolie (Fig.4h,j; Alexander *et al*, 1999). Cela suggère que l'endoderme pourrait être requis comme substrat de migration de plusieurs territoires mésodermiques.



**II-Figure 4: Les caractéristiques phénotypiques d'un mutant dépourvu d'endoderme.**

Observations morphologiques de territoires endodermiques (c-f) et mésodermiques (g-j) à 24h chez un embryon sauvage (a,c,d,g,h) et un embryon mutant *casanova* (b,e,f,i,j).. Chez le mutant *casanova*, les embryons ont un tube vitellin épaissi (triangle en a et b) et une cavité cardiaque dilatée (étoile en a et b). Chez le sauvage l'intestin (flèche en d) se situe sous la notochorde (triangle en d) et se débouche sur le proctodeum (triangle en c). Dans les mutants *cas*, l'intestin est absent (e,f). L'observation de l'expression des gènes *nkx2.5* et *gata1* indique que les territoires cardiaque (g et i) et hématopoïétique (h et j) ne sont plus fusionnés dans des mutants *cas*. Stades et orientations: Tous les embryons sont à 24h de développement et photographiés en vue latérale (a,b,c,e) ou dorsale (g-j). Les photos d et f sont des coupes transversales réalisées au niveau du tube vitellin. Figure adaptée de Kikuchi *et al*, 2000.

### **I.2.a.2 L'absence d'induction de l'endoderme**

La description détaillée de ces mutants indique une absence totale ou partielle de cellules de l'endoderme au cours de la gastrulation, sur des critères d'observation microscopique (forme) ou d'expression génique. En effet, d'un point de vue moléculaire, les gènes spécifiques de l'endoderme dans tous ces mutants ont une expression altérée (mutants *sqt*, *oep*, *bon* et *fau*) ou nulle (mutants *sqt/cyc*, *MZoep* et *cas*) (Fig.5; Alexander et Stainier, 1999, Kikuchi *et al*, 2000, Reiter *et al*, 1999). Cela suggère que la signalisation Nodal et le facteur Casanova sont absolument requis pour l'expression correcte de ces gènes spécifiques.

Ainsi ces souches mutantes sont déficientes pour l'induction précoce de l'endoderme.

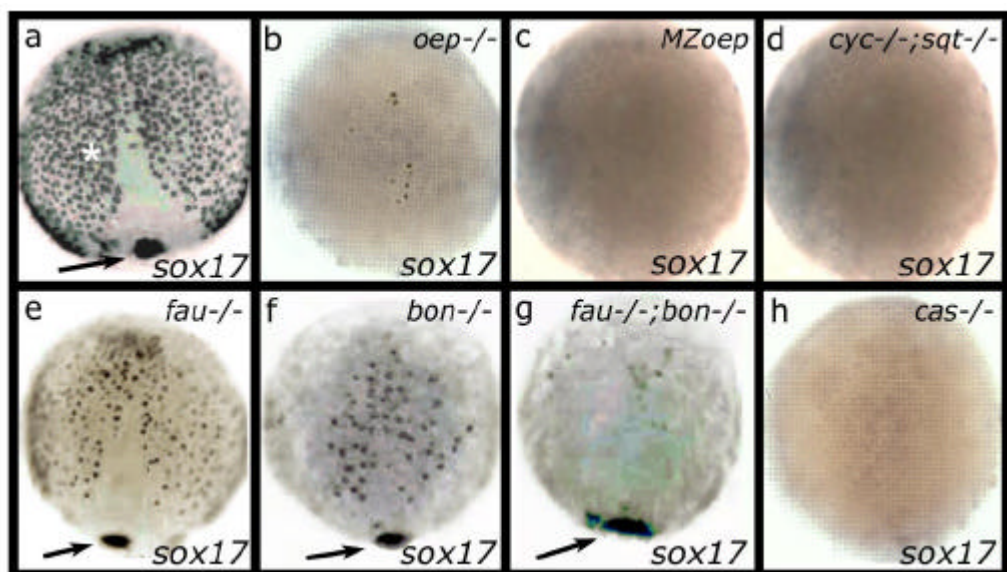
### **I.2.b Les gènes spécifiques de l'endoderme**

Le gène *sox17*, codant pour un facteur de transcription à domaine HMG (High Mobility Group), est le principal marqueur des cellules de l'endoderme (Alexander et Stainier, 1999). En effet, il s'exprime dès 50%épibolie (fin de blastula) jusqu'en fin de gastrulation, exclusivement dans les cellules de l'endoderme ainsi que dans les cellules « forerunner » (Fig. 5). Cette population cellulaire forme la vésicule de Kupffer pendant la somitogenèse et, à 24h, participent à la formation de la queue (Cooper et d'Amico, 1996). Chez le Xénope, l'activité des gènes *sox17* est essentielle pour la différenciation de l'endoderme (Hudson *et al*, 1997).

L'expression de *sox17* est régulée par les facteurs de transcription Mixer et Gata5 (Alexander *et al*, 1999; Reiter *et al*, 1999; Rodaway *et al*, 1999; Kikuchi *et al*, 2000).

*mixer* code pour un facteur de transcription à homéodomaine, dont de nombreux homologues existent chez le Xénope jouant un rôle au cours de la différenciation de l'endoderme (Shivdasani, 2002; Stainier, 2002). Chez le poisson, *mixer* est muté dans la souche *bonnie and clyde* (*bon*) et s'exprime plus précocement que *sox17* (dès le stade sphère) dans un large domaine marginal comprenant des cellules du mésoderme et de l'endoderme. Son expression s'arrête en milieu de gastrula (Alexander *et al*, 1999, Kikuchi *et al*, 2000).

*gata5* code pour un facteur de transcription à doigts de zinc et il possède, comme *mixer*, plusieurs homologues chez le Xénope, impliqués aussi dans la différenciation de l'endoderme (Shivdasani, 2002; Stainer, 2002). *gata5* présente un patron d'expression similaire à celui de *mixer*, mais s'exprime aussi fortement dans la partie antérieure de mésoderme para-axial, région d'où se différencient les précurseurs cardiaques (Rodaway *et al*, 1999; Reiter *et al*, 1999). *gata5* est muté dans la souche *faust* (*fau*).



**II-Figure 5: Expression de *sox17* en fin de gastrulation dans divers fonds génétiques.**

Dans un embryon sauvage, *sox17* s'exprime dans les cellules de l'endoderme (étoile en a) ainsi que dans les cellules "forerunner" (flèche en a). La perte de fonction des gènes *oep*, *cyc*, *sqt* et *cas* abolit l'expression de *sox17* dans tout l'embryon (b-d, h). Les embryons mutants *bon*, *fau* et *bon/fau* ont un nombre de cellules positives pour *sox17* diminué, le territoire des cellules "forerunner" n'étant pas altéré (flèche en e, f et g). Tous les embryons ont été photographiés en fin de gastrulation (90% epibolie) en vue dorsale.

Enfin, au sein de la famille de facteurs de transcription de type Forkhead, deux protéines, FoxA3/fkd2/HNF3 $\alpha$  et FoxA2/HNF3 $\beta$ /Axial, sont présentes précocement dans l'endoderme et au niveau de l'organisateur (Odenthal et Nüsslein-Volhard, 1998; Warga et Nüsslein-Volhard, 1999). En particulier, l'expression endodermique de *foxA2/axial* débute en même temps que *sox17*, en début de gastrulation et semble aussi régulée aussi par les facteurs Mixer et Gata5.

### **I.2.c Un modèle d'induction de l'endoderme chez le poisson zèbre.**

A partir de données génétiques et moléculaires, un modèle de cascade de régulation a été proposé.

#### **I.2.c.1 L'endoderme est induit par une signalisation TGF $\beta$ provenant du vitellus**

L'importance de la signalisation des TGF $\beta$  montrée initialement chez le Xénope a été confirmée et détaillée chez le poisson zèbre par des approches génétiques et moléculaires.

##### ***I.2.c.1.1 Utilisation de Taram-A (=Récepteur de type IA de l'Activin)***

Des cellules injectées avec une forme constitutivement activée du récepteur de type IA de l'Activin (=TaramA), se différencient presque exclusivement en endoderme. Ces cellules participent aussi à la glande d'éclosion et à la vésicule de Kupffer (Peyriéras *et al*, 1998). Cette construction active fortement la voie Activin/Nodal, quelque soit la dose d'ARNm injecté, ce qui correspond à un niveau de Nodal maximal (déterminant l'endoderme, la plaque préchordale et les cellules « forerunner »). Les cellules ne peuvent pas se différencier en mésoderme qui requiert une signalisation Nodal moindre. Cette protéine, qui active constitutivement la voie de signalisation Nodal, a été utilisée comme outil pour conduire les cellules vers un devenir endodermal.

##### ***I.2.c.1.2 Un signal TGF $\beta$ provenant du vitellus***

Rodaway *et al* ont montré que le gène *gata5* était induit par des signaux provenant du vitellus, comme ce qui avait été déjà décrit pour l'induction du gène à expression marginale *notail* (*ntl*) (homologue de T/Xbra) (Mizuno *et al*, 1996 ; Rodaway *et al*, 1999).

Les auteurs proposent que les signaux provenant du vitellus et induisant l'endoderme appartiennent à la superfamille des TGF $\beta$ . En effet, la sur-expression d'une forme dominante négative du récepteur de type II de l'Activin ne permet plus l'induction de *gata5* lors des expériences de transplantation de vitellus. De plus, l'injection localisée de l'Activin induit *gata5* et *ntl* selon un patron d'expression similaire à l'endogène (Rodaway *et al*, 1999).



### ***1.2.c.1. Nature du signal TGF***

TaramA ou l'Activin sont des outils pour stimuler la voie de signalisation TGF, mais ils n'indiquent pas la nature des signaux endogènes. Les candidats évidents sont les facteurs Nodal. Ils sont exprimés au bon moment, au bon endroit pour être les inducteurs endogènes. En particulier, *sqt* est exprimé dans la YSL, qui constitue le substrat de migration de l'endoderme. De plus, comme nous l'avons déjà détaillé, leur perte ou leur gain de fonction perturbe la différenciation de l'endoderme (Schier et Shen, 2000).

Le rôle de l'Activin paraît moins clair. En effet, aucune preuve de son implication *in vivo* n'a été démontrée. De plus, l'expression zygotique de l'*activin*A et B ne commence qu'à 5h de développement (fin de stade blastula), à un moment où l'endoderme a déjà été induit. Même si l'ActivinB est déposée dans le zygote par le génome maternel (détecté par RT-PCR), aucune localisation végétale particulière des ARNm n'a été observée (dissection de l'embryon et RT-PCR) (Rodaway *et al*, 1999). Ainsi ces observations ne penchent pas en faveur d'un rôle *in vivo* de l'Activin pour l'induction de l'endoderme, toutefois cette hypothèse ne peut être complètement exclue.

### ***1.2.c.1. L'endoderme requiert un signal Nodal transitoire***

David et Rosa (2001) ont montré que les cellules de l'endoderme étaient déterminées en fin de stade blastula. Les auteurs ont observé que la simple stimulation de la voie Activin/Nodal par Taram-A<sup>D</sup> permet à des cellules naïves de l'ectoderme d'acquérir une identité (expression de gène et forme) et un comportement spécifiques (migration sur la YSL) des cellules endodermes. De plus, ils ont montré que pour se différencier en endoderme, seul un signal Nodal transitoire est nécessaire (une à deux heures). En effet, lorsqu'ils injectent Taram-A<sup>D</sup> au stade deux cellules, toutes les cellules de l'embryon expriment des marqueurs spécifiques de l'endoderme (*sox17*). De plus, si elles sont greffées dans un embryon hôte, elle adoptent un comportement endodermal. La co-injection d'une forme dominante-négative du facteur de transcription en aval de la voie Nodal, FoxH1/FAST1 (FAST<sup>SID</sup>), suffit pour abolir l'induction de *sox17* et la capacité des cellules greffées à participer à l'endoderme. Cependant s'ils injectent Taram-A<sup>D</sup> au stade 2 cellules et FAST<sup>SID</sup> dans un blastomère au stade 16cellules, la détermination stable en endoderme est rétablie. Il suffit donc d'un signal transitoire de Nodal pour lancer un programme endodermal durable (David et Rosa, 2001).

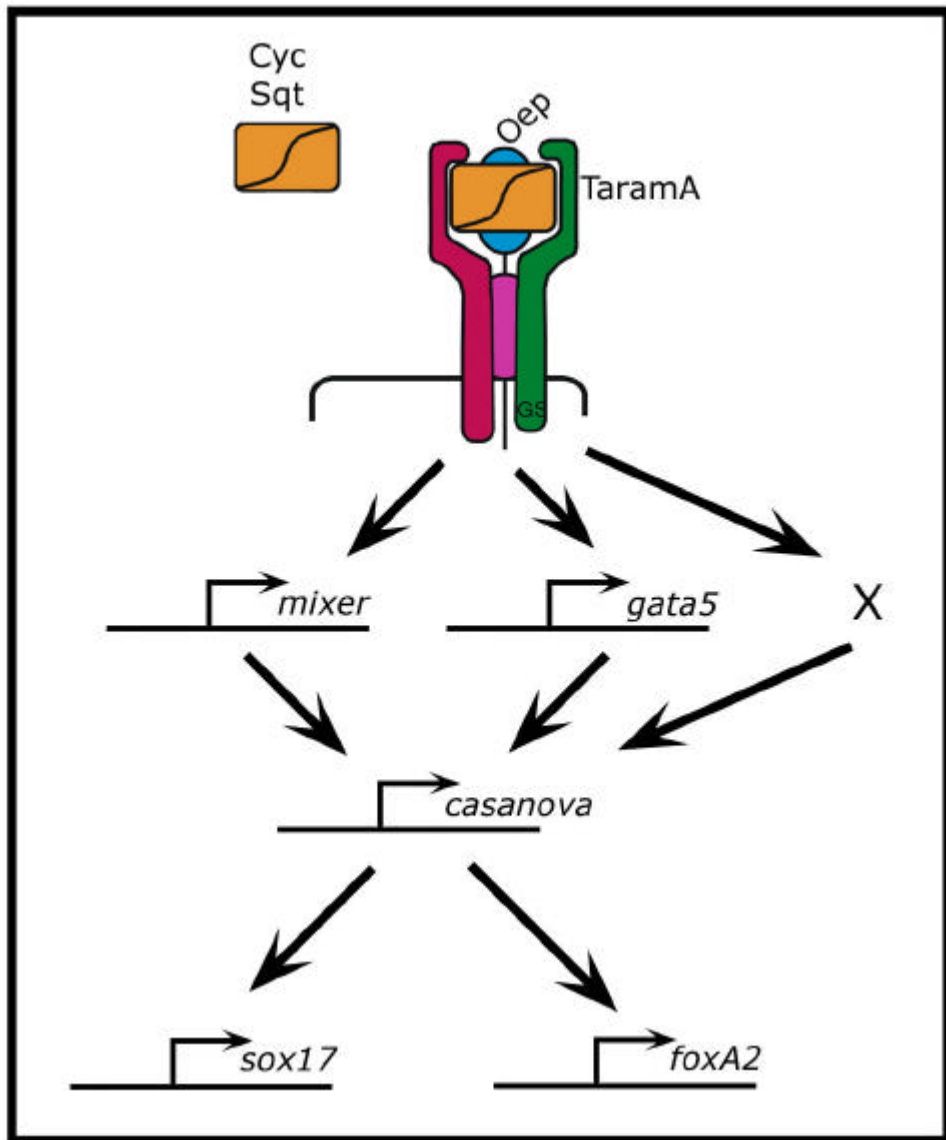
### **I.2.c.2 L'homologue de VegT chez le poisson zèbre**

Si l'implication de la signalisation Nodal a été bien mise en évidence pour la détermination de l'endoderme, les signaux inducteurs des Nodal pour ce processus sont encore inconnus chez le poisson zèbre (Stainier, 2002). Par contre, chez le xénope, le facteur de transcription VegT (de type "T-box") est concentré maternellement dans les blastomères végétaux et constitue l'acteur le plus précoce qui active tous les gènes de la voie de différenciation de l'endoderme (Horb *et al*, 1996; Zhang *et al*, 1996; Yasuo et Lemaire, 1999). Son activité est essentielle pour la différenciation de l'endoderme. Cependant, l'homologue de *vegT* chez le poisson zèbre, *tbx16*, n'est pas exprimé maternellement et ne possède pas ces capacités. Ce gène est muté dans la souche *spadetail (spt)* et ne présente que des anomalies au niveau du mésoderme postérieur (Griffin *et al*, 1998). Par contre, la protéine codée par le gène *eomesodermin*, appartenant aussi à la famille des facteurs de transcription de type T-box, est localisée au pôle végétal dans les embryons de poisson. Cependant, l'activité de cette molécule est différente de celle de VegT, et semble plutôt impliquée dans la détermination du centre organisateur, en activant les gènes Nodal (Bruce *et al*, 2003). Ainsi, pour l'instant, aucune activité homologue à celle de VegT chez le xénope n'a été trouvée dans l'embryon de poisson zèbre.

### **I.2.c.3 Facteurs en aval de la signalisation Nodal dans les cellules de l'endoderme**

En aval de la signalisation Nodal, les acteurs moléculaires impliqués dans l'induction de l'endoderme commencent à être identifiés. Tout d'abord, dans les mutants *bon* et *fau*, l'expression de *sox17* est diminuée mais pas complètement abolie (Fig.5e,f). Dans les doubles mutants *bon/fau*, la transcription de *sox17* est complètement perdue dans l'endoderme (l'expression dans les cellules forerunners est toujours présente) (Fig.5g; Reiter *et al*, 2001). De plus, dans les mutants *bon* et *fau* l'expression de *mixer* et *gata5* n'est pas altérée. A l'inverse, la sur-expression de ces deux facteurs induit *sox17* (Kikuchi *et al*, 2000; Reiter *et al*, 2001) Ces données indiquent que Bon/Mixer et Fau/Gata5 agissent en parallèle, en amont de *sox17*.

Par ailleurs, dans la souche *casanova*, l'expression de *sox17* est complètement abolie, et ce, même dans les cellules « forerunner » (Fig.5h; Alexander et Stainier, 1999). Cette perte de transcription n'est pas restaurée par la sur-expression de *gata5* ou de *mixer*. Cette observation montre que Casanova agit en aval ou en parallèle de Mixer et Gata5. Concernant l'activité moléculaire de Casanova, des expériences de transplantation de cellules ont montré que Casanova agissait de manière autonome cellulaire, suggérant que ce gène code pour un facteur de transcription (Alexander *et al*, 1999).



**II-Figure 6: Les principaux gènes impliqués dans la détermination précoce de l'endoderme.**

La voie de signalisation Nodal active l'expression des gènes *mixer* et *gata5* qui régulent l'expression des gènes *sox17* et *foxA2* par l'intermédiaire du gène *casanova*, absolument requis pour la différenciation de l'endoderme. Un facteur X, régulé par les Nodal et agissant sur l'expression de *sox17* par l'intermédiaire de *cas*, agit en parallèle de Gata5 et Mixer

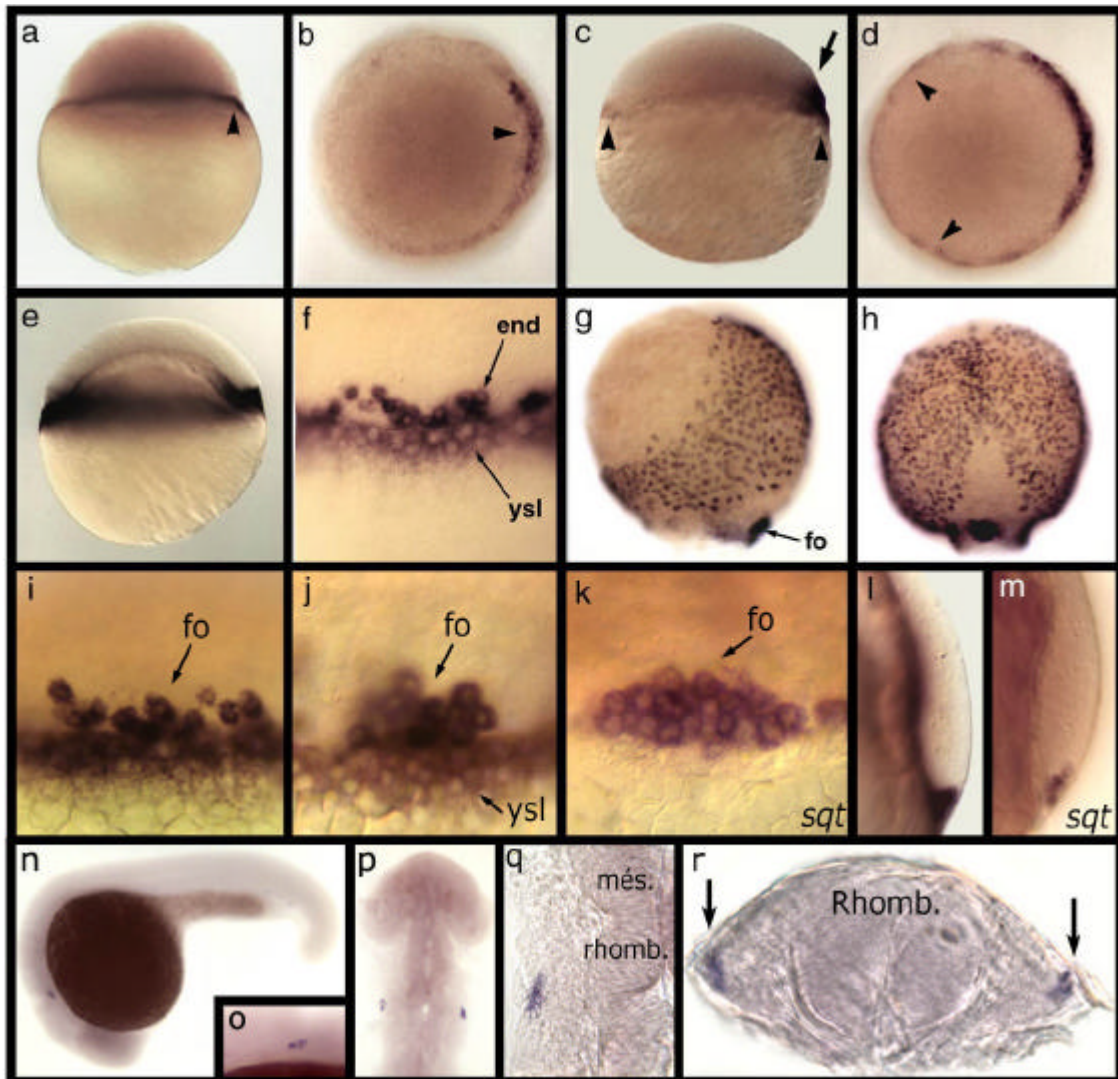
#### **I.2.c.4 Le modèle d'induction de l'endoderme**

Dans les mutants *bon*, *fau* et *cas*, la sur-expression de Nodal ne permet jamais de récupérer l'expression endogène de *sox17*. En plus de leur expression précoce, cela indique les gènes *nodal* agissent en amont de la signalisation de l'endoderme.

L'équipe de D. Stainier a proposé un modèle de détermination de l'endoderme (Fig.6). Après un signal Nodal initial, les facteurs de transcription Mixer et Gata5 activent l'expression de gènes cibles, dont *casanova*, ce qui permet l'expression de facteurs spécifiques de l'endoderme, tels que *sox17* et *foxA2/Axial* (Alexander et Stainier 1999; Kikuchi *et al*, 2000; Reiter *et al*, 2001).

Par ailleurs, la protéine Mixer peut interagir directement avec la forme phosphorylée de Smad2 (Randall *et al*, 2002). Ainsi, après avoir été induite par les Nodal, la protéine Mixer pourrait servir de co-facteur de transcription spécifique à l'endoderme.

L'équipe de D. Stainier postule aussi l'existence d'un troisième facteur (X) induit par les Nodal et agissant en parallèle de Mixer et Gata5 (Fig.6). En effet, la double mutation *bon/fau* n'abolit pas totalement l'expression de *sox17*, suggérant qu'il existe un troisième facteur requis pour maintenir l'expression de *sox17*. De plus la sur-expression de Mixer dans des mutants *cyc/sqt* ne restaure que faiblement l'expression de *sox17* (Kikuchi *et al*, 2000), suggérant que sans un facteur marginal induit par les Nodal, Mixer ne peut pas activer l'expression de *sox17*.



**II-Figure 7: Patron d'expression de *cg569* depuis la MBT jusqu'au stade 24 somites.**

L'expression de *cg569* débute à partir de 3hpf dans la YSL dorsale (triangle en a et b) et se propage à toute la YSL (triangle en c et d) ainsi qu'aux blastomères les plus dorsaux (flèche en c) au stade Sphère (4hpf). En fin de stade blastula (50% epibolie, e et f), l'expression de *cg569* est détectée toujours dans la YSL (flèche en f) ainsi que dans une fraction des cellules les plus marginales du blastoderme (flèche en f). En fin de gastrulation (90% epibolie, g et h) *cg569* s'exprime dans des cellules qui ont la répartition et la morphologie des cellules de l'endoderme. L'expression de *cg569* est aussi détectée dans les cellules "forerunner" depuis le début de la gastrulation (i, 6hpf) jusqu'en fin de gastrulation (h et flèche en g). *cg569* est co-exprimé avec *sqt* dans les cellules "forerunner" pendant toute la gastrulation (j-m). En fin de somitogenèse, quelques cellules situées au niveau du rhombencéphale (n,o,q) de chaque côté de l'embryon (p,r) expriment *cg569*. Ces cellules sont situées à l'extrémité du mésoderme para-axial et sont d'origine inconnue (flèche en r). Orientations: Les embryons en a,c,e,g,l,m,n et o sont en vue latérale; en b et d en vue depuis le pôle animal; en f,h,i-k, p et q en vue dorsale. La photo en r est une coupe transversale, côté dorsal vers le haut. Tous les embryons sont orientés pôle animal vers le haut et côté dorsal vers la droite, sauf pour les embryons en vue dorsale et à 24 somites (n-r). Abréviations: end: endoderme, ysl: couche vitelline syncytiale, fo: cellules forerunner, més.: mésencéphale, rhomb.: rhombencéphale.

## **II. Résultats: Casanova médiateur de la signalisation Nodal au cours de la différenciation de l'endoderme**

La plupart des gènes mutés dans des souches déficientes pour l'induction de l'endoderme ayant été clonés, seul Casanova restait à être identifié. Son étude était particulièrement cruciale pour l'étude de la formation de l'endoderme car les souches mutantes *casanova* ont un phénotype très sévère (plus aucune cellules positives pour *sox17* ne sont détectées).

En collaboration avec l'équipe de D.Y. Stainier, nous avons identifié le gène muté dans la souche *casanova*, analysé sa position dans la cascade d'induction de l'endoderme en aval de la signalisation Nodal et étudié son activité par sur-expression localisée.

### **II.1 Le gène *casanova* code pour une protéine de la famille Sox.**

#### **II.1.a Les mutants *casanova***

Nous avons analysé deux allèles mutants de la souche *casanova*: *cas<sup>s4</sup>* (Alexander *et al*, 1998) et *cas<sup>ta56</sup>* (Chen *et al*, 1996). Les phénotypes de ces deux mutants sont pratiquement identiques. Les embryons *cas<sup>ta56</sup>/cas<sup>ta56</sup>* n'ont aucune cellule positive pour *sox17* et *foxA2* indiquant que cet allèle est nul. Cependant, souche *cas<sup>s4</sup>* présente quelques cellules exprimant *foxA2* en cours de gastrula, expression non maintenue par la suite, suggérant que cet allèle est hypomorphe.

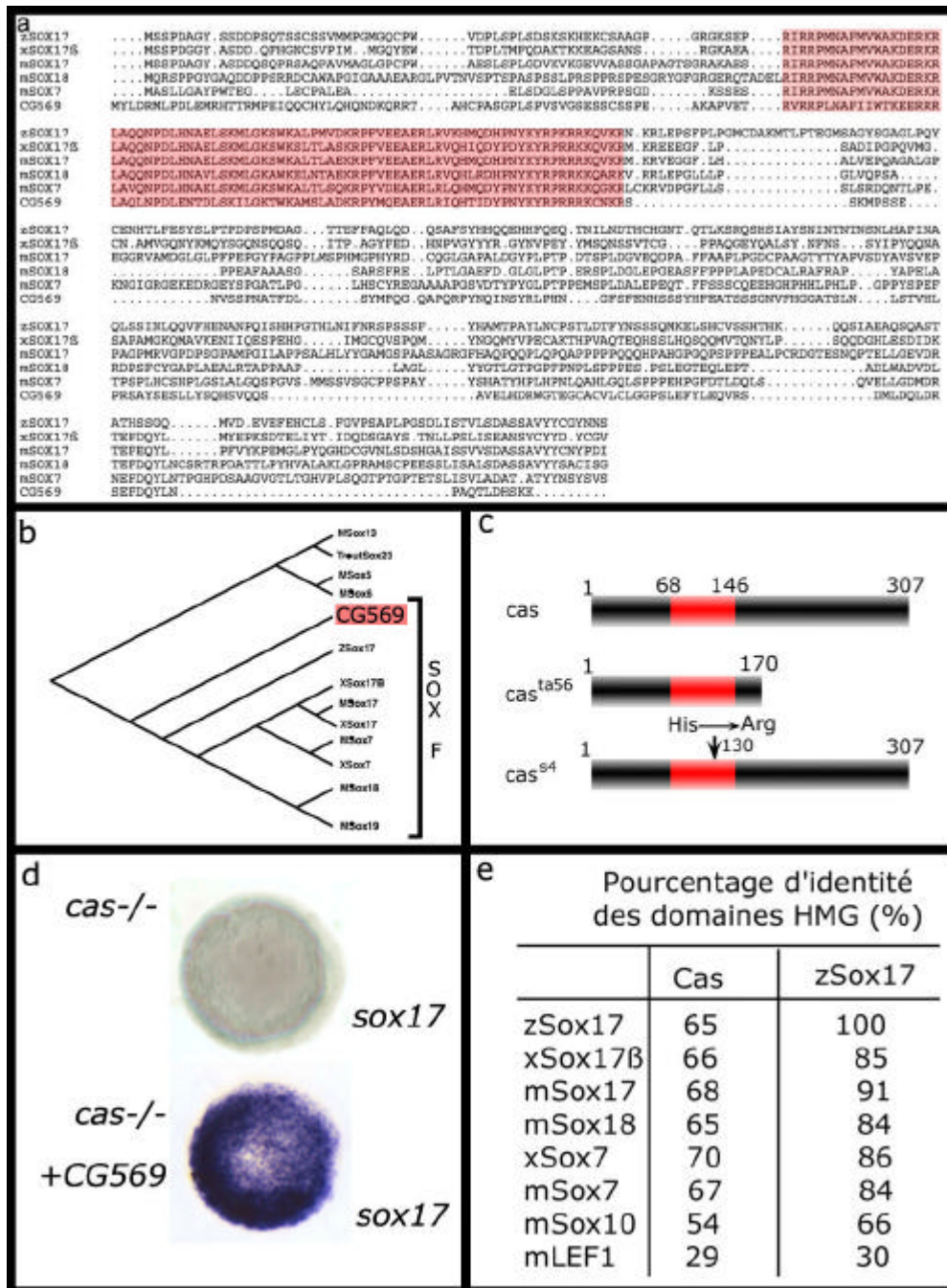
Par ailleurs, une approche par clonage positionnel avait permis de montrer que les allèles mutés dans les souches *casanova* étaient étroitement liés aux marqueurs polymorphiques Z7958 et Z9869.

#### **II.1.b Identification de Casanova**

##### **II.1.b.1 Patron d'expression de *cg569***

Lors du crible par hybridation *in situ* à grande échelle réalisé dans le laboratoire (Thisse *et al*, 2001), nous avons isolé le clone CG569 exprimé spécifiquement dans l'endoderme, la YSL ainsi que dans les cellules « forerunner ».

L'expression de *cg569* est détectée dès la MBT (stade High) dans la couche vitelline syncytiale (YSL) dorsale (Fig.7a,b). Au stade Sphère (4 hpf), *cg569* s'exprime dans toute la YSL ainsi que dans les blastomères marginaux dorsaux (Fig.7c,d). En cours de blastula, l'expression de *cg569* se propage autour de la marge et est maintenue dans la YSL (Fig.7e,f). Juste avant le début de la gastrulation, le patron d'expression ressemble à celui d'un gène spécifique de l'endoderme puisque seule une fraction des cellules les plus marginales exprime



**II-Figure 8: *cg569* code pour un nouveau membre de la famille SoxF muté dans la souche *casanova*.**

La protéine codée par *cg569* possède un domaine HMG de type Sox (en rouge en a) et appartient à la famille SoxF (b). *cg569* code pour une protéine de 307 acides aminés et est muté dans les souches *cas<sup>ta56</sup>* et *cas<sup>s4</sup>* ce qui produit une protéine tronquée en aval du domaine HMG (en rouge) ou mutée dans le domaine HMG (c). Alors que dans la souche *casanova* l'expression de *sox17* est indétectable, la sur-expression de *cg569* induit une forte expression de *sox17* dans toutes les cellules d'embryons *cas<sup>-/-</sup>* (d). La comparaison des domaines HMG de différentes protéines Sox indique que Cas est un nouveau membre de la famille SoxF (e). Préfixe devant le nom des protéines (en a, b et e): x= xénope, m=souris, z=poisson z èbre.

ce gène (Fig.7f). En cours de gastrulation, *cg569* est exprimé dans l'embryon comme *sox17* (endoderme et cellules « forerunner ») (Fig.7g-k). En fin de gastrulation, aucun transcrit n'est plus détectable dans la YSL et dans l'embryon. En cours de somitogenèse (22-26 somites), il est possible d'observer une expression transitoire de *cg569* dans un petit groupe de cellules situées de part et d'autre de l'axe, au niveau de la barrière mesencéphale - rhombencéphale (Fig.7n-q). Ces cellules semblent être du mésoderme para-axial (Fig.7r), mais leur nature est inconnue. Une dernière phase similaire d'expression est observable avec le gène *sox17*, bien que plus tardive (48hpf), dans une région supposée être à l'origine de la vessie natatoire (Alexander et Stainier, 1999). Etant donné que ce territoire marqué tardivement par *sox17* possède une localisation similaire à celle du groupe de cellules positives pour *cg569*, nous pouvons supposer que *cg569* s'exprime aussi dans le primordium de la vessie natatoire dès la somitogenèse.

En plus de se superposer parfaitement à l'expression de *sox17*, *cg569* est co-exprimé dans plusieurs territoires avec le gène *sqt/znr2*. En effet, l'expression de *sqt* débute aussi dans la YSL dorsale après la MBT puis se propage dans toute la YSL au stade Sphère (Erter *et al*, 1998, Feldman *et al*, 1998). Le début d'expression de *sqt* est observé dans les blastomères dorsaux puis tout autour de la marge. De même, *cg569* et *sqt* sont co-exprimés pendant la gastrulation dans les cellules forerunners (Fig.7l,m).

L'ensemble de ces observations (expression spécifique dans l'endoderme et co-expression avec *sqt*) indiquent que *cg569* était un gène candidat pour le gène inactivé dans la souche mutante *casanova*.

### **II.1.b.2 Liaison génétique des allèles mutés de *cas* et de *cg569***

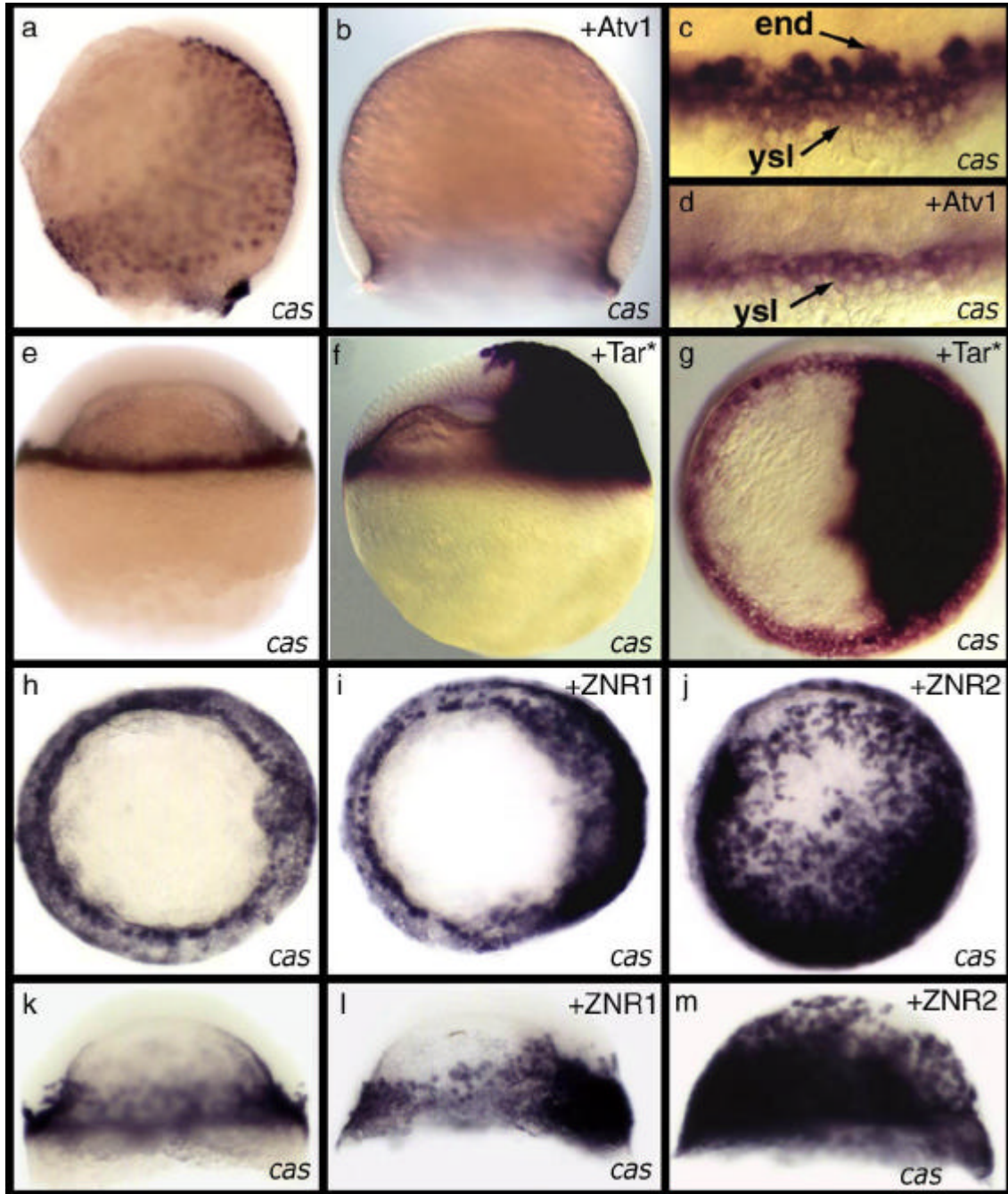
L'utilisation de marqueurs polymorphiques indique que l'allèle muté dans *casanova* est étroitement lié aux marqueurs Z7958 et Z9869. De plus, les allèles mutés de *cg569* dans les souches *cas<sup>s4</sup>* et *cas<sup>ta56</sup>* montrent aussi cette même liaison génétique avec ces marqueurs. Par ailleurs, les allèles mutés de *cg569* sont liés aux allèles *s4* et *ta56* de *casanova*.

### **II.1.b.2 *cg569* est muté dans les souches *cas<sup>ta56</sup>* et *cas<sup>s4</sup>***

Afin de tester directement cette hypothèse, nous avons réalisé le séquençage de *cg569* dans des contextes sauvage et mutant *casanova*.

*cg569* code pour un facteur de transcription à domaine HMG de la famille Sox. L'analyse phylogénétique indique qu'il appartient au groupe F, comme Sox7, 17 et 18 (Fig.8a,b). Dans





**II-Figure 9: La voie Nodal régule l'expression de *cas*.**

La perte de fonction de la voie Nodal par injection de 25pg d'ARNm codant pour *Atv1* abolit complètement l'expression de *cas* sauf dans la YSL (a-d). La sur-expression d'une forme activée du récepteur TaramA dans la moitié de l'embryon induit fortement l'expression de *cas* dans les cellules stimulées (e-g). Alors que la sur-expression de Squint/ZNR2 induit fortement l'expression de *cas* dans toutes les cellules de l'embryon (h,j,k,m), la sur-expression de Cyclops/ZNR1 n'induit *cas* que dans les cellules marginales (h,i,k,l). Stades: Tous les embryons sont photographiés en début de gastrulation (6hpf) sauf a et b en fin de gastrulation (90% epibolie). Orientations: Les embryons en a-f,k,l et m sont en vue latérale, pôle animal vers le haut, les autres sont en vue animale. Tous les embryons sont orienté côté dorsal à droite. Abréviations: end: endoderme; ysl: couche vitelline syncytiale; Tar\*: forme constitutivement activée de TaramA.

la souche *cas<sup>ta56</sup>*, le séquençage de *cg569* montre qu'il possède une substitution T→G qui introduit un codon STOP en position 170, en aval du domaine HMG. Dans les individus *cas<sup>s4</sup>*, il y a une substitution A→G qui change une Histidine en Arginine en position 130, au sein du domaine HMG (Fig.8c). Cette Histidine, très conservée dans les protéines Sox, est essentielle pour la fonction du domaine HMG puisqu'elle introduit une courbure du polypeptide requise pour une fixation correcte à l'ADN (Werner *et al*, 1995).

Par ailleurs, les allèles mutés de *cg569* dans les souches *cas<sup>s4</sup>* et *cas<sup>ta56</sup>* montrent la même liaison génétique avec les marqueurs polymorphiques Z7958 et Z9869. De plus, les allèles mutés de *cg569* sont liés aux allèles *s4* et *ta56* de *casanova*.

### **II.1.b.3 *cg569* code pour un nouveau membre de la famille Sox, inactivé dans la souche *casanova***

L'injection de l'ARN codant pour la forme sauvage de CG569 dans les souches *s4* et *ta56* permet de restaurer l'expression de *sox17* (Fig.8d), alors que l'injection de formes mutées de CG569 ne permet pas le sauvetage du phénotype.

*L'ensemble de ces données montrent que cg569 correspond bien au gène muté dans la souche casanova.*

La comparaison deux à deux des domaines HMG des différentes protéines du groupe SoxF révèle que le domaine HMG de CG569/Cas présente un pourcentage d'identité toujours inférieur à 70% avec les domaines HMG des autres membres de ce groupe (Sox7,17 et 18). La même analyse avec Sox17 indique un pourcentage d'identité toujours supérieur à 84% (Fig.8e).

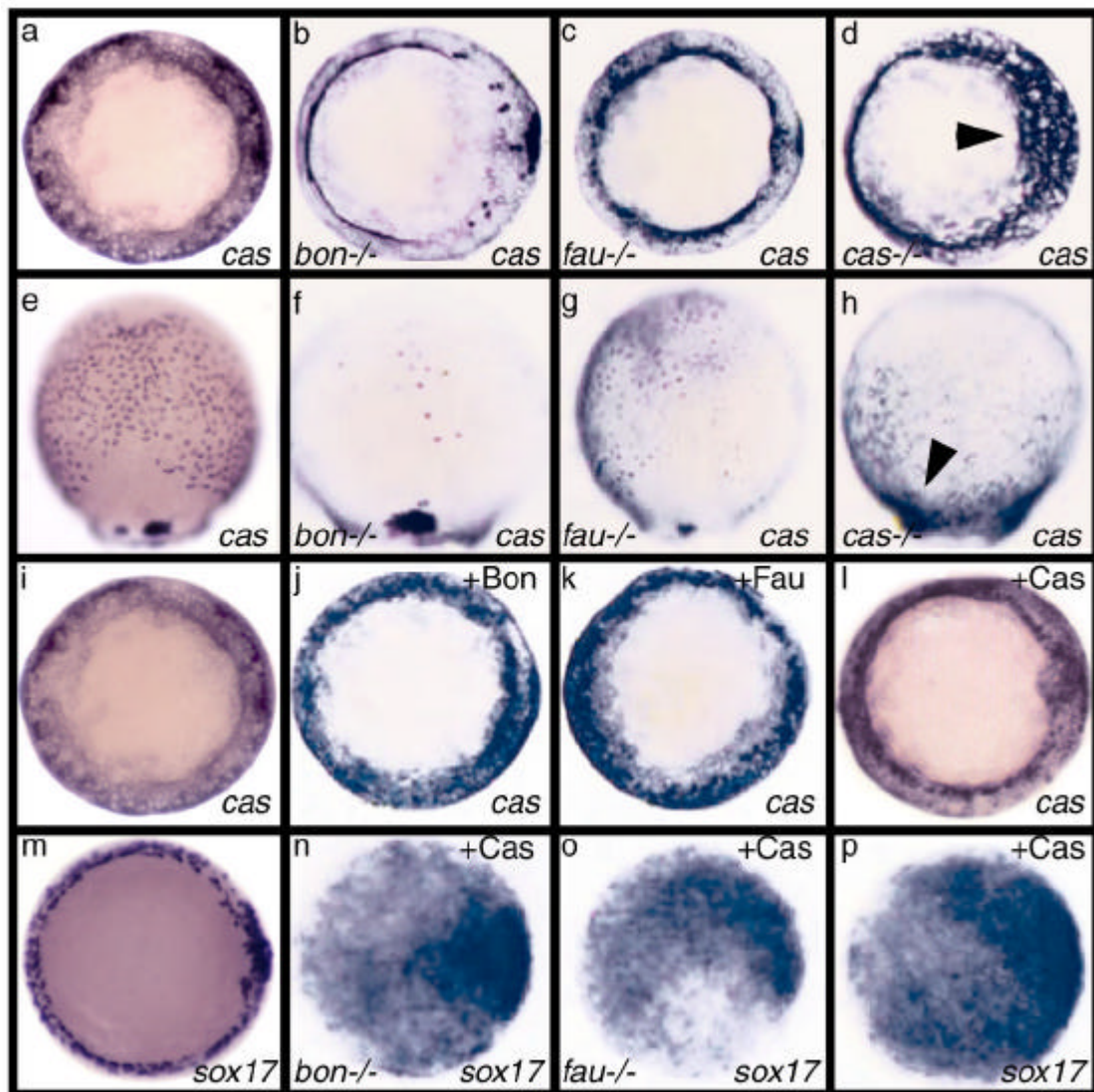
*Ainsi le gène casanova code pour un nouveau membre de la famille Sox.*

## **II.2 Casanova agit en aval de Mixer et Gata5**

Afin de vérifier la position de *casanova* au sein de la voie de signalisation conduisant à l'induction de l'endoderme, nous avons analysé les relations d'épistasie entre les différents acteurs connus de cette voie.

### **II.2.a Casanova agit en aval des Nodal**

Dans des embryons déficients pour la signalisation Nodal (injectés avec 25pg d'ARNm codant pour Antivin1), l'expression de *cas* dans le blastoderme est complètement abolie (Fig.9a,b).



**II-Figure 10: Casanova agit en aval de Mixer/bon et Gata5/fau et en amont de Sox17.**

Le nombre de cellules positives pour *cas* est diminué fortement dans les mutants *bon* (a,b,e,f) et faiblement dans les mutants *fau* (a,c,e,g). L'expression de *cas* dans le blastoderme est abolie dans les mutants *cas* et augmentée dans la YSL (a,d,e,h; flèche en d et h). La sur-expression de Bon/Mixer et Fau/Gata5 induit l'expression de *cas* uniquement dans les cellules de la marge (i-k). La sur-expression de Cas n'induit pas sa propre expression (l). La sur-expression de Cas induit fortement l'expression de *sox17* dans toutes les cellules de l'embryon dans des embryons sauvages (p) et dans des mutants *bon* et *fau* (n et o). Stades et orientations: Tous les embryons sont en début de gastrulation et en vue animale sauf en e,f,g et h en fin de gastrulation (90% epibolie) pris en photo en vue dorsal, pôle animal vers le haut.

Seule la YSL continue d'exprimer *cas* (Fig.9c,d). Le même résultat a été obtenu dans des embryons mutants *MZoepe* dépourvus de toute activité Nodal (non montré).

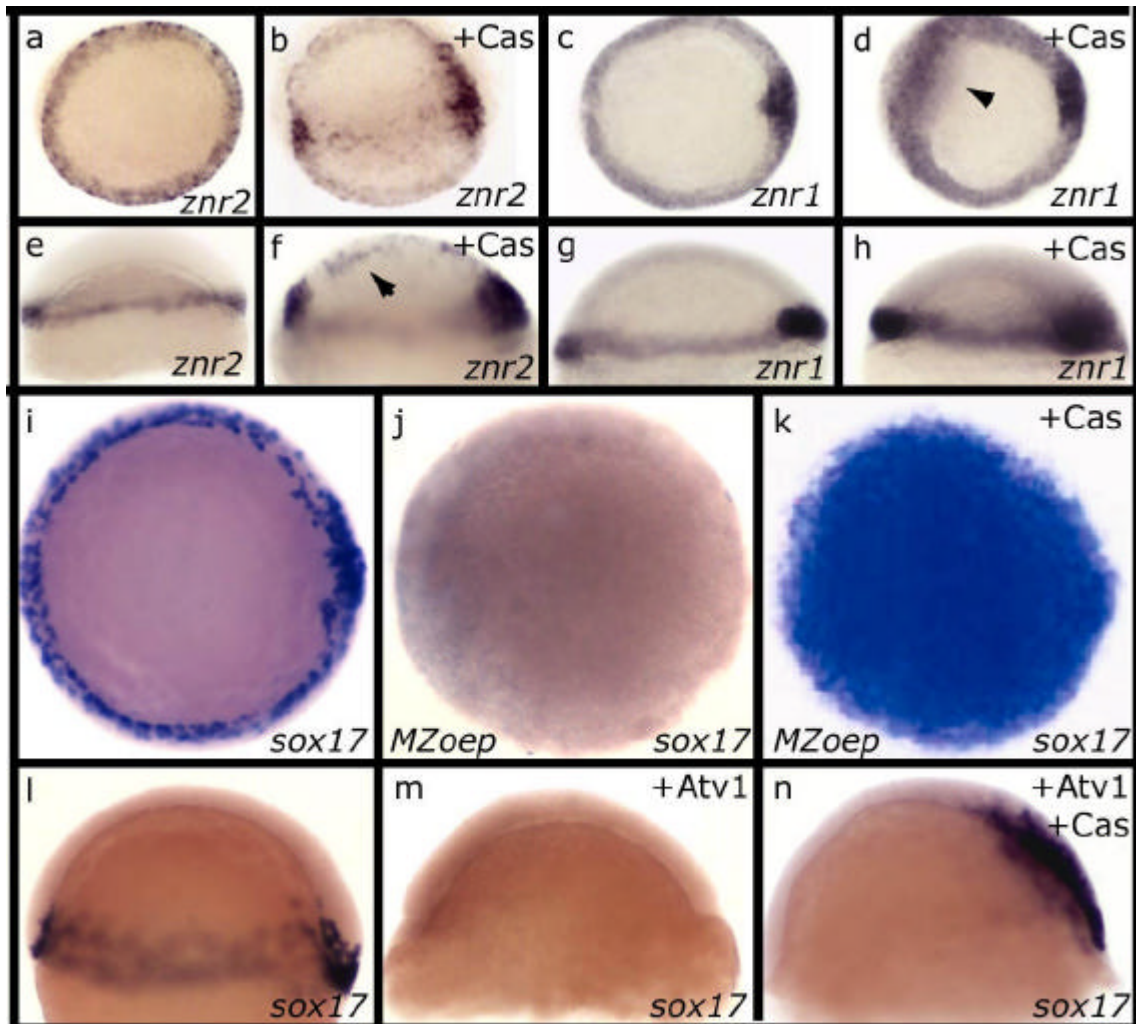
La sur-expression de *TaramA<sup>D</sup>* (100pg) dans un seul blastomère au stade deux cellules induit très fortement *cas* dans la moitié de l'embryon dérivant de la cellule injectée (Fig.9e-g). Les ligands ZNR1/Cyclops et ZNR2/Squint sont aussi capables d'induire l'expression de *cas*, mais avec des effets un peu différents. En effet, l'injection généralisée de ZNR1/Cyclops (100pg) produit une augmentation du nombre de cellules exprimant *cas* à la marge (Fig.9h,i,k,l). Même si les cellules de l'ectoderme possèdent l'ARNm codant pour Cyclops, elles n'expriment pas *casanova*. En revanche, la sur-expression de ZNR2/Squint (10g d'ARNm) peut induire *cas* dans toutes les cellules de l'embryon, marginales ou non (Fig.9h,j,k,m).

*De ces résultats, nous pouvons conclure que l'expression embryonnaire de casanova est dépendante de la signalisation Nodal; la partie extra-embryonnaire de l'expression (dans la YSL) étant régulée par d'autres facteurs. De plus, il semble que l'ectoderme ne puisse exprimer casanova sans la présence d'un co-facteur, induit par TaramA<sup>D</sup> et Squint, mais pas par Cyclops. Ainsi les deux ligands Nodal fonctionnent de manière sensiblement différente pour l'induction de ce gène.*

## **II.2.b Casanova agit en aval de *bon* et *fau***

Afin de vérifier les relations épistatiques avec Mixer et Gata5, nous avons analysé l'expression de *cas* dans les mutants *bon* et *fau*.

Comme pour *sox17*, l'expression endodermale de *cas* est fortement diminuée dans les souches mutantes *fau* et *bon* (Fig.10a-c). Les cellules « forerunner » et la YSL ne sont pas affectées. Cependant, dans les mutants *fau*, il reste plus de cellules positives pour *cas* que dans les mutants *bon* (Fig.10e-g), suggérant que la régulation de *cas* par Mixer est plus importante que par Gata5. Par ailleurs la sur-expression de Gata5 (60pg d'ARNm) ou de Mixer (100pg d'ARNm) conduit à une augmentation du nombre de cellules exprimant *cas* uniquement à la marge (Fig.10i-k). Aucune expression ectopique n'est observée dans l'ectoderme. La co-injection des deux facteurs donne le même résultat (non montré). Alors que Mixer et Gata5 ne peuvent restaurer l'expression de *sox17* dans des mutants *cas* (Alexander et Stainier, 1999; Reiter et al, 2001), la sur-expression de Cas (100pg) induit fortement *sox17* dans toutes les cellules de l'embryon qu'il soit sauvage ou mutant pour *bon* ou *fau* (Fig.10m-p).



**II-Figure 11: Casanova induit l'expression des *nodal* et celle de *sox17* en aval des Nodal.**

La sur-expression de Cas induit l'expression de Sqt/ZNR2 dans des cellules de la marge et du pôle animal (a,b,e,f, triangle en f) et celle de Cyc/ZNR1 uniquement dans les cellules de la marge (c,d,g,h, triangle en d). La sur-expression généralisée (k) ou localisée à 16 cellules (n) de Cas peut induire l'expression de *sox17* dans des embryons déficients pour la voie Nodal (i-n). Stades: Tous les embryons sont en début de gastrulation (6hpf) sauf an a,b,e et f qui sont en fin de stade blastula (40% epibolie). Orientations: Les photos ont été prises depuis le pôle animal en a-d et i-j et en vue latérale en e-h et l-n. Dans tous les cas le côté dorsal est à droite.

*Ces données suggèrent que Casanova agit en aval de Mixer et Gata5. Cependant il n'est pas exclu que les trois facteurs soient régulés de manière indépendante par Nodal et qu'ils agissent en parallèle.*

### **II.2.c Casanova ne contrôle pas sa propre expression**

Afin de déterminer si Cas est requis pour sa propre expression, nous avons observé son expression dans des souches déficientes pour *cas*. Dans ces embryons, *cas* est exprimé normalement jusqu'en fin de stade blastula (non montré) mais disparaît des cellules de l'endoderme, en cours de gastrulation (Fig.10d). Dans la YSL, l'expression est toujours détectée, voire augmentée. Ainsi l'expression de *Cas* dans l'endoderme est initiée mais pas maintenue. De plus, l'injection de 100pg de l'ARNm codant pour Cas dans des embryons sauvages n'augmente pas le nombre de cellules positives pour Cas à 40% épibolie (Fig.10l). Cependant, en milieu de gastrulation, l'expression de *cas* est fortement augmentée.

Ces données suggèrent que Cas ne régule pas directement sa propre expression. En effet, la perte ou le gain de fonction de ce gène ne modifie pas précocement son niveau d'expression. Par contre, en fin de gastrulation, le nombre de cellules positives pour *cas* augmente si Cas est sur-exprimé, et diminue s'il est muté. Cet effet est probablement indirect car l'activité de Cas contrôle le nombre de cellules endodermiques et donc, par conséquent, le nombre de cellules positives pour ce gène.

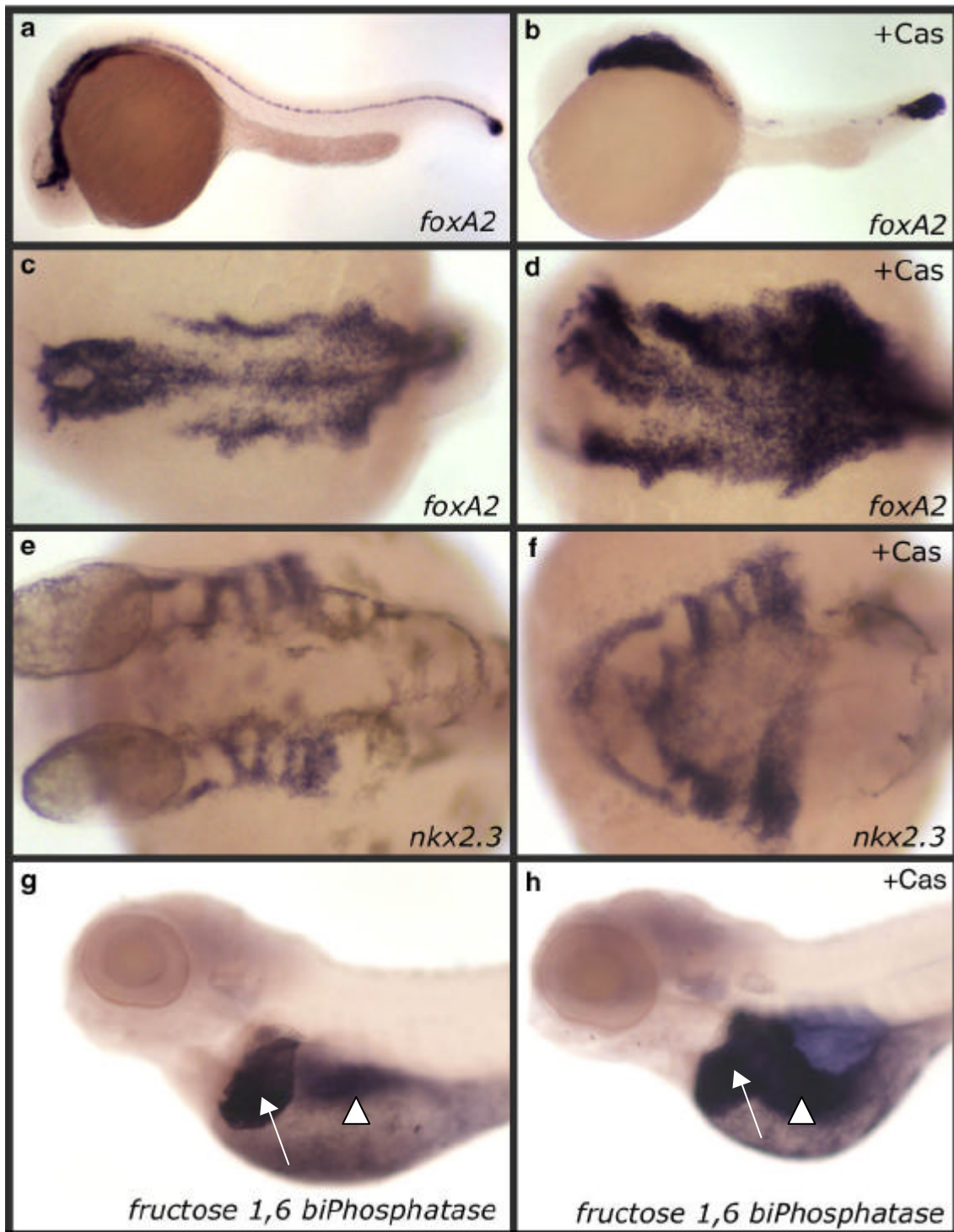
### **II.2.d Casanova peut induire l'expression des Nodal**

Gata5, Mixer et Casanova agissent en aval des Nodal. Ni Gata5, ni Mixer ne peuvent induire en retour l'expression des ligands *sqt* et *cyc* (Kikuchi *et al*, 2000, Reiter *et al*, 2001).

Afin de tester l'existence d'une possible régulation des Nodal par Cas, nous avons injecté au stade 1-2 cellules 100pg de l'ARN codant pour Cas et observé l'expression de *znr1/cyclops* et *znr2/squint*.

Le nombre de cellules positives pour *cyclops* est augmenté, uniquement dans le domaine marginal (Fig.11c,d,g). Par contre, l'expression de *sqt* est induite dans des cellules mésendodermiques et ectodermiques (Fig.11a,b,e,f).

Puisque Cas induit à la fois les *nodal* et *sox17*, il est possible que l'induction de *sox17* passe par les Nodal eux-mêmes. Afin de tester cette hypothèse, nous avons sur-exprimé Casanova (100pg) dans des embryons déficients pour la signalisation Nodal (*MZoepe* ou sur-exprimant Antivin1). Dans tous les cas, alors que *sox17* est absent dans ces embryons déficients, l'injection de Cas induit *sox17* dans tout l'embryon (Fig11i-n).



**II-Figure 12: La sur-expression de Cas peut induire un programme de différenciation endodermale complet.**

La sur-expression élargit le territoire de l'endoderme pharyngien marqué par l'expression des gènes *foxA2* et *nkx2.3* (a-f) ainsi que la taille du foie (flèche) et du bulbe intestinal embryonnaires (triangle) marqués par l'expression de la *fructose 1,6 biPhosphatase* (g,h). Stades et orientations: Tous les embryons ont été photographiés à 30hpf sauf en g et h à 72hpf. Les photos en a,b,g et h sont des vues latérales et en c-f sont des vues dorsales. Dans tous les cas le côté antérieur est vers la gauche.

*Ces données confirment la position de Cas en aval des Nodal et en amont de Sox17 et montrent l'existence d'une boucle d'autorégulation positive de Cas vers les Nodal. Nous pouvons supposer que cette rétroaction permet de maintenir une signalisation Nodal élevée dans les cellules de l'endoderme.*

#### **II.2.d Casanova initie un programme endodermal complet**

Afin de tester si la sur-expression de Casanova, en plus d'induire *sox17* et les gènes *nodal*, permet un déroulement complet du programme endodermique, nous avons testé l'expression de gènes spécifiques de l'endoderme à des stades plus tardifs.

A un jour de développement, *foxA2/axial* s'exprime dans la partie ventrale du tube neural ainsi que dans l'endoderme antérieur (endoderme pharyngien). L'injection de 100pg de l'ARNm codant pour Cas élargit très fortement le territoire pharyngien au détriment d'autres parties de l'embryon, tel que la plaque du plancher (Fig.12a-d). Un résultat similaire est obtenu avec *nkx2.3*, exprimé dans ce même territoire (Fig.12e,f).

La partie postérieure de l'endoderme, marquée par *hnf3* est aussi fortement élargie (non montré). A cinq jours de développement, le territoire hépatique ainsi que le bulbe intestinal, expriment le gène codant pour la 1,6 Fructose BiPhosphatase et montrent également une hypertrophie (Fig.12g,h).

*Ainsi, les cellules induites précocement par Casanova sont capables d'accomplir un programme endodermal complet.*

#### **II.2.e Activité de Casanova dans l'ectoderme**

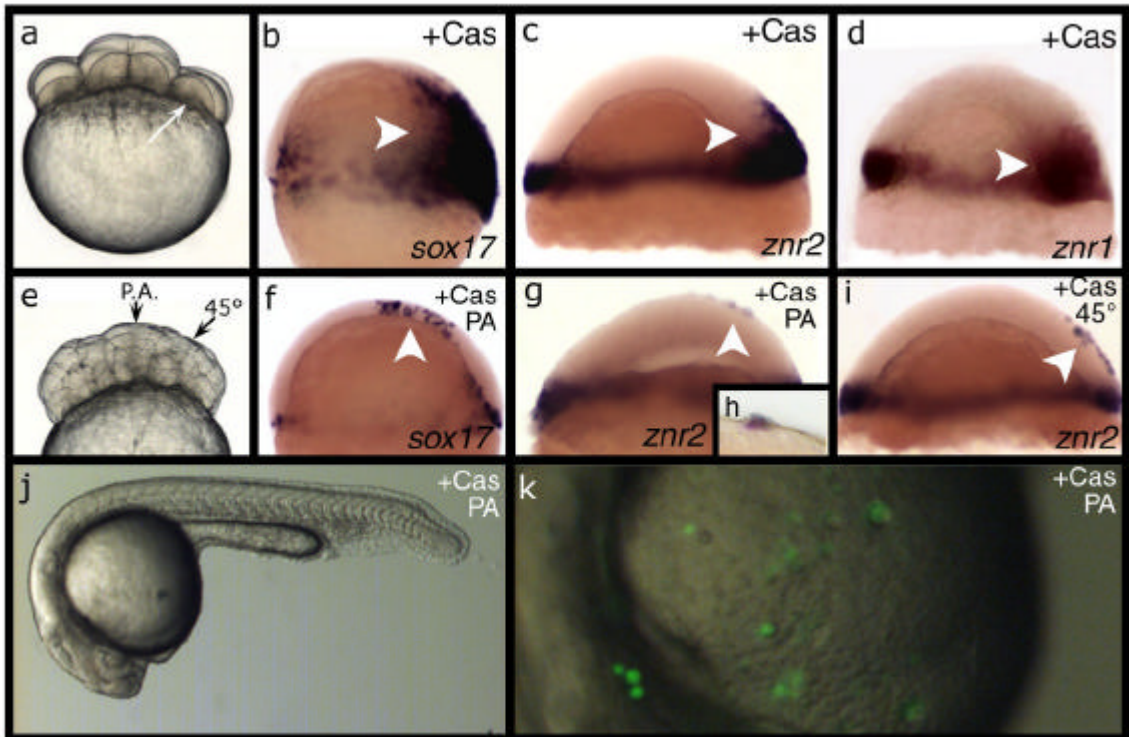
La sur-expression de Mixer ou Gata5 augmente le nombre de cellules positives pour *sox17* à la marge (Alexander et Stainier 1999; Reiter *et al*, 2001). Aucune induction ectopique de ce gène n'est détectée ce qui suggère que les cellules de l'ectoderme ne peuvent répondre à un signal d'induction de l'endoderme de la même manière que les cellules de la marge.

Afin d'explorer cette particularité, nous avons comparé les effets de la sur-expression de Casanova dans des cellules marginales et animales.

##### **II.2.e.1 Génération de clones de sur-expression localisés**

Nous avons injecté l'ARNm codant pour Cas avec celui codant pour la GFP (100pg) au stade 16-cellules dans les blastomères périphériques (qui vont se différencier essentiellement en mésendoderme) ou au stade 128-cellules au pôle animal (qui va former l'ectoderme) (voir Fig.13a,d et Matériel et Méthodes).





### **II-Figure 13: Activité de Cas dans l'ectoderme**

L'injection de l'ARNm codant pour Cas dans une cellule sur 16 (a) induit l'expression de *sox17* (b), *sqt/znr2* (c) et *cyc/znr1* (d) dans les cellules de la marge (flèches blanches). L'injection de l'ARNm codant pour Cas dans une cellule du pôle animal au stade 128-cellules (e) induit l'expression de *sox17* et pas celle de *sqt/znr2* sauf dans les cellules extra-embryonnaires de la couche enveloppante (g et h). Si le clone de sur-expression est décalée (45° en e) l'expression de *sqt/znr2* n'est toujours induite que dans les cellules de la couche enveloppante (i). Les cellules issues du blastomère injecté à 128-cellules par les ARNm codant pour Cas et pour la GFP ne participent pas à la formation de l'endoderme endogène et se dispersent dans l'embryon (j,k). Stades: Les embryons en b et f sont en début de gastrulation, en c,d,g et i en fin de stade blastula (40% epibolie) et en j et k à 24h. Orientations: Tous les embryons sont en vue latérale côté dorsal à droite et pôle animal vers le haut sauf en j et k, côté antérieur vers la gauche.

### **II.2.e.2 Casanova induit *sox17* mais pas les *nodal* au pôle animal**

La sur-expression de Casanova (50pg d'ARNm injecté) à la marge induit fortement l'expression de *sqt*, *cyc* et *sox17*, dans toute l'épaisseur du blastoderme (Fig15a-d).

Au pôle animal, alors que Cas active toujours la transcription de *sox17* dans les cellules de l'embryon (Fig.13f), *sqt* n'est induit que dans les cellules de la couche enveloppante, structure extra-embryonnaire (Fig.13,g,h). Aucune induction de *cyc* n'est détectable (non montré).

*Ainsi Casanova peut induire sox17 quelque soit le contexte cellulaire. Par contre, la boucle de rétrocontrôle positif vers les Nodal ne fonctionne plus dans les cellules de l'ectoderme. Seules les cellules extra-embryonnaires de la couche enveloppante ont la capacité de répondre à cette boucle de rétroaction.*

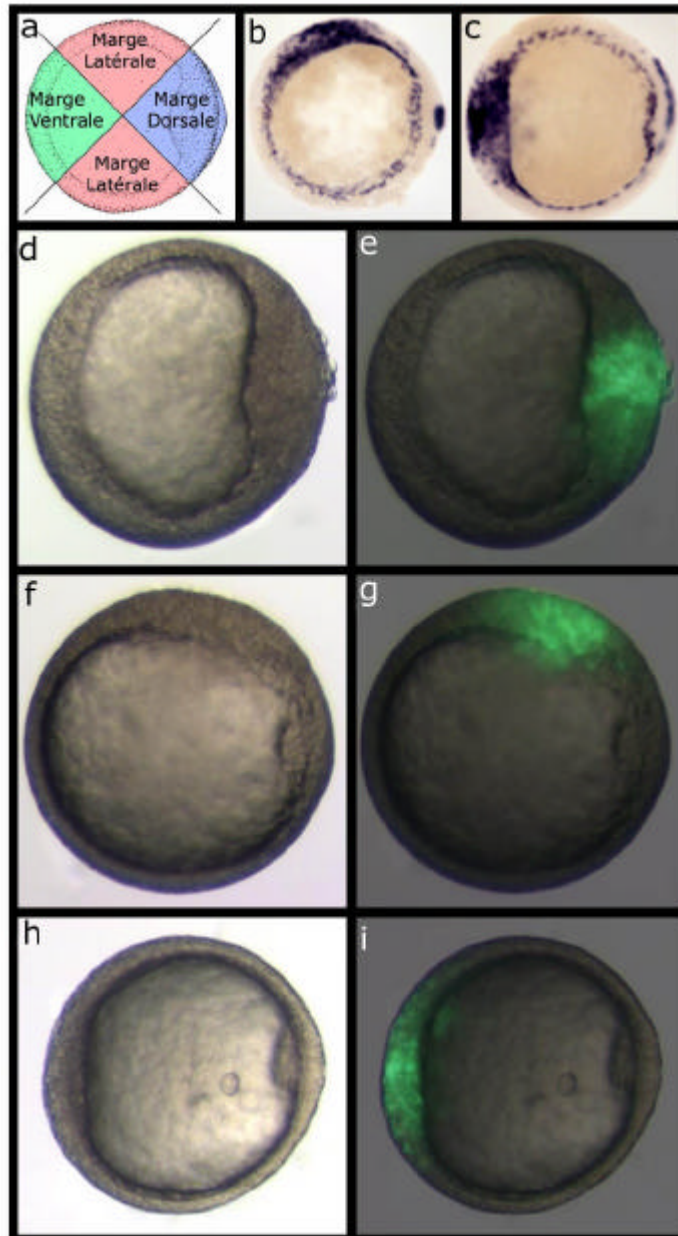
Lorsque les clones adoptent une position intermédiaire entre la marge et le pôle animal (injections à 45°. Voir Fig.13e et Matériel et Méthodes), nous observons que Cas perd la capacité d'induire *sqt/znr2* dans le blastoderme au delà d'une dizaine de diamètres cellulaires depuis la marge (Fig.13i).

Les cellules injectées au pôle animal initient un programme endodermal, (expression forte de *sox17*) mais ne continuent pas cette différenciation car, à 24h, elles n'acquièrent pas une localisation spécifique des dérivés endodermiques (Fig.13j,k). *Ainsi la sur-expression de Cas dans les cellules de l'ectoderme permet l'initiation mais pas la maintenance du programme de différenciation de l'endoderme.*

### **II.3 Casanova est suffisant pour induire un devenir endodermal dans les cellules de la marge**

Une forte stimulation de la voie Nodal (injection de TaramA<sup>D</sup>) dans les blastomères marginaux force les cellules à se différencier en endoderme (Peyrieras *et al*, 1998).

Afin de tester la capacité de Cas à conduire les cellules vers un devenir endodermal, nous avons injecté son ARNm (50pg), avec celui de la GFP (100pg), dans des blastomères marginaux. Pour localiser le clone issu de l'injection, les embryons sont triés en début de gastrulation, au moment où le côté dorsal (l'organisateur) est visible (Fig.14a,d-i et Matériel et Méthodes). Dans tous les cas, le clone injecté (positif pour la GFP) forme un épaissement de la marge, suggérant une activité d'involution importante (Fig.14d-i). De plus, ces cellules expriment fortement Sox17 (Fig.14c,d).



**II-Figure 14: Sur-expression localisée de Cas dans les cellules de la marge**

Les clones sur-exprimant Cas à la marge après injection à 16cellules sont triés en fonction de leur position par rapport à la marge dorsale (a) grâce à l'émission de la fluorescence de la GFP (d-i). Dans tous les cas, la sur-expression de Cas induit l'expression de *sox17* dans les cellules marginales (b,c). Stades et orientations: Tous les embryons sont en début de gastrulation (6hpf) en vue animale, côté dorsal à droite.

### **II.3.a Clones dorsaux**

#### **II.3.a.1 Les cellules colonisent l'endoderme**

Lorsque le clone sur-exprimant Cas est dorsal, les cellules issues du blastomère injecté adoptent à 24h une localisation endodermale tout le long de l'embryon, indiquant que les cellules ont subi de forts mouvements d'extension (Fig.15d,f). Un groupe de cellules positives pour la GFP, d'identité inconnue, s'accumulent postérieurement, au niveau des somites. Aucun des marqueurs moléculaires testés ne s'exprime dans cette région.

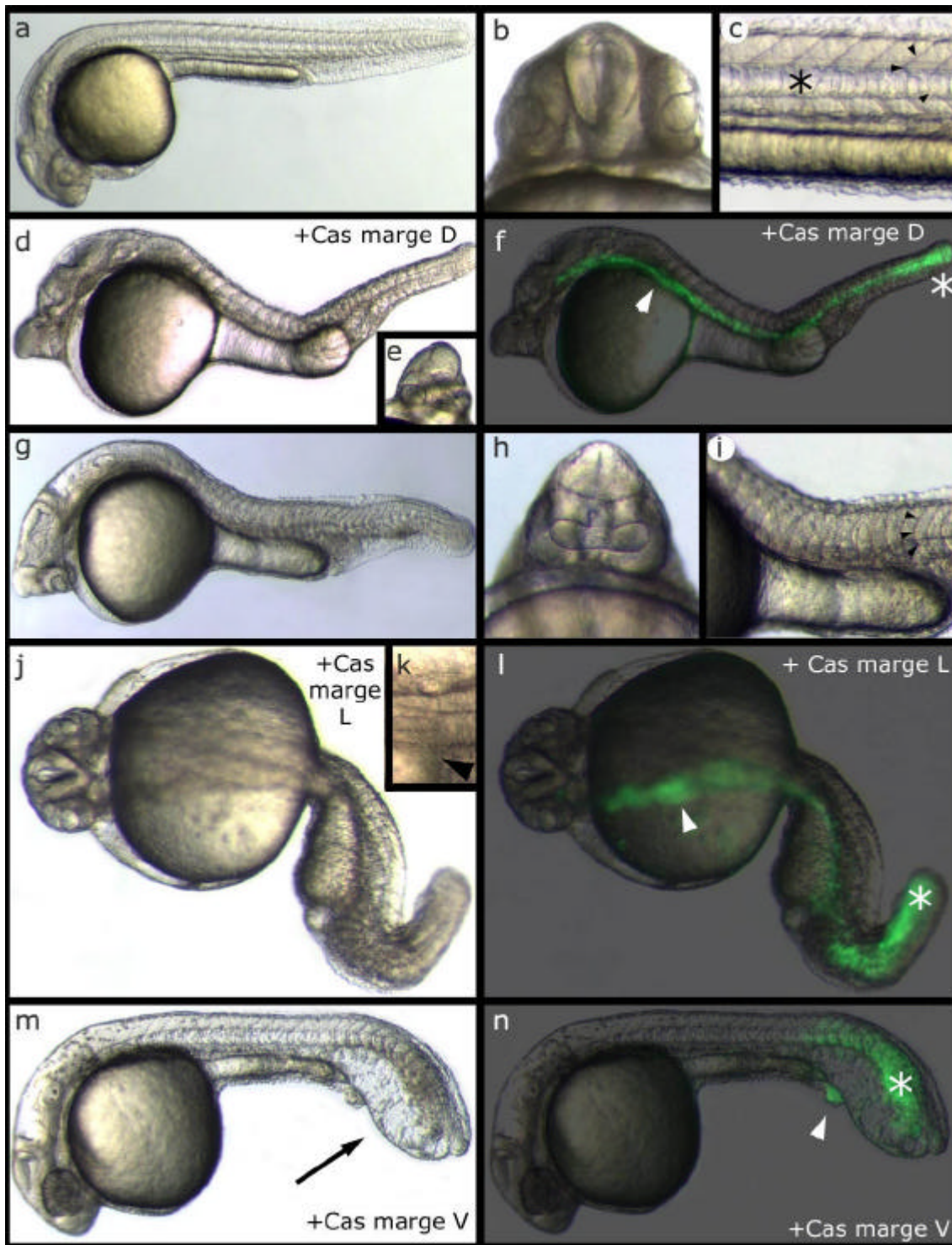
#### **II.3.a.2 Les embryons sont cyclopiques**

Lorsque le clone sur-exprimant Cas est dorsal, les embryons ont un axe embryonnaire raccourci et présentent une cyclopie (41,5%, n=106; Fig.15d-h). Une telle anomalie est toujours observée lorsque les structures axiales antérieures (plaque préchordale et partie ventrale du tube neural antérieur) sont absentes. Dans ces embryons, le territoire optique, situé au pôle animal n'est plus séparé en deux comme chez le sauvage par le mouvement du diencéphale ventral. Ainsi les deux yeux restent fusionnés et conduisent à une cyclopie (Thisse *et al*, 1994). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'expression de différents marqueurs de plaque préchordale. L'injection en marge dorsale de l'ARNm codant pour Cas bloque l'expression de *gsc* (Fig.16a,b), de *hggI* (Fig.16e,f,m,o), et celle de *frzbl* (Fig.16i,j).

*Ainsi la sur-expression de Cas à la marge dorsale inhibe la formation de la plaque préchordale.*

#### **II.3.a.3 Les embryons ont des somites en forme de « U »**

64,1% des embryons possèdent des somites en forme de « U » (n=106). Ce phénotype est dû à l'absence de certaines cellules musculaires à contraction lente qui, dans un embryon sauvage, se différencient à l'extérieur des muscles et donnent la forme caractéristique en chevrons (Stickney *et al*, 2000). La présence de ces cellules est liée à la présence des structures axiales. En effet, les précurseurs de ces muscles (les cellules adaxiales) proviennent des cellules marginales dorsales para-axiales qui expriment *myoD* au cours de la gastrulation. La sur-expression de Cas bloque la formation de ces cellules (Fig.16c,d).



**II-Figure 15: Effet à 24h de la sur-expression de Cas dans les cellules marginales.**

La sur-expression de Cas dans les cellules de la marge dorsale bloque la formation de la notochorde (a,d,c,g,i, étoile en c) et la séparation des yeux (b,e,h). Les somites adoptent une forme en "U" (triangle en c,i). Les cellules filles du blastomère injecté adoptent une position endodermale (triangle en f) sauf postérieurement où elles sont concentrées au niveau des somites (étoile en f). Les embryons sur-exprimant Cas dans les cellules de la marge latérale ont un axe « tordu » (j) avec, parfois, une absence de vésicule otique du côté de la torsion (k, triangle). Les cellules filles du blastomère injecté se différencient et adoptent une position endodermale asymétrique (triangle en l) sauf postérieurement où elles sont concentrées au niveau des somites (étoile en l). La sur-expression en marge ventrale de Cas dilate le mésenchyme ventral (a et flèche en m). Les cellules injectées par l'ARNm codant par Cas se différencient en endoderme postérieur (triangle en n) et adoptent la position observée pour les autres clones dans les somites (étoile en n). Stades et orientations: Tous les embryons ont été photographiés à 30hpf et sont en vue latérale sauf j-l en vue dorsale et b,e,h en vue frontale. Pour les vues frontales, le dos est en haut et dans tous les autres cas le côté antérieur est à gauche. A-c: embryons sauvages; d-i: sur-expression à la marge dorsale; j-l=sur-expression en marge latérale; m-n: sur-expression en marge ventrale

#### **II.3.a.4 Les territoires issus de la marge dorsale sont absents**

En plus des effets décrits, les embryons à 24h présentent des interruptions ou une absence de notochorde et de plaque du plancher du tube neural (Fig.15g,i). Cela est confirmé par hybridation *in situ* avec le marqueur *shh* qui s'exprime dans ces deux territoires. En effet, dans les embryons injectés, l'expression de *shh* est fortement perturbée dès le début de somitogenèse (Fig.16g,h,n,p). De manière surprenante, le territoire d'expression de *shh* n'est que faiblement affecté en début de gastrulation (non montré), suggérant que la sur-expression de *cas* n'inhibe pas directement l'expression de *shh*, mais ne la maintient pas.

*Ainsi la sur-expression de Cas dans les blastomères de la marge dorsale bloque le programme de différenciation de tous les tissus axiaux (notochorde, plaque préchorale, plaque du plancher, cellules adaxiales).*

#### **II.3.b Clones latéraux**

##### **II.3.b.1 Les cellules colonisent l'endoderme**

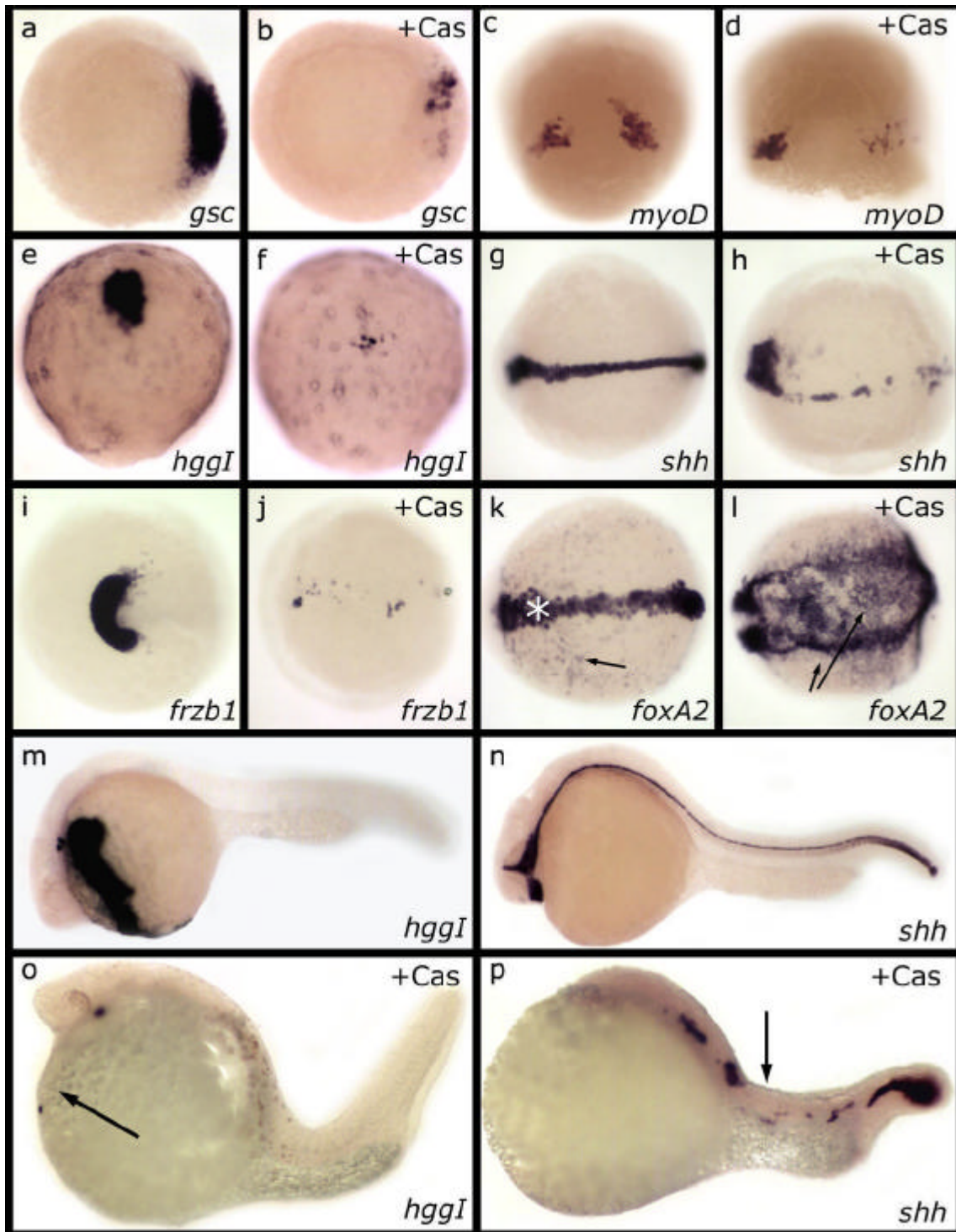
Comme pour les clones dorsaux, les cellules filles du blastomère injecté avec l'ARNm codant pour Casanova adoptent une localisation de type endoderme. Cependant, la partie la plus antérieure n'est pas colonisée par ces cellules (non montré). La même accumulation de cellules postérieurement est observée.

##### **II.3.b.2 Défauts de musculature**

La sur-expression de Casanova à la marge ventrale déforme fortement les embryons car ils présentent tous une déformation latérale. La fluorescence, localisée préférentiellement d'un côté de l'embryon, co-localise avec le sens de courbure (Fig.15j,l). A ce niveau, les embryons ont des malformations très sévères des somites. La courbure observée est donc explicable par cette absence de mésoderme para-axial d'un côté de l'embryon.

Cette absence de somites d'un seul côté des embryons est confirmée par hybridation *in situ* en début de somitogenèse par le marqueur CB611 et à 24h par l'expression de *myoD* (Fig.17a,b,e,f). Sur la carte des territoires présomptifs d'un embryon à 50% épibolie, le mésoderme para-axial, dont dérivent les somites, se différencie à partir des cellules de la marge latérale (Warga et Kimmel, 1990 et INTRO-Fig.10).

*Ainsi la sur-expression de Casanova dans les cellules inhibe la différenciation des cellules du mésoderme para-axial*



**II-Figure 16: Analyse de l'effet de la sur-expression de Cas en marge dorsale par hybridation *in situ*.**

La sur-expression de Cas en marge dorsale bloque le développement des cellules de la plaque préchordale (a,b,e,f,i,j), des cellules adaxiales (c,d) et axiales (g et h). En début de somitogénèse, *foxA2* s'exprime dans les cellules de l'axe (étoile en k) comme *shh* ainsi que dans les cellules de l'endoderme (flèche en k). La sur-expression de cas induit fortement le nombre de cellules de l'endoderme exprimant *foxA2* (flèche en l) alors que les cellules axiales ne sont plus visualisables. A 24hpf la sur-expression de Cas inhibe le développement de la glande d'éclosion (m et o, flèche), de la notochorde et de la plaque basale du tube neural (n et p). Stades: (a,b), milieu de gastrulation (c,d), fin de gastrulation (e,f), début de somitogénèse (g-l) et un jour de développement (m-p). Orientations: Les photos ont été prises en vue animale côté dorsal à droite en a et b; en vue dorsale pôle animal vers le haut en c-f; en vue dorsal antérieur vers la gauche en g,h,k et l; en vue antérieure côté dorsal à droite en i et j; en vue latérale côté antérieur à gauche en m-p.

### **II.3.b.3 Absence d'oreille**

Dans certains cas, Casanova peut aussi affecter la différenciation de territoires ectodermiques. En effet, à 24h la vésicule otique peut être absente ou réduite du côté injecté (Fig.15l,k; Fig.17e,f,i-k). La placode otique se développe à l'interface entre le rhombencéphale et l'épiderme présomptifs (Woo et Fraser, 1995). Cependant, le rhombencéphale marqué par Krox20 (marquant les rhombomères 3 et 5) ne présente pas de malformation évidente du côté injecté (Fig.17i-k). Nous n'avons pas exploré plus en détail ces phénotypes.

Deux hypothèses sont envisageables:

- (1) Les cellules issues du clone injecté n'étaient pas restreintes exclusivement à la marge et se trouvaient aussi dans l'ectoderme, ce qui a affecté le développement du rhombencéphale (non visible) et de la vésicule otique. Cependant, les injections de Cas dans l'ectoderme (au pôle animal ou à 45°) ne montrent pas d'effets particuliers sur ce feuillet embryonnaire.
- (2) Les effets observés sur l'ectoderme sont une conséquence secondaire de la perte des cellules du mésoderme paraxial, ces dernières pouvant jouer un rôle inductif ou de maintien. Cependant, dans des embryons complètement dépourvus d'endoderme et de mésoderme para-axial, la placode otique se forme correctement (Feldman *et al*, 1999 ; Gristman *et al*, 1999 ; Thisse *et al*, 2000)

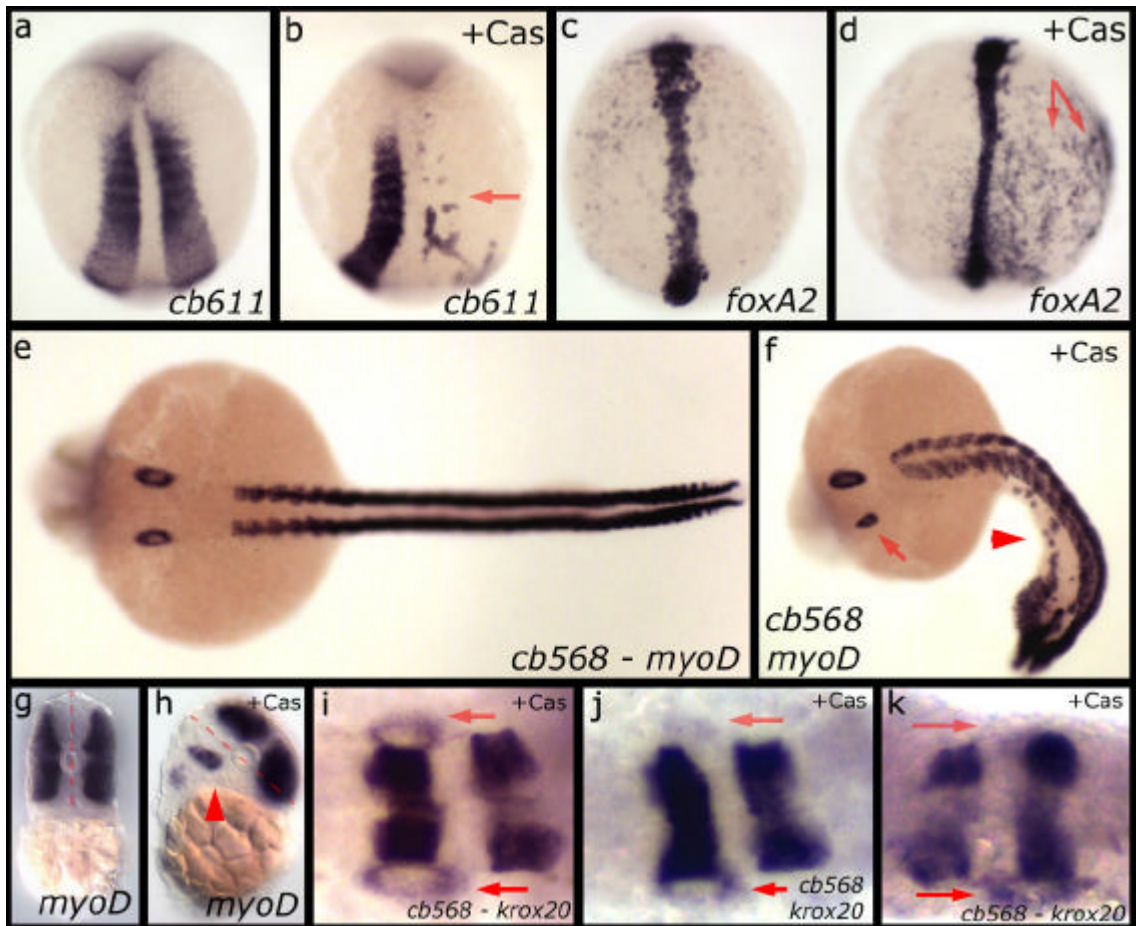
En l'absence de données supplémentaires, nous ne pouvons conclure sur ce point.

### **II.3.c Clones ventraux**

#### **II.3.c.1 Les cellules migrent postérieurement**

Conformément aux mouvements cellulaires au cours de la gastrulation, les cellules injectées en marge ventrale participent à la formation des régions postérieures de l'embryon telles que le mésenchyme ventral ou le proctodeum (Fig.15m,n). Cependant, la majorité des cellules du clone se retrouvent au niveau des somites. L'anus, la partie la plus postérieure de l'endoderme, est aussi positif pour la GFP.





**II-Figure 17: Analyse de l'effet de la sur-expression de Cas en marge latérale par hybridation *in situ*.**

La sur-expression de Cas en marge latérale bloque la différenciation du mésoderme para-axial du côté injecté (a et flèche en b) et augmente le nombre de cellules de l'endoderme qui exprime *foxA2* (c et flèche en d). A 24h, le développement des somites est altéré du côté sur-exprimant Cas (e-h, triangle en f et h) et peut entraîner la disparition de la vésicule otique (flèche en f,i-k). L'axe en pointillé en g et h indique l'axe tube neural - notochorde qui a basculé après sur-expression de Cas. Stades et orientations: Les embryons en a-d sont en début de somitogenèse en vue dorsale, côté antérieur vers le haut. Tous les autres embryons sont à 24hpf en vue dorsale, côté antérieur à gauche, sauf g et h qui sont des coupes transversales au niveau du tronc, côté dorsal vers le haut.

### **II.3.c.2 Les embryons sont dépourvus de sang**

A un jour de développement, la queue des embryons est dilatée au niveau du mésenchyme ventral, zone de la différenciation hématopoïétique initiale (Fig.15m). De plus, très peu de cellules sanguines circulantes sont observées à 2 jours de développement.

Conformément à ces observations, les gènes *draculin* et *anydrase carbonique*, exprimés dans le territoire sanguin en début de somitogenèse et à 24h, respectivement, sont fortement réduits voire absents (Fig.18a,b,e-h). Comme pour *shh*, l'expression de *drac* n'est pas affectée en début de gastrula par la sur-expression de Casanova, indiquant que Cas n'inhibe pas directement l'expression de ce gène (non montré).

Or, la carte des territoires présomptifs indique que le territoire sanguin se forme à partir des cellules les plus ventrales de l'embryon à 50% épibolie (Warga et Kimmel, 1990, voir INTRO-Fig.10). *Ainsi la sur-expression en marge ventrale de Casanova bloque la différenciation du territoire sanguin.*

### **II.3.d Les cellules sur-exprimant Cas se différencient en endoderme**

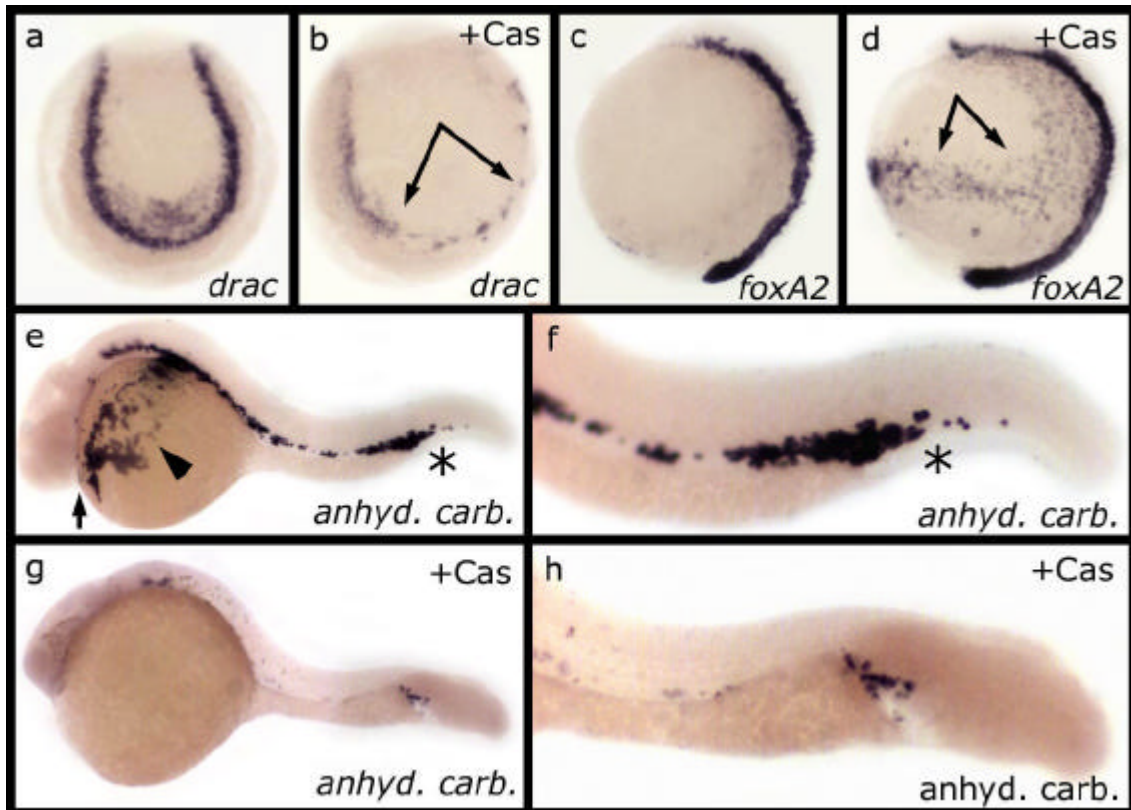
Dans chaque situation, les cellules injectées par l'ARNm codant pour Cas expriment fortement *sox17* en début de gastrulation (Fig.14) et *foxA2* en début de somitogenèse (Fig.16k,l;17c,d; 18c,d). De plus, les cellules issues du clone injecté adoptent une position endodermale à 24h (Fig.15f,ln).

*Ainsi la sur-expression de Casanova à la marge conduit les cellules vers un devenir endodermal et bloque la formation du mésoderme. Nous pouvons donc conclure que la sur-expression de Casanova est suffisante pour changer le destin cellulaire des cellules du mésoderme en réalisant une « trans-détermination » du mésoderme en endoderme.*

### **II.3.e Activité de Cas en l'absence des Nodal**

Nous avons observé que Casanova pouvait activer l'expression de *sox17* en l'absence de toute activité Nodal (dans des embryons sur-exprimant Antivin1 ou dans des mutants *MZoep*), confirmant la position de Casanova en aval des Nodals. Afin de tester si les cellules de la marge dans des embryons déficients pour Nodal peuvent répondre de manière identique à Casanova, nous avons injecté l'ARNm (50pg) codant pour Casanova au stade 16-cellules dans des embryons sur-exprimant Antivin1 (200pg d'ARNm).

Avec la dose d'Antivin1 (200pg d'ARNm) utilisée, les embryons sont dépourvus d'endoderme, de mésoderme, ainsi que de système nerveux postérieur (Fig.19g,i). Dans ce contexte, la sur-expression marginale de Cas n'induit aucune malformation supplémentaire, et



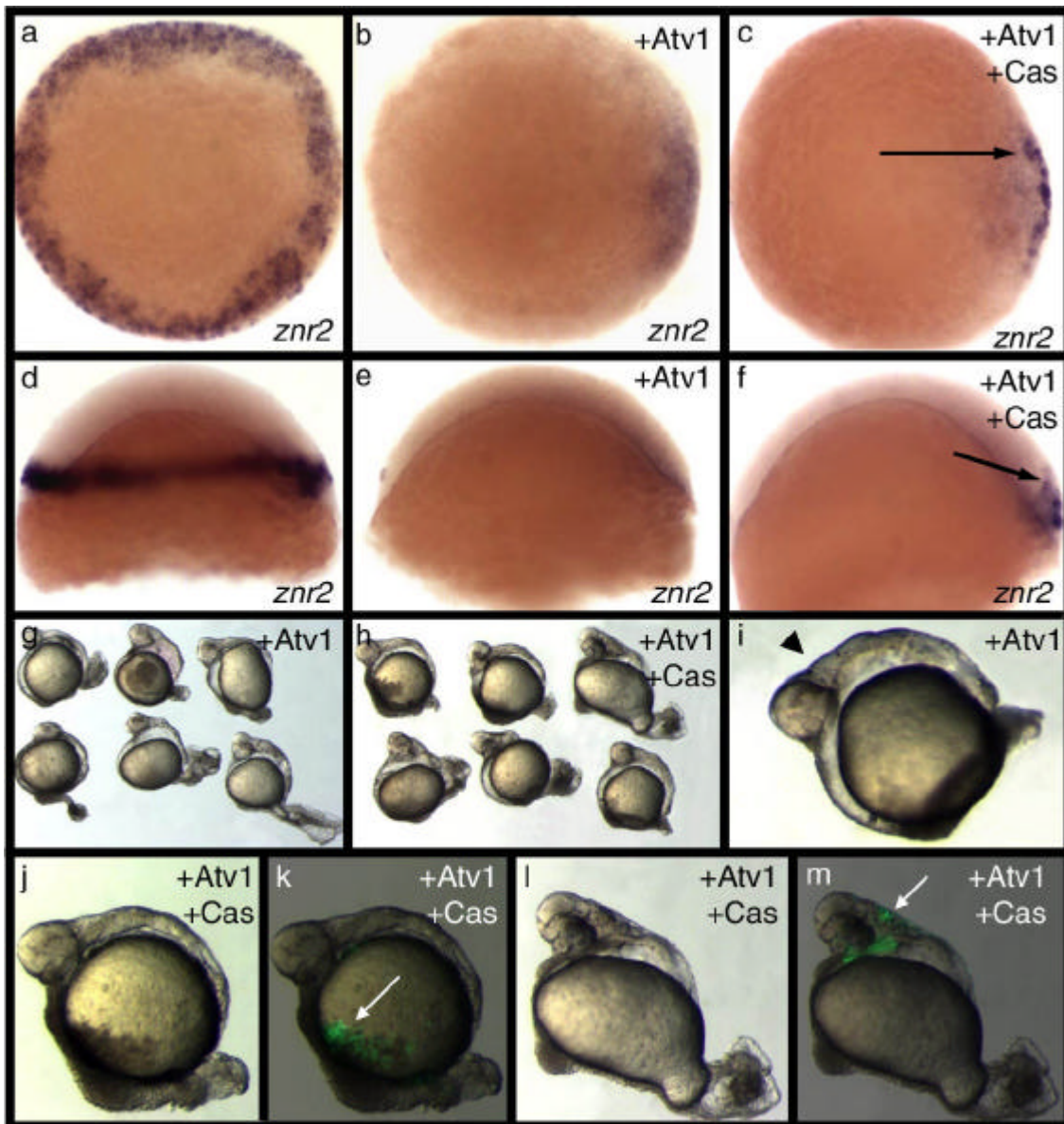
**II-Figure 18: Analyse de l'effet de la sur-expression de Cas en marge ventrale par hybridation *in situ*.**

La sur-expression de Cas en marge ventrale diminue le nombre de cellules précurseurs du sang (a et flèche en b) et augmente le nombre de cellules de l'endoderme exprimant *foxA2* (c et flèche en d). A 30hpf, les cellules sanguines circulent entre le cœur (flèche en e) et le mésenchyme ventrale (étoile en e) en passant sur le vitellus (triangle en e). La sur-expression de Cas bloque presque totalement la différenciation des cellules du sang (g,h).  
Stades: Les embryons en a-d sont en début de somitogenèse et en e-h à 30hpf.  
Orientations: Les embryons en a et b sont en vue postérieure, côté dorsale vers le haut. Tous les autres sont en vue latérale côté antérieur vers le haut pour c et d, et vers la gauche pour e-h.

les embryons ne sont pas distinguables des contrôles sur-exprimant *Atv1* seul (Fig.19h,j,l). De plus, les cellules dérivant du clone injecté à 16 cellules adoptent une position incompatible avec une différenciation en endoderme (système nerveux ou masse de cellules indifférenciées postérieures) (Fig.19k,m).

Par ailleurs, dans ces embryons déficients, l'expression de *sqt* n'est induite que dans les cellules de la couche enveloppante. Aucune expression dans l'embryon n'est observée (Fig.19a-f). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus après sur-expression de *Cas* au pôle animal (Fig.13).

*Ainsi, même si Cas peut induire sox17 dans des embryons déficients pour la voie Nodal, il ne peut conduire des cellules vers un devenir endodermique en l'absence des Nodal. Cette observation suggère que la régulation entre Cas et les facteurs Nodal est requise pour une différenciation endodermale complète.*



**II-Figure 19: Cas ne peut accomplir un programme de différenciation endodermale complet en l'absence de signalisation Nodal.**

En l'absence de signalisation Nodal, l'expression de *sqt/znr2* est abolie dans toutes les cellules de la marge (a,b,d,e). La sur-expression de Cas à la marge d'embryons déficients pour la signalisation Nodal n'induit pas l'expression de *sqt/znr2* dans l'embryon (c,f). Uniquement quelques cellules extra-embryonnaires de la couche enveloppante expriment *sqt/znr2* (flèche en c et f). A 30hpf, la perte de fonction de la voie Nodal abolit complètement la formation de l'endoderme et du mésoderme et les embryons ne forment que la partie antérieure du système nerveux (g et triangle en i). La sur-expression de Cas à la marge d'embryons déficients pour la voie Nodal n'induit pas de phénotype supplémentaire (h,j,l) et les cellules dérivant du blastomère injecté sont retrouvées dans une région de mésenchyme indifférencié (flèche en k) ou dans le cerveau (flèche en m). Stades: Les embryons en a-f ont été photographiés en fin de stade blastula (40% epibolie) et en g-m à 30hpf. Orientations: Tous les embryons sont en vue latérale sauf en a-c en vue animale. En g-m les embryons sont tous orientés côté antérieur vers la gauche.

## III. Discussion

### III.1 Casanova, effecteur de la voie Nodal pour la différenciation de l'endoderme

#### III.1.a Identification de Casanova

Nous avons montré que le gène muté dans la souche *casanova* codait pour un facteur de transcription à domaine HMG de la famille Sox. Casanova appartient au groupe F de la famille des Sox, et code pour un nouveau membre de ce groupe. Deux études publiées en parallèle sont arrivées au même résultat (Dickmeis *et al*, 2001, Sakaguchi *et al*, 2001).

La mutation dans la souche *cas<sup>ta56</sup>* produit une protéine tronquée dans sa partie C-terminale, avec un domaine HMG fonctionnel. La partie carboxy-terminale des protéines Sox est impliquée dans l'activité transcriptionnelle de la protéine (activateur ou répresseur) (Kamachi *et al*, 2000). Ainsi la protéine défectueuse ne peut que se fixer à l'ADN sans recruter de co-facteur. Cette forme mutante de *cas* ne semble pas être une forme dominante négative car les embryons hétérozygotes *cas<sup>ta56</sup>/+* sont identiques aux embryons sauvages.

Dans la souche *cas<sup>s4</sup>*, la mutation induit le changement d'un acide aminé essentiel pour l'activité du domaine HMG. Cependant le phénotype de cette souche est moins fort que pour la souche *cas<sup>ta56</sup>* suggérant que la protéine mutée possède une activité résiduelle.

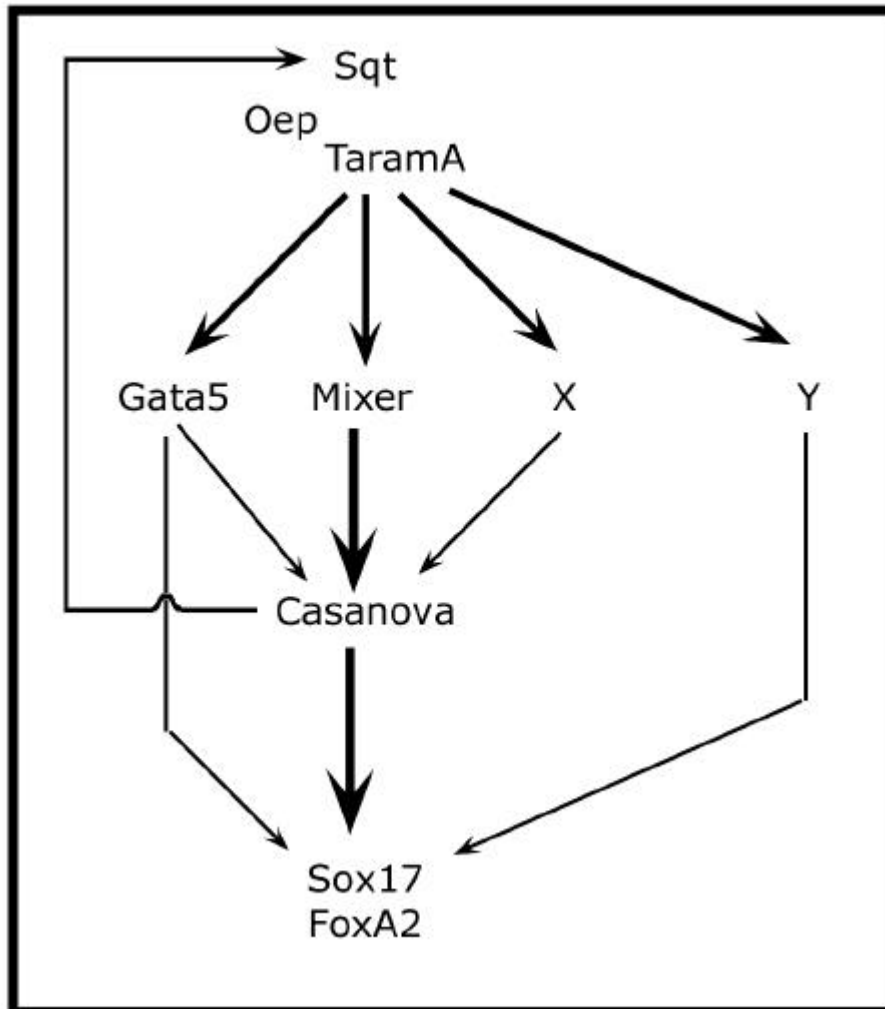
#### III.1.b Casanova, Mixer et Gata5

##### III.1.b.1 Casanova agit en aval de *bon* et *fau*

Les expériences d'épistasie que nous avons réalisées confirment que Casanova agit en aval des facteurs Nodal (Fig.9 et 20) ainsi qu'en aval de Bon/Mixer et Fau/Gata5 (Fig.10 et 20).

Cependant, les rôles de Mixer et Gata5 pour la régulation de *cas* et *sox17* ne sont pas équivalents. En effet, dans les mutants *bon*<sup>-/-</sup>, les expressions de *sox17* et *cas* sont fortement réduites (Fig.10; Kikuchi *et al*, 2000; Aoki *et al*, 2002). De plus, la sur-expression de Mixer dans des mutants *cas* n'induit aucune cellule positive pour *sox17* (Alexander et Stainier, 1999). Ainsi les expressions de *cas* et *sox17* sont fortement dépendantes de l'activité de Mixer, et la régulation de l'expression de *sox17* par Mixer passe entièrement par *casanova*.

Dans les mutants *fau*<sup>-/-</sup>, l'expression de *sox17* et *cas* n'est que partiellement réduite (Fig.10; Reiter *et al*, 2001, Aoki *et al*, 2002). De plus la sur-expression de Gata5 dans des mutants *cas* peut induire, dans quelques cas, l'expression de *sox17* (Reiter *et al*, 2001). Ainsi, les



**II-Figure 20: Casanova et la voie de signalisation de l'endoderme**

Les facteurs Nodal induisent l'expression de gata5/fau, mixer/bon et du facteur X qui régulent l'expression de sox17 par l'intermédiaire de Cas. Casanova est impliquée dans une boucle d'autorégulation avec les facteurs Nodal. Il existe un facteur Y dépendant de l'activité Nodal qui permet à Casanova d'accomplir un programme de différenciation de l'endoderme complet.

expressions de *cas* et *sox17* ne sont que partiellement dépendantes de l'activité de Gata5, et la régulation de l'expression de *sox17* par Gata5 ne passe pas entièrement par *casanova*.

Par des expériences de sur-expression, nous avons vérifié que Mixer et Gata5 agissaient en amont de *cas* (Fig.10). Cependant la comparaison des embryons sur-exprimant Mixer ou Bon indique que la régulation de *cas* par Mixer est plus efficace que par Gata5, confirmant le rôle moins essentiel de Gata5 pour l'induction de *cas* et des gènes de l'endoderme (Aoki *et al*, 2002).

### **III.1.b.2 Existence d'un co-facteur requis pour l'induction de *casanova***






Nous avons observé que la sur-expression de Mixer et Gata5 augmentait le nombre de cellules exprimant *casanova* uniquement à la marge (Fig.10 et Aoki *et al*, 2002). L'absence d'induction ectopique dans les cellules de l'ectoderme suggère l'absence d'un facteur marginal essentiel pour l'induction de *cas*. De même, la sur-expression de Mixer et Gata5 en l'absence d'activité Nodal (embryons *MZoep*) n'induit que très faiblement l'expression de *casanova* (Aoki *et al*, 2002).

Il existe donc un troisième facteur marginal d'origine inconnue (nommé X en Fig.20), dépendant de Nodal, requis pour l'induction de *casanova* (Fig.20).

### **III.1.c Casanova ne régule pas sa propre expression**

Dans le mutant *casanova*, nous avons observé que l'expression de *cas* est initiée mais non maintenue dans les cellules de l'endoderme (Fig.10). Cette absence de cellules positives pour *cas* peut être expliquée de deux manières. Soit les cellules ont subi une mort cellulaire et l'absence d'expression de *cas* est dû exclusivement à une absence de cellules de l'endoderme, soit les cellules sont toujours vivantes mais l'identité endodermale n'a pas été maintenue et elles ont été changées en mésoderme. Cette seconde hypothèse semble être la bonne car il a été montré directement que les cellules de la marge déficientes dans un embryon mutant pour *casanova* ne meurent pas et sont transformées en cellules du mésoderme (Dickmeis *et al*, 2001). Pour expliquer cela, il a été proposé que Casanova réprime l'expression de gènes spécifiques du mésoderme, et par conséquent, en son absence, ces derniers sont activés (Aoki *et al*, 2002).



STADE D'INJECTION					
	4 cellules	Sphère	50% ep.	Shield	75%
ENDODERME	+++	+/-	+/-	-	-
MESODERME	+++	+++	++	-	-

**II-Figure 21: Protocole expérimental utilisé par Aoki *et al*, 2002**

L'injection de la protéine CRIPTO dans l'espace extracellulaire d'embryon *MZoop* permet de récupérer la formation de l'endoderme efficacement qu'au stade 4 cellules. Après le stade Sphère, le sauvetage des embryons est peu efficace. Par contre, une injection de CRIPTO jusqu'en début de gastrulation (Shield) permet de restaurer la formation du mésoderme.

### III.1.d Casanova et les Nodal

#### III.1.d.1 Casanova active la transcription des Nodal

Nous avons montré que la sur-expression de Casanova induisait fortement l'expression des Nodal dans les territoires mésendodermiques de l'embryon, formant ainsi une boucle rétroactive positive (Fig.11). Nous pouvons supposer que ce rétrocontrôle maintient un niveau de signalisation Nodal fort dans les cellules de l'endoderme.

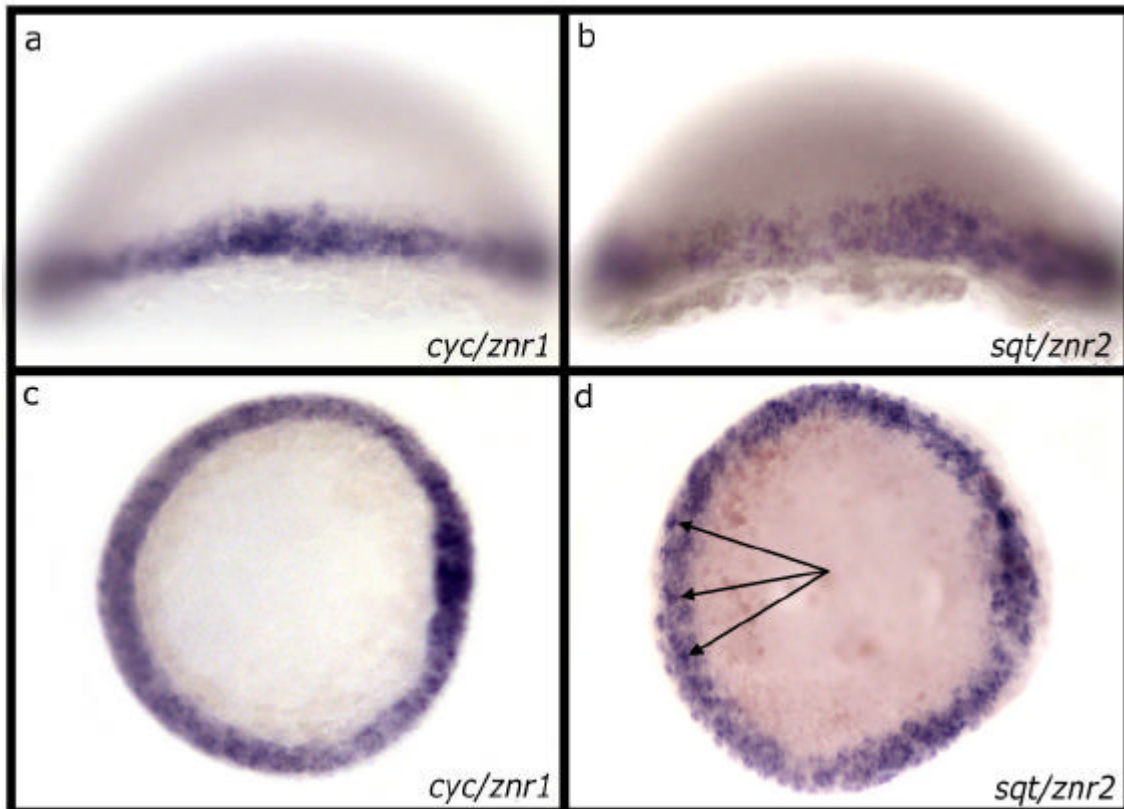
Cette hypothèse est renforcée par les résultats obtenus par l'équipe de F. Rosa en utilisant des mutants *MZoep*. En effet, dans ces souches mutantes, complètement dépourvues d'endoderme et de mésoderme, il est possible d'injecter le co-récepteur de Nodal CRIPTO sous forme de protéine dans l'espace extra-cellulaire pour sauver ce phénotype (Minchiotti *et al*, 2001) . Lorsque CRIPTO est injecté entre les stades 2cellules et Sphère, les embryons récupèrent la totalité de l'endoderme et du mésoderme. Plus cette injection se fait tard, plus le sauvetage de l'endoderme est faible, alors que la formation du mésoderme est complètement restaurée. L'injection de CRIPTO après le début de la gastrulation ne produit aucun effet (Fig.21). Ainsi les auteurs concluent que seul un signal Nodal transitoire est requis pour la formation du mésoderme alors que l'endoderme nécessite une signalisation continue entre les stades Sphère et 50% épibolie (Aoki *et al*, 2002). Cette observation pourrait être expliquée par la boucle de rétroaction entre Cas et Nodal présente dans les cellules de l'endoderme.

#### III.1.d.2 Différences entre *cyclops* et *squint*

Nous avons observé plusieurs différences entre les activités de *sqt/znr2* et *cyc/znr1* lors des expériences de sur-expression que nous avons réalisées. Alors que la sur-expression de Sqt induit fortement *casanova* dans toutes les cellules de l'embryon, la sur-expression de Cyc n'augmente le nombre de cellules positives pour *cas* qu'à la marge (Fig.9). Cette différence paraît étonnante car par sur-expression les deux ligands sont censés activer les mêmes récepteurs et donc induire les mêmes gènes cibles. Ce résultat suggère que pour l'induction de *casanova*, Cyclops et Squint n'utilisent pas la même signalisation.

Par ailleurs, la sur-expression de Cas induit fortement *sqt* à la marge et très faiblement *cyc* (Fig.11). Ni *sqt* ni *cyc* ne sont induits dans les cellules de l'ectoderme. Cependant, dans les cellules de la couche enveloppante, Cas peut induire *sqt*, mais pas *cyc*. Ainsi *sqt* semble être étroitement lié à *casanova* pour l'induction de l'endoderme.

Cette hypothèse est soutenue par deux observations complémentaires. A 50% épibolie, alors que *cyc* est exprimé de manière homogène tout autour de la marge dans les cellules du



**II-Figure 22: Certaines cellules de la marge expriment les Nodal plus fortement.**

L'observation du patron d'expression de *cyc/znr1* et *sqt/znr2* indique que les cellules de la marge n'expriment pas ces gènes de la même manière. Certaines cellules expriment ces gènes plus fortement. Cela est plus facilement remarquable pour *sqt/znr2* (flèches en d). Stades et orientations: Tous les embryons sont en fin de stade blastula. a et b sont des vues latérales, pôle animal vers le haut et c et d sont des vues animales.

mésendoderme, le patron d'expression de *sqt* apparaît irrégulier (Fig.22b,d). Certaines cellules accumulent plus de transcrits de ce gène, suggérant un niveau d'expression de *sqt* plus fort dans ces cellules. On peut supposer que ces blastomères, constituant les précurseurs de l'endoderme, possèdent une forte signalisation Nodal, en partie due à un rétrocontrôle positif de Cas. Les gènes cibles de Nodal *bik* et *atv* ont aussi le même patron d'expression irrégulier, indiquant une signalisation Nodal non homogène autour de la marge (Vogel et Gerster, 1999). Le deuxième argument vient des mutants *sqt* et *cyc*. Chez les mutants génétiques de la voie Nodal (*sqt*, *cyc*, *MZoe*, *MZsur*), il existe une certaine variabilité phénotypique qui dépend du fond génétique dans lequel la mutation se trouve (Feldman *et al*, 1998; Rebagliati *et al*, 1998b; Gristman *et al*, 1999; Pogoda *et al*, 2000; Sirotkin *et al*, 2000). Le phénotype des mutants *cyclops* correspond à une réduction de la taille des yeux qui peut aller jusqu'à une cyclopia, ainsi qu'une perte partielle ou complète de la partie ventrale du tube neural. L'endoderme n'est jamais affecté. Chez les mutants *squint*, les individus présentant les phénotypes les plus forts sont dépourvus d'endoderme et possèdent les caractéristiques annexes de telles déficiences (*cardia bifida*, tube vitellin élargi; Fig.4). Chez les doubles mutants *sqt/cyc*, tous les embryons sont dépourvus d'endoderme indiquant que *cyclops* peut compenser partiellement la perte de *sqt* pour la formation de l'endoderme (Feldman *et al*, 1998). Pour l'induction de l'endoderme, *cyclops* jouerait donc un rôle redondant, essentiel en l'absence de *sqt*. Cette hypothèse a déjà été formulée par d'autres équipes (Feldman *et al*, 2002).

### **III.1.d.3 Existence d'un facteur Y, requis pour accomplir un programme de différenciation en endoderme complet**

Nous avons observé que dans des embryons dépourvus d'activité Nodal, Casanova perdait sa capacité à réguler la transcription des gènes *nodal*, ainsi que son aptitude à différencier complètement les cellules en endoderme (Fig.19 et Aoki *et al*, 2002). Nous avons fait la même observation dans les cellules de l'ectoderme (Fig.13).

Cela suggère l'existence d'un facteur Y présent uniquement à la marge et essentiel pour accomplir un programme de différenciation endodermal complet et pour activer la transcription des Nodal (Fig.20). Nous pouvons supposer que ce facteur est induit par l'activité même Nodal puisque l'injection au pôle animal de la forme activée du récepteur TaramA induit un programme endodermal complet (inductions géniques et comportements cellulaires) (Peyriéras *et al*, 1998).

## **III.2 Casanova effecteur de l'endoderme dans les cellules de la marge**

### **III.2.a *sox17*, gène cible de Cas?**

Nous avons observé que les patrons d'expression de *casanova* et de *sox17* se superposaient de manière parfaite dans les cellules de l'endoderme, sauf dans la partie extra-embryonnaire (YSL). De plus, l'expression de *cas* débute un peu avant celle de *sox17* et la sur-expression de Cas induit fortement l'expression de *sox17* quelque soit le contexte cellulaire, et même en l'absence de signalisation Nodal. Cette induction est autonome cellulaire (Kikuchi *et al*, 2000; Aoki *et al*, 2002). Par ailleurs, des sites de fixation de domaine HMG ont été trouvés en amont du gène *sox17* (Y. Kikuchi et D. Stainier, observations non publiées; Reim *et al*, 2004). Ces données suggèrent fortement que *sox17* est un gène cible direct de Cas.

### **III.2.b Les cellules marginales sur-exprimant Casanova se différencient en endoderme**

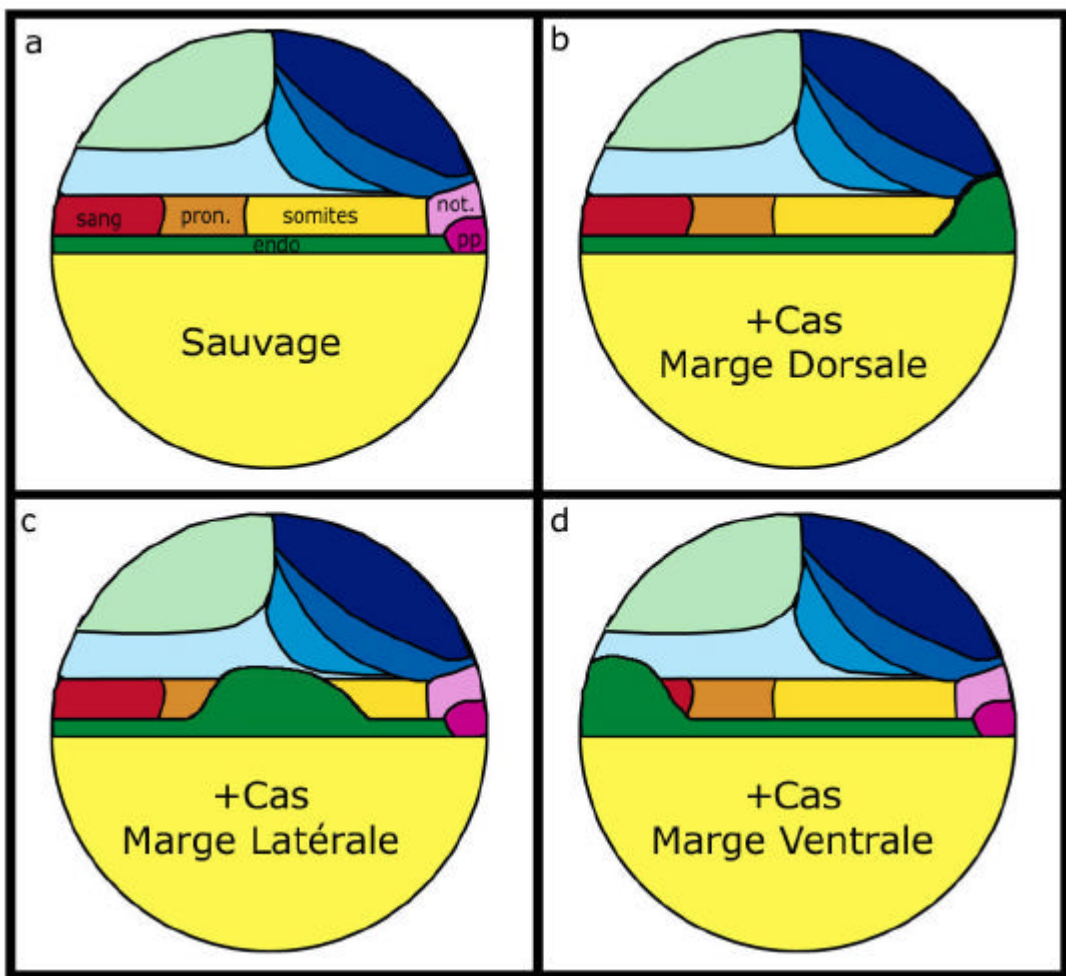
#### **III.2.b.1 Localisation des cellules issues du clone injecté**

Au cours de la gastrulation les cellules marginales subissent 4 mouvements distincts: l'épibolie, l'involution, la convergence dorsale et l'extension le long de l'axe animal-végétal (Warga et Kimmel, 1990). La capacité des cellules à effectuer ces mouvements diffère en fonction de leur position le long de l'axe dorso-ventral. En effet, les cellules dorsales formant l'axe, ont un fort mouvement d'extension et une convergence nulle. Les cellules latérales convergent fortement vers le côté dorsal, mais s'étendent modérément. Par contre, les cellules ventrales, qui forment les parties postérieures de l'embryon, ne subissent aucun mouvement d'extension ou de convergence (Myers *et al*, 2002b).

Dans nos expériences de sur-expressions marginales, l'injection de l'ARNm codant pour Casanova ne semble pas modifier les capacités de mouvement de ces cellules (Fig.15). En effet, les clones dorsaux se différencient tout le long de l'axe, consistant avec de forts mouvements d'extension. De même, les cellules injectées latéralement se différencient le long de l'axe mais ne colonisent pas la partie la plus antérieure de l'embryon, indiquant que l'extension selon l'axe antéro-postérieur n'est pas complète. Finalement, les cellules ventrales se situent dans la partie la plus postérieure de l'endoderme (absence d'extension et de convergence).

Ce résultat indique que la sur-expression de Casanova ne perturbe pas les mouvements cellulaires le long de l'axe D/V.

Dans tous les cas, nous avons observé que des cellules s'accumulaient en une région caudale située au niveau des somites postérieurs, principale région de migration des cellules injectées



**II-Figure 23: Cas peut induire une identité endodermale dans toutes les cellules de la marge.**

Cartes des territoires présomptifs d'embryons à 50% epibolie (a-d). La sur-expression de Cas en marge dorsale agrandit l'endoderme aux dépends du mésoderme axial. La sur-expression de Cas en marge latérale agrandit l'endoderme aux dépends du mésoderme para-axial. La sur-expression de Cas en marge ventral agrandit l'endoderme au dépend du territoire sanguin. Abréviations: pp: plaque préchordale; not.: notochorde; pron: pronephros; endo: endoderme.

en marge ventrale. Etant donné que la queue est dépourvue d'endoderme, nous pouvons supposer que l'expression ectopique dans les tissus postérieurs de gènes impliqués dans la différenciation de l'endoderme conduit les cellules vers une différenciation en mésoderme. cela reste toutefois à démontrer.

### **III.2.b.2 Casanova est suffisant pour la différenciation de l'endoderme et bloque la formation du mésoderme**

Par les expériences de sur-expression, nous avons montré que les cellules marginales injectées avec l'ARNm codant pour Casanova se différenciaient en endoderme (expressions géniques et localisation). De plus leur identité mésodermale est inhibée. Nous pouvons résumer les résultats de ces expériences sur des cartes de territoires présomptifs en fonction de leurs effets (Fig.23).

La sur-expression de Cas peut aussi bloquer l'expression de gènes à expression marginale tels que *ntl/bra* et *tbx6*. De plus, la sur-expression marginale de Ntl bloque l'expression de *cas*, laissant suggérer une régulation croisée entre ces deux facteurs de transcription (Aoki *et al*, 2002).

Dans un mutant *cas*<sup>-/-</sup>, les cellules les plus marginales au lieu de former de l'endoderme se différencient en mésoderme alors qu'aucune mort cellulaire n'est observable (Dickmeis *et al*, 2001). Ainsi en l'absence de Casanova les cellules endodermales changent d'identité.

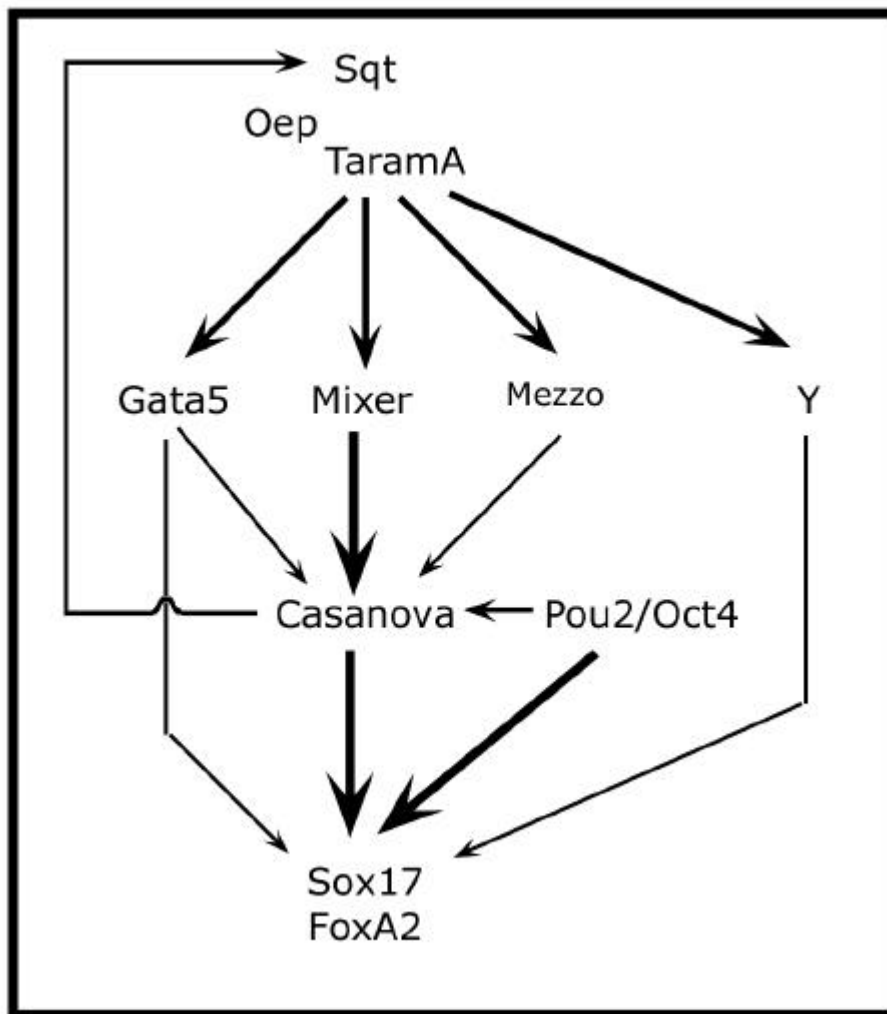
*Tous ces résultats montrent que casanova est essentiel et suffisant pour qu'une cellule marginale se différencie en endoderme.*

## **IV Quelques précisions...**

Cette partie présente plusieurs découvertes récentes qui précisent les mécanismes moléculaires contrôlant la formation de l'endoderme en aval des Nodal.

### **IV.1 Un candidat pour le facteur X?**

Lors d'un crible chez le poisson visant à identifier des facteurs de transcription à homéodomaine de type Paired, l'équipe de T. Lepage a isolé le gène *mezzo*, nouveau membre de la famille Mix (Poulain et Lepage, 2002).



**II-Figure 24: Contribution des facteurs Mezzo et Pou2/Oct4 au cours de la différenciation de l'endoderme**

Mezzo semble jouer le rôle du facteur X. Pou2/Oct4 est essentiel avec Cas pour l'expression de Sox17. Comme Pou2/Oct4 ne dépend pas de l'activité des Nodal, Pou2/Oct4 n'est pas le facteur Y.



#### **IV.1.a *mezzo* est impliqué dans le développement précoce de l'endoderme en parallèle de Gata5 et Mixer**

*mezzo* est exprimé précocement de manière similaire à Mixer. Comme *mixer* et *gata5*, *mezzo* est induit par les Nodal et se situe en amont de Casanova et de Sox17. Mixer et Gata5 sont requis pour maintenir son expression pendant l'embryogenèse.

Contrairement à Gata5 et Mixer, Mezzo est capable d'induire *casanova* et *sox17* dans toutes les cellules de l'embryon. De plus, sa capacité à induire *sox17* est abolie dans les mutants *cas*. Ainsi les auteurs proposent que Mezzo correspond au facteur X (Fig.20), se situant en aval des Nodal, agissant en parallèle de Gata5 et Mixer, et requit à la marge pour l'induction de *casanova* (Fig.24).

#### **IV.1.b Facteur en aval des Nodal requis pour la formation du mésendoderme**

A la marge, Mezzo agit comme Casanova en activant les gènes de l'endoderme et en réprimant ceux du mésoderme (ex: *ntl*). Cependant lorsque Mezzo est sur-exprimé au pôle animal, les cellules injectées expriment *ntl*. De plus, alors que l'injection d'un morpholino dirigé contre Mezzo ne donne aucun phénotype dans un contexte sauvage, dans des embryons *sqt*<sup>-/-</sup> ou *bon*<sup>-/-</sup>;*fau*<sup>-/-</sup>, la plaque préchordale est affectée, conduisant à des phénotypes de cyclopia. La plaque préchordale est, avec l'endoderme, le territoire induit par les plus fortes doses de Nodal.

Mezzo pourrait donc constituer un médiateur de la signalisation Nodal induit dans les territoires se situant le plus à la marge (plaque préchordale et endoderme).

### **IV.2 Le facteur de transcription Pou2**

En Janvier 2004, deux études publiées en même temps montrent l'implication du facteur de transcription Pou2/Oct4 pour l'induction précoce de l'endoderme (Lunde *et al*, 2004; Reim *et al*, 2004).

#### **IV.2.a Les mutants *MZspg***

Le gène *pou2/oct4* est muté dans la souche *spiel-ohne-grenzen* (*spg*), dont les individus sont dépourvus de la barrière mésencéphale - rhombencéphale (Schier *et al*, 1996; Belting *et al*, 2001; Burgess *et al*, 2002; Reim et Brand, 2002). Cependant, les ARNm de ce gène sont détectés dans l'ovocyte ainsi que pendant les premières étapes embryonnaires. Reim *et al* et Lunde *et al* ont décrit le phénotype des embryons dépourvus des composantes maternelles et zygotiques de Pou2 (*MZspg*). Ce mutant a de sévères défauts de développement et est

complètement dépourvus d'endoderme. L'analyse moléculaire montre que l'expression de *casanova* est initiée mais non maintenue. *sox17* n'est jamais détecté.

#### **IV.2.b Pou2 agit en parallèle de la signalisation Nodal**

Contrairement à tous les autres facteurs impliqués pour la formation de l'endoderme, Pou2/Oct4 n'est pas sous la dépendance des Nodal, mais l'activité pro-endodermale des Nodal dépend de Pou2/Oct4.

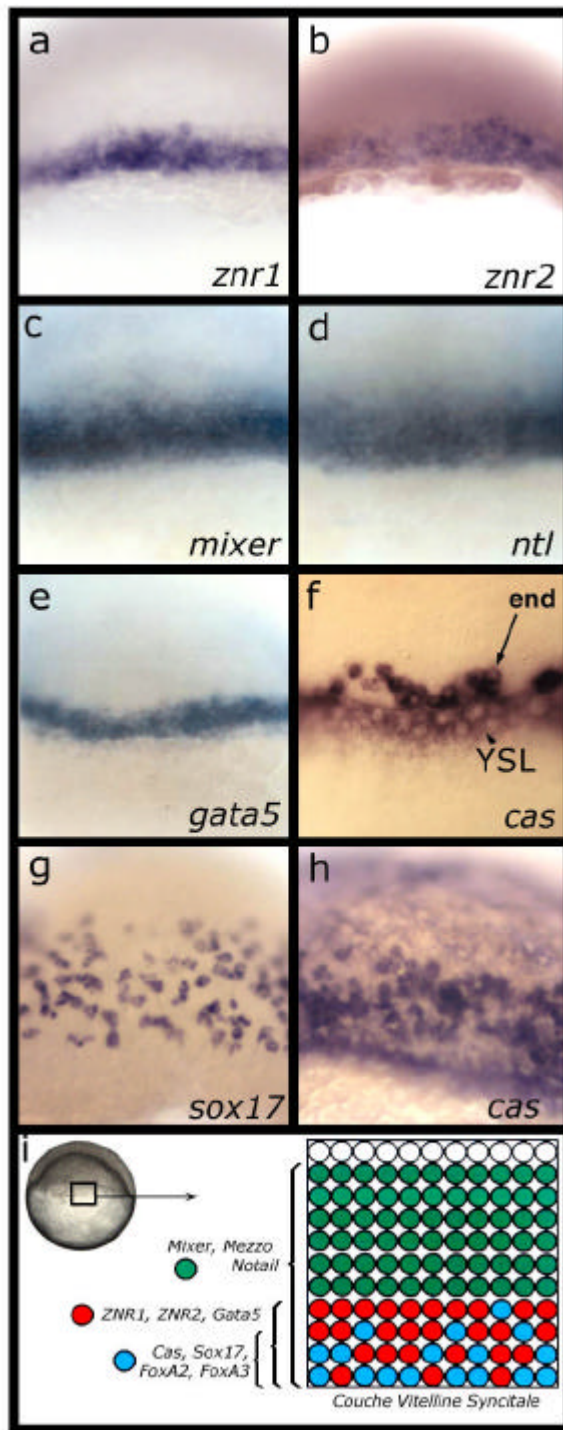
En effet, alors que la sur-expression de TaramA<sup>D</sup> induit fortement l'expression de *mezzo* dans des embryons *MZspg*, aucune cellule positive pour Sox17 n'est détectable dans ce contexte. De plus, l'expression de Pou2/Oct4 n'est pas affectée dans des embryons dépourvus d'activité Nodal.

#### **IV.2.c Pou2 et Cas agissent en parallèle pour la régulation de *sox17***

Les deux équipes ont montré que la sur-expression de Cas dans des mutants *MZspg* ne restaurait pas l'expression de *sox17* et inversement (sur-expression de Pou2 dans *cas*<sup>-/-</sup>), indiquant que Cas et Pou2 agissent en parallèle pour la régulation de *sox17*. Seule la co-injection des ARNm codant pour Cas et Pou2/Oct4 permet d'induire l'expression de *sox17* dans ces divers fonds génétiques.

Reim *et al* ont isolé une région régulatrice de *sox17* et montré que les deux facteurs Pou2/Oct4 et Cas agissent en synergie pour l'induction de l'expression de *sox17*. Les auteurs proposent que Pou2/Oct4 interagissent et régulent directement la transcription de *sox17*. Les interactions entre protéines Sox et Pou/Oct ont déjà été décrites notamment pour la régulation du gène *fgf4* chez la Souris, renforçant l'hypothèse proposée (Kamachi *et al*, 2000).

Pou2/Oct4 pourrait donc correspondre au facteur Y requis pour accomplir un programme endodermal complet. Cependant, à partir de nos résultats, nous avons postulé que le facteur Y dépendait de la signalisation Nodal. En conséquence, puisque *pou2/oct4* agit en parallèle des Nodal, il code pour un autre facteur que Y, requis pour la différenciation complète de l'endoderme (Fig.24).



## II-Figure 25: Régionalisation du mésendoderme

L'observation de l'expression des différents gènes impliqués dans la différenciation de l'endoderme indique que le mésendoderme en fin de stade blastula est composé de trois types de cellules. Les gènes *mixer/bon*, *notail/bra* et *mezzo* sont exprimés de manière homogène tout autour de la marge, à dizaine de diamètres cellulaires de la marge. Les gènes *cyc/znr1*, *sqt/znr2* et *gata5* sont exprimés tout autour de la marge de manière homogène à 4/5 diamètres cellulaires de la marge (a,b,e). Le gènes *cas* est exprimé dans quelques cellules à 3/4 diamètres cellulaires de la marge (f,i). En début de gastrulation (60% épibolie), les gènes *sox17*, *cas*, *foxA2* et *foxA3* s'expriment spécifiquement dans les cellules de l'endoderme (g-i). Stades et orientations: Les photos a-f sont des gros plan de la marge d'embryon en fin de stade blastula (50% epibolie). Les photos en g et h sont des gros plans de la marge d'embryon en début de gastrulation (60% epibolie).

## **IV.3 Ségrégation des cellules de l'endoderme et du mésoderme**

### **IV.3.a Régionalisation du mésendoderme**

L'observation détaillée de l'expression des différents gènes impliqués dans la détermination précoce de l'endoderme révèle l'existence de trois domaines cellulaires distincts au sein du mésendoderme (Fig.25).

Les gènes cibles de la voie Nodal *mixer* et *notail* sont exprimés dans tous les précurseurs du mésendoderme (8 à 10 diamètres cellulaires d'épaisseur). Le gène *gata5* n'est transcrit que dans une fraction de ces cellules (3 à 4 diamètres cellulaires). Les gènes *cas*, *sox17*, *foxA2* et *foxA3* sont spécifiques des cellules qui vont se différencier en endoderme au sein du mésendoderme (Fig.25c-h). De cette observation, on peut se demander comment les cellules de la couche cellulaire positive pour Gata5 adoptent une identité endodermale.

L'hypothèse la plus simple postule que les cellules les plus proches de la marge sont soumises à une forte signalisation Nodal et donc adoptent une identité endodermale. Cela ne peut cependant pas expliquer pourquoi des cellules situées à la marge (et donc à la même distance de la source de Nodal) se différencient en endoderme et d'autres en mésoderme (Fig.25i). On peut penser qu'un mécanisme faisant intervenir l'inhibition latérale Delta-Notch peut être requis pour cette individualisation. Cette hypothèse a été proposée par l'équipe de D. Stainier.

### **IV.3.b Endoderme et voie Notch**

Les gènes *notch1*, *deltaC* et *deltaD* sont exprimés précocement autour de la marge de manière comparable à *gata5*. Cette expression est dépendante de l'activité Nodal.

La sur-expression d'une forme constitutivement activée de Notch (domaine intracellulaire) réprime l'expression de gènes tels que *sox17* et *foxA2*, et active des gènes spécifiques du mésoderme. Cela suggère que les cellules dans lesquelles Notch est activé se différencient en mésoderme, alors que les cellules présentant le ligand Delta forment de l'endoderme (Kikuchi *et al*, 2004).

L'implication de la voie Notch au cours de la différenciation de l'endoderme a aussi été étudiée avec le gène *her5*, facteur de transcription en aval de Notch, qui est requis pour la formation de l'endoderme pharyngien (Bally-Cuif *et al*, 2000).

Des études complémentaires doivent être réalisées afin de confirmer et de préciser le rôle de cette signalisation pour la différenciation des blastomères en endoderme.

## **IV.4 Voie BMP et différenciation de l'endoderme**

### **IV.4.a Un rôle des BMP pour l'induction de l'endoderme?**

Chez le Xénope, plusieurs études ont montré que les BMP ont un rôle sur l'induction précoce de l'endoderme (Sasai et al, 1996). En effet, alors que la sur-expression précoce des BMP diminue le nombre de précurseurs de l'endoderme, l'inhibition de cette signalisation avec les antagonistes sécrétés Chordin et Noggin, étend le territoire de l'endoderme (Stainier, 2002).

Cependant dans l'embryon en fin de stade blastula, la marge ventrale est pratiquement dépourvue de précurseurs d'endoderme. En effet, les cellules de la marge ventrale forment les parties les plus postérieures de l'embryon, territoires dépourvus d'endoderme dans les embryons sauvages, car ils sont situés postérieurement à l'anus. Or la marge ventrale est le site de signalisation maximale des BMP. Ainsi la sur-expression des BMP élargit ce territoire et diminue la densité des précurseurs de l'endoderme, sans affecter l'induction de ces cellules par la voie Nodal. Les BMP ne semblent donc pas requis pour la formation précoce de l'endoderme en tant que feuillet embryonnaire, mais cette analyse doit être complétée.

### **IV.4.b Les BMP régionalisent l'endoderme**

Tiso *et al* ont montré que les BMP régionalisaient l'endoderme le long de l'axe dorso-ventral de la blastula, correspondant à la régionalisation antéro-postérieure à 24h (Fig.3; Warga et Nüsslein-Volhard, 1999; Tiso *et al*, 2002).

Ainsi, la signalisation BMP agit comme modificateur de l'endoderme plutôt qu'inducteur.

## **IV.5 Les gènes de spécification de l'endoderme sont conservés entre les invertébrés et les vertébrés.**

### **IV.5.a Conservation chez la Souris et le Poulet**

Les gènes décrits précédemment sont pour la plupart présents chez la souris et le poulet et exprimés dans les cellules endodermiques et possèdent un rôle pour leur différenciation. C'est le cas des gènes de la famille Mix, Sox, Gata et Forkhead (Stainier *et al*, 2002).

De même, l'implication de la signalisation Nodal pour la détermination précoce de ce feuillet a été montrée chez la souris, notamment dans les souches mutantes pour Nodal (Lowe *et al*, 2001).

En plus de la conservation des gènes du développement, certains mécanismes sont identiques. En particulier, les cellules de l'endoderme et du mésoderme sont étroitement liées au moment

des mouvements d'ingression par le sillon primitif. La différenciation de l'endoderme par rapport au mésoderme pourrait donc nécessiter des mécanismes de ségrégation similaires à ceux du poisson (implication éventuelle de la signalisation Notch-Delta).

#### **IV.5.b Conservation chez les invertébrés**

Chez le nématode, la mouche et l'oursin, des gènes des familles Gata et Forkhead sont aussi impliqués dans la différenciation précoce de l'endoderme (Stainier et al, 2002). Chez l'ascidie, les cellules précurseurs de l'endoderme expriment un gène codant pour un facteur de type Forkhead ainsi que l'homologue de Lefty, suggérant une implication de la voie Nodal.

Cependant chez tous ces organismes, la voie de signalisation Wnt semble requise pour l'initiation du programme endodermal, mécanisme non décrit chez les vertébrés. Il serait intéressant d'analyser si la signalisation des TGF $\beta$  joue un rôle pour la différenciation de l'endoderme chez les invertébrés et si la voie Wnt est requise pour la différenciation de ce feuillet chez les vertébrés (Stainier et al, 2002).

Seuls les gènes des familles Forkhead et Gata sont donc conservés entre les vertébrés et les invertébrés pour la formation de l'endoderme. Le contrôle de leur expression par la signalisation des TGF $\beta$  n'est pas retrouvé chez les invertébrés, et semble être une innovation spécifique des Chordés.

## **V. Conclusion**

Au cours de notre étude nous avons identifié Casanova, facteur nécessaire et suffisant pour le développement de l'endoderme. Casanova code pour un nouveau membre de la famille de facteur de transcription Sox. Sa position en aval des facteurs Gata5 et Mixer a été confirmée et nous avons postulé l'existence d'un facteur X requis pour la régulation de Casanova, identifié récemment (Mezzo). Casanova pourrait réguler directement l'expression du gène *sox17*. De plus, Casanova possède une activité régulatrice de l'expression des Nodal, pouvant jouer un rôle pour le maintien d'une signalisation Nodal forte dans les cellules de l'endoderme. Nous avons observé que l'activité de Casanova n'était complète que dans les cellules marginales, probablement grâce à la présence d'un facteur Y induit par les Nodal.

## **Sacrifice chez les Zombile** (Java)

- *Oui z'actuellement, nous avons peut-être la liaison avec*
- *Allô?*
- *Michel Kemp qui se trouve en Amazonie, au Brésil*
- *Allô?*
- *Allô, vous m'entendez Jean-Michel?*
- *Ah, putain, mais rien ne marche, merde!*
- *Il est aux fins fonds de la forêt avec la tribu des Zombile,*
- *Allô?*
- *mais nous avons quelques problèmes de liaison*
- *Oui, allô Patrick, oui je vous reçois très très mal. Oui, je suis z'actuellement avec la tribu des Zombile, donc, aux fins fonds de l'Amazonie, dans la région du Quanchantechos, et, ...et cette tribu, que nous avons rencontrée l'année dernière, nous sommes revenus pour la grande cérémonie sacrificielle.*
- Alors tous les membres de la tribu sont donc accoutrés de manière, euh,, de façon tout à fait étrange, avec beaucoup de plumes, et oui j'aperçois qu'ils sont autour d'une sorte d'autel et se préparent donc au sacrifice. Et là, ils sont en train de danser.... Ah, j'aurais pas dû parler si fort, ils m'apportent une sorte de décoction de couleur verdâtre, et ils me font signe de la boire.... ... ah, c'est, ... ah, c'est tout à fait, ... un goût... un goût tout à fait, euh, fort... Très typique. C'est à base de peillote. ... ah,... ...*
- ...*
- Ils sont en train de chanter dans leur ... dans un dialecte. Je crois reconnaître du Cachicouan ou une sorte de maiabandjiroum. C'est très étrange... oh, ah... ils se sont arrêtés de danser.... ils me regardent... Le chef de la tribu fait un signe en me montrant du doigt...*
- Ils s'approchent!.. Ils sont en train de faire une... une ronde autour de moi!... Ils chantent de plus en plus fort... Ils sont armés de coupe-coupes et lèvent leurs bars vers le ciel... Ils pointent leur coupe-coupe vers moi... ah, oh, oh, touchez pas au micro!! arrêtez!! Lâchez-moi!! ... il sont en train de m'attacher et me portent vers l'autel!! ... Ecoutez, je vous rends l'antenne, je vous rend tout de suite l'antenne!! ...arrêtez!! laissez-moi aahhh ....*
- Allô? Oui un petit problème de liaison, oui nous avons eu un petit problème de liaison avec Michel Kemp. En attendant, je vous laisse tout de suite en compagnie d'Anne-Marie Goudumon "Ici en France", rendez-vous Lundi prochain. Bonne soirée avec Anne-Marie Goudmon après cette petite interlude. Merci bonsoir.*

# **PARTIE III: Identification cellulaire et moléculaire du centre organisateur de la queue chez le poisson zèbre**

## **I. Introduction**

### **I.1 De la gastrulation à la formation du bourgeon caudal**

#### **I.1.a Blastème ou structure organisée?**

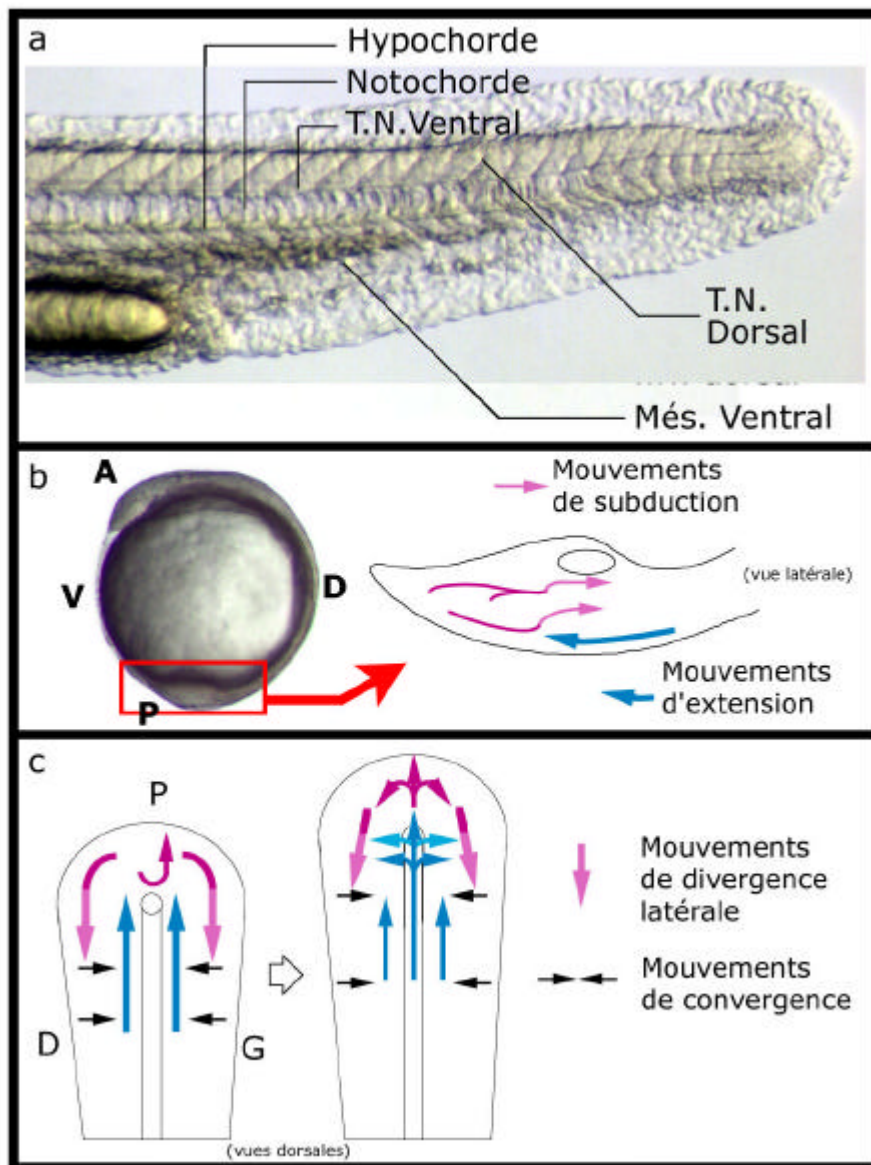
En embryogenèse précoce, la formation des parties postérieures de l'embryon n'a pour l'instant été que peu étudiée. En effet, chez les embryons de vertébrés, la queue ne s'individualise réellement qu'après la gastrulation, pendant la somitogenèse, événement considéré comme "tardif" par rapport à l'induction des feuillets embryonnaires. Les parties postérieures de l'embryon se forment à partir d'une masse de cellules indifférenciées appelée bourgeon caudal. Cette structure est clairement visible chez la souris, le poulet et le poisson car elle forme un renflement au niveau postérieur de l'embryon (Warga et Kimmel, 1990; Catala *et al*, 1995, Tam, 1982). Chez les amphibiens, sa localisation en fin de gastrulation est moins évidente car il est plus aplati; c'est pourquoi on parle plutôt de région génératrice de la queue plutôt que de bourgeon caudal (Tucker et Slack, 1995).

Jusqu'à l'apparition des techniques permettant le suivi précis des mouvements cellulaires et l'analyse de l'expression des gènes, le statut du bourgeon caudal restait encore flou. Ce dernier est-il une masse de cellules mésenchymateuses qui acquièrent leur identité progressivement ou se forme-t-il dans la continuité de la gastrulation et possède ainsi une régionalisation précise?

La première hypothèse a été émise par D. Holmdahl en 1925 qui distinguait clairement le développement de la queue et la mise en place des feuillets embryonnaires au cours de la gastrulation. Le blastème du bourgeon caudal serait composé de cellules pluripotentes, et formerait tous les tissus de la queue par croissance progressive (D. Holmdahl, 1925; Griffith, 1992).

En 1943, J. Pasteels a suggéré que le bourgeon caudal se développait directement en continuité avec la gastrulation et possédait ainsi des sous-populations cellulaires précises. Selon ce modèle, la tête, le tronc et la queue se formeraient progressivement selon les mêmes mouvements morphogénétiques, mais avec des intensités de croissance différentes (Pasteels,





### III-Figure 1: Le bourgeon caudal se forme en continuité avec la gastrulation

Les tissus qui composent la queue à 24h de développement sont en continuité avec les tissus du tronc (a). La queue est formée de tissus axiaux (hypochoorde, plaque du plancher et notochorde) et non-axiaux (tube neural dorsal, mésenchyme ventral, somites). Chez le poisson zèbre, les cellules au sein du bourgeon caudal adoptent des mouvements spécifiques du bourgeon caudal (flèches roses en b et c) et communs à la gastrulation (en bleu en b et c).

a: vue latérale de la queue d'un embryon à 24hpf. b: vue latérale d'un embryon au stade bourgeon caudal (11hpf) et représentation schématique des mouvements cellulaires au sein du bourgeon caudal à ce stade. c: vues dorsales, côté postérieur vers le haut. Représentation schématique des mouvements cellulaires au cours de la croissance du bourgeon caudal (début et milieu de somitogénèse).

1943). Cette proposition implique aussi que les différents tissus individualisés pendant la gastrulation contribuent à l'établissement de certaines populations cellulaires au sein de la queue.

### **I.1.b Le bourgeon caudal se forme en continuité avec la gastrulation**

L'hypothèse de Pasteels a été confirmée chez plusieurs organismes modèles, pour lesquels le développement des parties postérieures se fait en continuité avec la gastrulation (Gont *et al*, 1993; Catala *et al*, 1995; Kanki et Ho, 1997; Knezevic *et al*, 1998).

Chez les vertébrés, le bourgeon caudal est constitué de structures axiales (notochorde, partie ventrale du tube neural, hypochorde) et non-axiales (tube neural dorsal, mésenchyme de la queue, mésoderme para-axial). Les tissus axiaux dérivent d'une masse de cellules indifférenciées appelée charnière chordo-neurale (CNH). Cette région est considérée comme la descendante de l'organisateur de Spemann (nœud chez amniotes, lèvres dorsales chez le xénope et écusson chez le poisson). Les progéniteurs des structures non-axiales se trouvent postérieurement (Fig.1a)

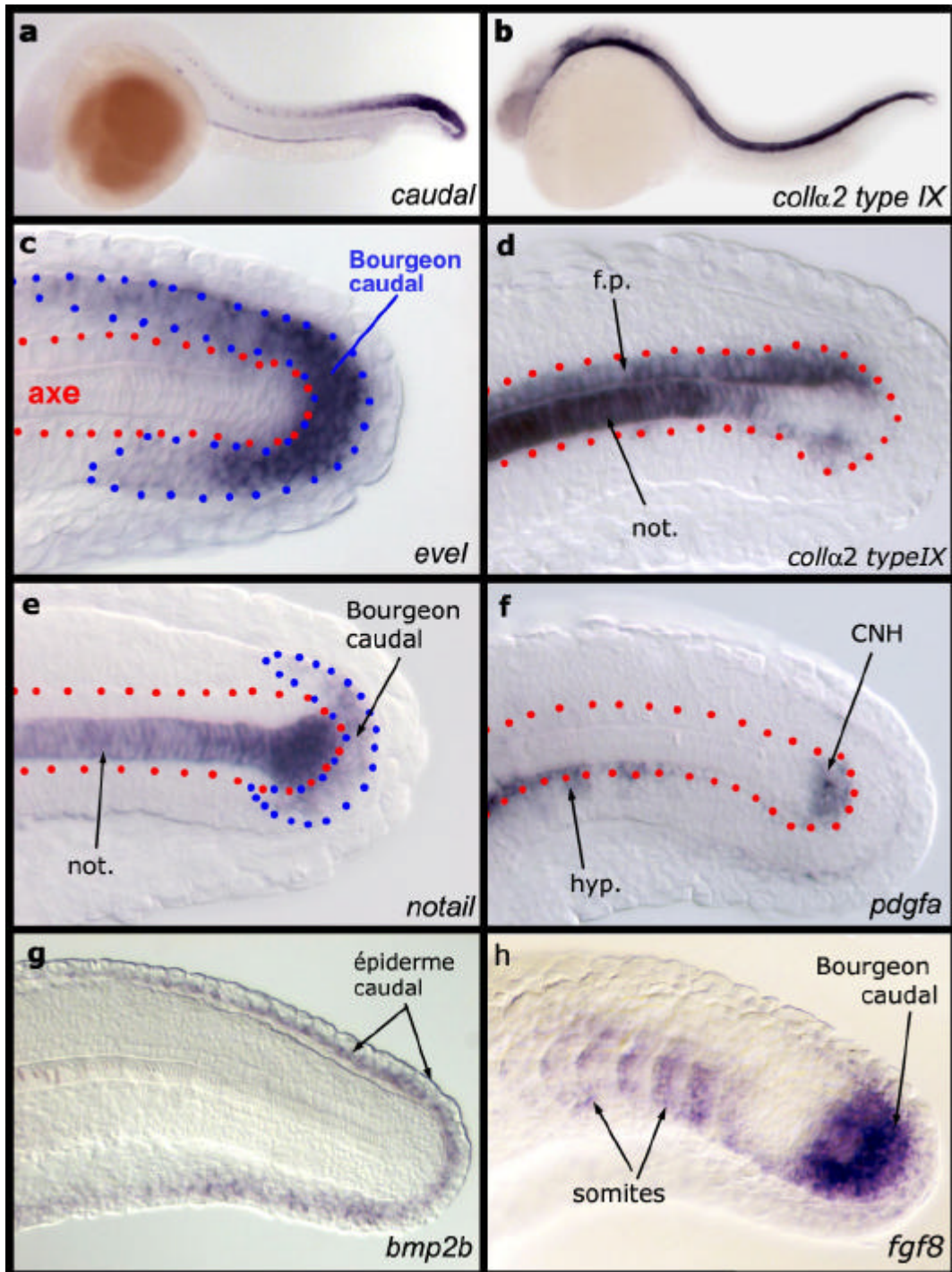
De plus, au sein du bourgeon caudal, il est possible de localiser les cellules à l'origine de différents tissus de la queue adulte, comme le tube neural, le mésoderme para-axial ou l'épiderme (Tucker et Slack, 1995a; Kanki et Ho, 1997; Catala *et al*, 1995).

Ainsi le bourgeon caudal n'est pas un blastème homogène de cellules indifférenciées, et il possède des sous-populations cellulaires déterminées, confirmant le modèle de Pasteels.

En plus de cette continuité spatiale avec les tissus plus antérieurs, le bourgeon caudal est le siège de mouvements cellulaires similaires à ceux qui surviennent pendant la gastrulation (Kanki et Ho, 1997; Knezevic *et al*, 1998). En particulier, les cellules subissent des mouvements de convergence et d'extension (Kanki et Ho, 1997; Marlow *et al*, 2004) ou d'ingression à travers le sillon primitif (Knezevic *et al*, 1998) (Fig.1b,c).

Cependant, certains mouvements cellulaires sont uniques au bourgeon caudal, générant la spécificité de sa morphogenèse. Notamment, les cellules les plus postérieures à l'origine des structures non-axiales réalisent des mouvements antérieurs pour former le mésoderme para-axial et des mouvements postérieurs pour assurer la croissance du bourgeon (mouvements de subduction et de divergence latérale). (Kanki et Ho, 1997; Fig.1b,c).

Une telle singularité des mécanismes de morphogenèse au sein du bourgeon caudal a été aussi montrée chez le poulet pour la formation du système nerveux central. En effet, au niveau



**III-Figure 2: Les territoires d'expression de différents gènes montrent l'organisation histologique de la queue**

Les gènes *caudal* et *collagen a2 type IX* sont exprimés dans la queue en continuité avec les tissus du tronc (a,b). Les gènes *evel*, *colla2typeIX*, *notail/bra* et *pdgfa* montrent que le bourgeon caudal est composé de cellules axiales (hypochorde, notochorde, plaque du plancher, d,e,f) et de cellules non-axiales (c,e). Les cellules de la queue expriment spécifiquement des gènes codant pour des facteurs de croissance dont *bmp2b* et *fgf8* (g,h). Orientations: Tous les embryons ont été photographiés en vue latérale, côté antérieur à gauche. Abréviations: CNH: Charnière Chordo Neurale; hyp: hypochorde; not.: notochorde; f.p: plaque du plancher.

de la tête et du tronc, le tube neural se forme par invagination de la plaque neurale (neurulation primaire). Postérieurement au bourgeon caudal (neurulation secondaire), la plaque neurale s'épaissit et se sépare progressivement de l'épiderme. Le canal de l'épendyme se forme par cavitation au sein du cylindre neural (Le Douarin *et al*, 1998).

### **I.1.c Bourgeon caudal et expressions géniques**

L'analyse de l'expression de gènes au sein du bourgeon caudal illustre tous les points évoqués ci-dessus.

Par soucis de clarté, je me focaliserai dans ce paragraphe sur l'expression des gènes uniquement chez le poisson zèbre, bien que la plupart de ces gènes aient été identifiés dans tous les organismes modèles et possèdent des patrons d'expression similaires.

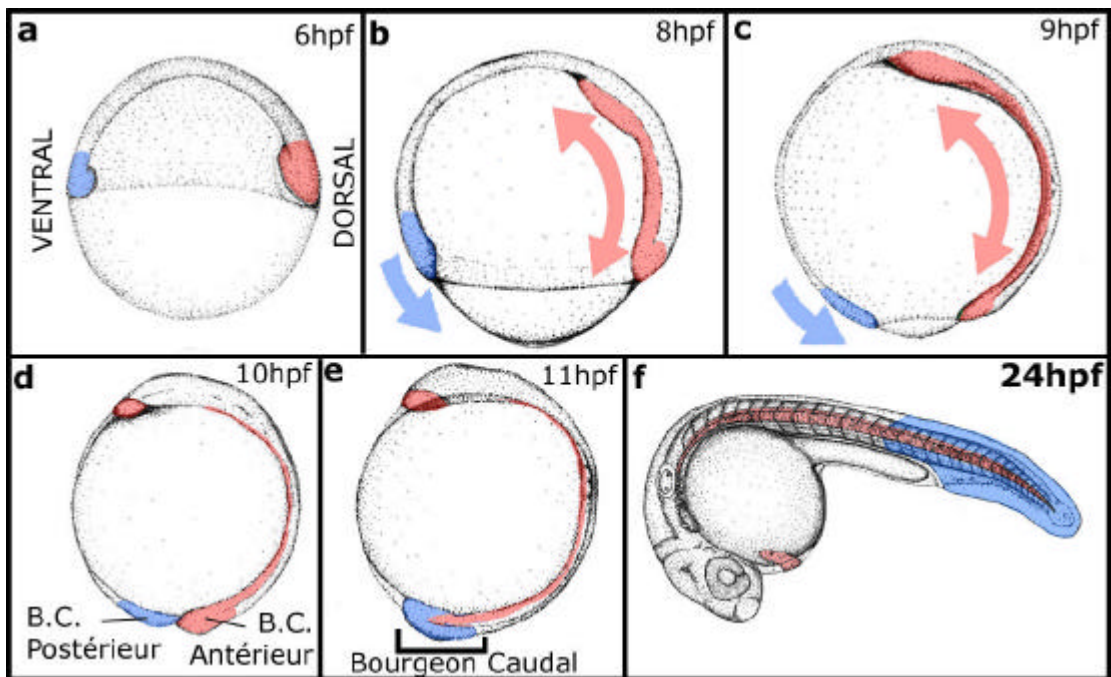
L'expression de certains gènes montre la continuité entre les tissus de la queue et ceux du tronc (tels que *caudal* et *collagen [2de type IX]*; Fig.2a,b).

D'autres soulignent l'origine duale (tissus axiaux et non-axiaux) du bourgeon caudal (*eve1*, *collagen [2de type IX]*, *pdgfa* et *ntl*; Fig.2c-f).

Il faut souligner que les cellules du bourgeon caudal expriment spécifiquement plusieurs gènes codant pour des facteurs de croissance (*wnt8a*, *bmp2b*, *bmp4*, *bmp7*, *shh*, *fgf3* et *fgf8*; Fig.2g,h).

### **I.1.d Queue et bourgeon caudal**

Il existe une ambiguïté qu'il est important d'aborder concernant la correspondance bourgeon caudal - queue. En effet, par définition, la queue est la partie de l'embryon située entre son extrémité postérieure et le proctodeum. Or l'analyse des destins cellulaires au niveau du bourgeon caudal montre que les cellules participent aussi à des structures du tronc, c'est-à-dire, antérieures à l'anus. Par exemple, chez le poisson, alors que l'anus se forme au niveau de la paire de somites n°17, les cellules du bourgeon caudal participent aussi à la formation du mésoderme para-axial jusqu'aux somites n°11/12 (Kanki et Ho, 1997). Il faudrait ainsi parler de bourgeon postérieur plutôt que caudal. De même, chez le xénope, la position de l'anus le long de l'axe antéro-postérieur change au cours de l'élongation de la queue (Tucker et Slack, 1995). Par conséquent, les destinées des cellules issues du bourgeon caudal ne sont pas les mêmes en fonction du stade de développement de l'embryon.



**III-Figure 3: Le bourgeon caudal se forme par la fusion des marges dorsale et ventrale**

Pendant la gastrulation, les cellules de la marge sont soumises aux mouvements de convergence vers le côté dorsal et d'extension. Les cellules situées à la marge dorsale involuent sous l'épiblaste et subissent de forts mouvements d'extension (a-c, cellules bleues). Les cellules de la marge ventrales ne subissent pas de mouvements d'extension et de convergence et ne font que glisser sur le vitellus (a-c, cellules rouges). En fin de gastrulation, les cellules des marge dorsale et ventrales se rencontrent au niveau du pôle végétal et fusionnent pour former le bourgeon caudal (d et e). A 24h de développement, les cellules issues de la marge dorsale forment les tissus axiaux de l'embryon et les cellules de la marge ventrale forment les tissus non-axiaux (f).

### **I.1.e Formation du bourgeon caudal**

Comme nous l'avons évoqué, les cellules du bourgeon caudal sont organisées en deux tissus distincts (axial et non-axial) étroitement liés l'un à l'autre.

Chez le poisson zèbre, cet arrangement résulte de la fusion de deux territoires situés en position opposée en début de gastrulation. Les cellules de la marge dorsale, à l'origine des tissus axiaux, subissent de forts mouvements d'extension et d'épibolie. En fin de gastrulation (100% épibolie), elles forment la partie antérieure du bourgeon caudal qui est à l'origine de la charnière chordo-neurale (Fig.3a-d). La partie postérieure du bourgeon caudal observable à 100% épibolie est constituée par les cellules situées à la marge ventrale de l'embryon en début de gastrulation. Ces cellules ne subissent aucun mouvement d'extension et de convergence et ne font que glisser sur le vitellus vers le pôle végétal (Fig.3a-d; Warga et Kimmel, 1990; Kanki et Ho, 1997; Myers *et al*, 2002b).

En fin de gastrulation, le bourgeon caudal est donc constitué de deux populations cellulaires distinctes. Après quelques minutes, ces deux territoires fusionnent pour former une masse homogène (Fig.3e). En cours de somitogenèse, le bourgeon caudal se déplace puis la queue s'allonge (Fig.3f Kimmel *et al*, 1990; Kanki et Ho, 1997).

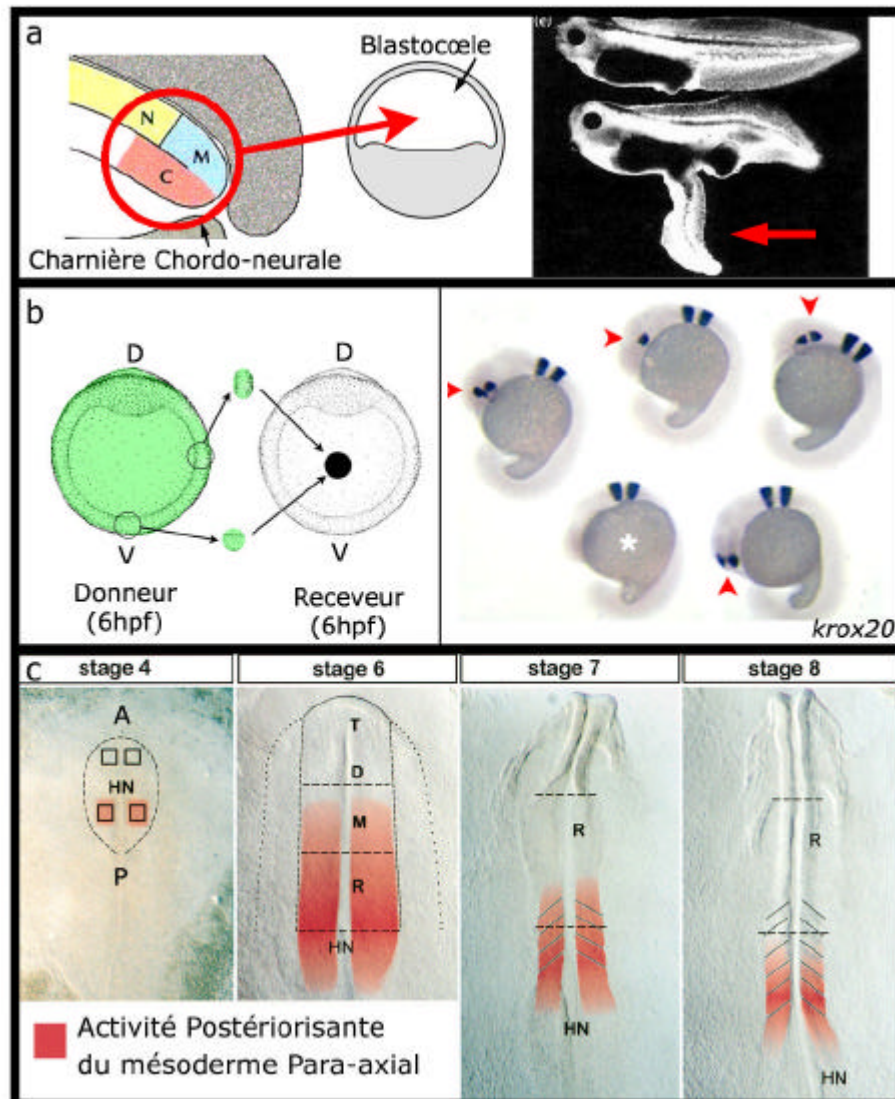
On peut donc considérer que le bourgeon caudal se forme par "emboîtement" de deux populations cellulaires aux origines distinctes.

Chez les amniotes, le processus de formation du bourgeon caudal est similaire. Au cours de la gastrulation, les cellules du nœud subissent un mouvement de régression vers le côté postérieur de l'embryon le long du sillon primitif, et fusionnent avec les tissus situés postérieurement. Ainsi le bourgeon caudal se forme aussi par invasion des structures postérieures (non-axiales) par le nœud, qui est à l'origine du CNH (Tam, 1984; Catala *et al*, 1995; Wilson et Beddington, 1996; Cambray et Wilson, 2002). Chez le xénope, bien que les mouvements cellulaires qui conduisent à la formation du bourgeon caudal soient quelque peu différents, on retrouve la même dualité au sein des tissus de la queue (Gont *et al*, 1993).

## **I.2 Induction précoce du bourgeon caudal**

### **I.2.a Continuité de l'organisateur de Spemann**

Le concept de centre organisateur de la queue dérive directement des expériences originales de Spemann et Mangold chez l'amphibien. En effet, comme nous l'avons déjà décrit en Introduction (Section III.3), alors que la transplantation de la lèvre dorsale d'une jeune



### III-Figure 4: Localisation des signaux de postériorisation de l'embryon

Le schéma en (a) représente une coupe en gros plan du bourgeon caudal de xénope. La greffe de charnière chordo-neurale dans le blastocœle d'un embryon en fin de stade blastula induit la formation d'une queue ectopique (a). Chez le poisson zèbre, la greffe de cellules marginales latérales ou ventrales prélevées en début de gastrulation (en b, embryon donneur en vert, vue du pôle animal) vers le pôle animal d'un embryon receveur postériorise le système nerveux antérieur qui exprime les gène rhombencéphalique *krox20* à 24hpf (b à droite). Chez le poulet, le mésoderme para-axial possède une activité postériorisante pendant toute la gastrulation (zone en rouge en c). Abréviations: en b: D=dorsal; V=Ventral; en c: A=antérieur; P=postérieur; HN=nœud de Hensen; T=télocéphale; D=Diencéphale; M=Mésencéphale; R=Rhomencéphale. Figure adaptée de Tucker et Slack, 1995; Woo et Fraser, 1997 et Muhr *et al*, 1997).

gastrula dans le blastocœle d'un embryon receveur en fin de stade blastula produit un deuxième axe composé de structures antérieures, la greffe d'une lèvre dorsale d'un embryon en fin de gastrulation produit une queue ectopique, identique à la première (Mangold, 1933). Les mêmes expériences ont été réalisées chez le poulet (Storey *et al*, 1992). Sur la base de ces expériences, il a été admis que le centre organisateur de Spemann organise tout l'axe antéro-postérieur (pour revue voir Niehrs, 2004).

Conformément à ce résultat, chez le xénope et le poulet, la transplantation d'une fraction ou de l'ensemble du bourgeon caudal produit des duplications de structures postérieures avec un recrutement des cellules de l'hôte indiquant une activité organisatrice (Tucker et Slack, 1995; Knezevic *et al*, 1998). Plus particulièrement, il a été montré chez le xénope que la région de la charnière chordo-neurale est nécessaire et suffisante pour la formation d'une queue (région comportant les parties postérieures de la notochorde et du tube neural ventral ainsi que le CNH lui-même). (Fig.4a; Tucker et Slack, 1995).

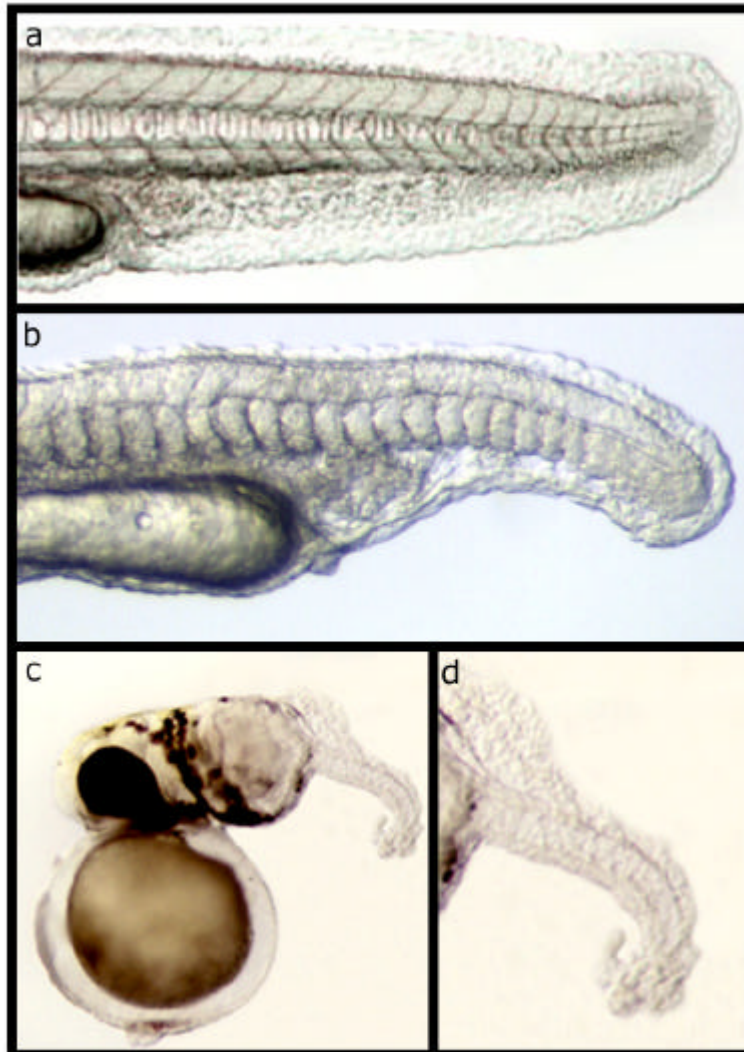
Ainsi l'induction et la croissance du bourgeon caudal semblent être des phénomènes tardifs, reposant sur l'activité de l'organisateur de Spemann.

### **I.2.b Source de postériorisation de l'embryon**

Selon le modèle de Nieuwkoop de la régionalisation A/P de la plaque neurale, l'organisateur de Spemann émet le signal "activateur" (induction neurale) et "transformant" (postériorisation) (Introduction – Section III.4). Cependant certaines données indiquent que les signaux de postériorisation ne proviennent pas de l'organisateur mais de tissus non axiaux. En effet, lorsqu'un tissu de type mésoderme non-axial prélevé en début de gastrula est greffé dans la plaque neurale antérieure d'un embryon receveur, des gènes spécifiques des parties neurales postérieures sont induits (ex:*krox20*, *hoxb9*). Ce résultat a été obtenu chez le poisson (Fig.4b; Woo et Fraser, 1997), le xénope (Fujii *et al*, 2002) et le poulet (Fig.4c; Bang *et al*, 1997; Muhr *et al*, 1997). Dans tous les cas, ces structures ne sont pas très développées et ne s'allongent pas, ce qui contraste avec les queues secondaires induites par la greffe d'un organisateur de Spemann tardif. De plus, chez l'amphibien, la greffe de la zone marginale ventrale d'une jeune gastrula dans le blastocœle d'un embryon en fin de stade blastula (expérience d'Einsteck) conduit dans certains cas, à la formation d'une queue ectopique bien reconnaissable, composée de somites et d'un tube neural (Slack et Isaacs, 1993). Cependant cette activité inductrice semble dépendante de l'organisateur dorsal de Spemann.

Ainsi même si le mésoderme non-axial a la capacité de postérioriser le système nerveux, son activité organisatrice reste très limitée et dépendante de celle de l'organisateur de Spemann.





**III-Figure 5: Les tissus axiaux et non-axiaux peuvent se développer de manière indépendante**

Une queue sauvage est constituée de tissus axiaux et non-axiaux (a). Dans un embryon ventralisé par l'injection de 60ng d'ARNm codant pour BMP4, le développement des structures axiales est aboli sans affecter les structures non-axiales qui se forment correctement (b). Dans des embryons dorsalisés par l'injection de 5ng de l'ARNm codant pour Noggin1, tous les tissus de la queue sont absents sauf les cellules de l'axe qui ont tendance à s'enrouler sur elle mêmes en raison de l'absence de tissus non-axiaux. Tous les embryons ont été photographiés à 30h de développement en vue latérale, côté antérieur à gauche.

### **I.3 Deux structures indépendantes**

Plusieurs études indiquent que les structures axiales et non-axiales du bourgeon caudal peuvent se développer de manière indépendante, suggérant que la présence des deux tissus n'est pas requise pour leur développement respectif.

#### **I.3.a Perte des tissus axiaux**

Chez le poulet, l'ablation de la charnière chordo-neurale n'abolit pas la formation du bourgeon caudal et la queue des embryons se forme correctement mais est dépourvue de tissus axiaux (notochorde, plaque du plancher, partie dorsale de l'intestin) (Catala *et al*, 1995; Teillet *et al*, 1998). De même, chez de nombreux mutants génétiques dont la notochorde est absente, la régionalisation A/P de l'embryon ainsi que la formation et la croissance de la queue ne sont pas perturbés. C'est notamment le cas des embryons mutants pour le gène *floating-head* (*flh*) chez le poisson (Halpern *et al*, 1995) et *hnf3 $\beta$ /foxA2* chez la souris (Ang et Rosant, 1994).

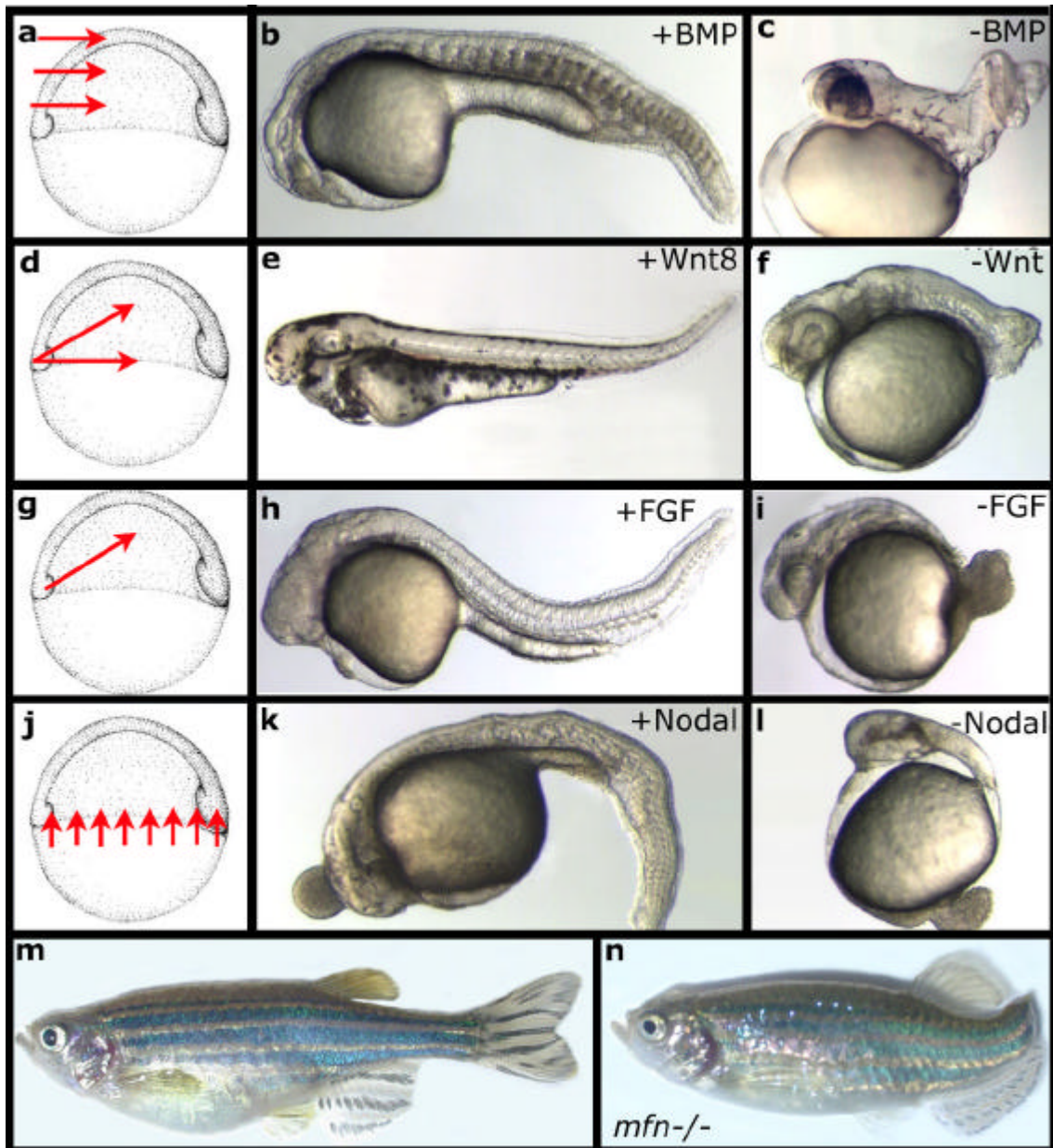
Ces données indiquent que le CNH n'est pas indispensable à la différenciation des tissus non-axiaux au cours de la formation de la queue.

#### **I.3.b Perturbation de l'axe dorso-ventral**

Comme nous l'avons évoqué, le bourgeon caudal chez le poisson zèbre se forme par la fusion de cellules dérivant des marges dorsale et ventrale de l'embryon en début de gastrulation. La perturbation de l'axe dorso-ventral empêche la différenciation correcte de l'une ou l'autre de ces populations. Ainsi dans des embryons ventralisés, alors que l'identité dorsale est complètement abolie en début de gastrulation, le bourgeon caudal se forme quand même ainsi que la queue, mais dépourvue de structures axiales (Fig.5a,b). A l'inverse, dans des embryons dont l'identité ventrale est abolie, les tissus axiaux se forment correctement et conservent la capacité à s'étendre (Fig.5a,c).

### **I.4 Molécules requises pour la formation du bourgeon caudal**

Puisque la queue est composée de deux structures indépendantes (axiales et non-axiales), les molécules impliquées dans la formation des cellules de la marge dorsale et de la marge ventrale sont impliquées dans la formation du bourgeon caudal.



### III-Figure 6: Molécules impliquées dans la formation du bourgeon caudal postérieur chez le poisson zèbre

Les BMP sont impliqués dans la détermination du côté ventral de l'embryon (a). Leur gain de fonction (injection généralisée de 60ng d'ARNm codant pour BMP4) abolit la formation des tissus axiaux qui dérivent des cellules de la marge dorsale (b, flèche) et le reste des tissus de la queue se forme normalement. La perte de fonction de BMP (injection de 5ng d'ARNm codant pour Noggin1) inhibe le développement des tissus non-axiaux (c). Seules les structures axiales subsistent et s'enroulent sur elles-mêmes en raison de l'absence des autres tissus de la queue (flèche en c). La signalisation Wnt est requise pour la postériorisation de l'embryon ainsi que pour la détermination ventrale l'embryon (d). La sur-expression zygotique de Wnt8a (injection de 100ng pCS<sup>2+</sup> - Wnt8) postériorise l'embryon ce qui bloque la différenciation des tissus les plus antérieurs (yeux, flèche en e). La diminution de l'activité Wnt au sein de l'embryon élargit le territoire de la tête (triangle en f) et bloque la différenciation des tissus non-axiaux de la queue. Seules les structures axiales subsistent et s'enroulent sur elles-mêmes en raison de l'absence des autres tissus de la queue (flèche en f). Les FGF interviennent dans la postériorisation de l'embryon. Alors que la sur-expression de FGF3 (20ng d'ARN injecté) bloque la différenciation des territoires les plus antérieurs (flèche en h), l'injection d'une forme dominante négative du récepteur 1 aux FGFs inhibe complètement la formation de la queue, la tête étant normalement formée (i). Enfin, les facteurs Nodal déterminent l'identité des cellules le long de l'axe A/V depuis la marge (j). Un gain d'activité Nodal augmente la taille de la marge ce qui induit des malformations sèvres (k). La perte d'activité Nodal dans un mutant *MZoep* bloque complètement la formation de la queue (l). Les poisson adultes mutants pour *tolloid/minifin* sont dépourvus de nageoire caudale (m,n). Orientations et stades: a,d,g,j=début de gastrulation (6hpf), vue latérale, côté dorsal à droite. b,c,e,f,h,i,k,l= 30h de développement, vue latérale, côté antérieur à gauche. m,n= poissons adultes (6mois -un an) en vue latérale.

#### **I.4.a Formation du CNH**

La charnière chordo-neurale dérive de l'organisateur de Spemann. L'activité de ce dernier consiste essentiellement en la production d'antagonistes sécrétés de BMP (Noggin, Chordin, FGF) et de Wnt (Frzb, Dkk). De plus, le côté dorsal est soumis à une forte signalisation Nodal (De Robertis *et al*, 2001; Schier, 2001). Ainsi les tissus axiaux se développent stimulés par la voie Nodal et en absence de signaux BMP et Wnt. En plus de ces facteurs sécrétés, les cellules de l'organisateur de Spemann expriment de nombreux gènes codant pour des facteurs de transcription essentiels pour la formation des tissus axiaux, tels que *bozozok* ou *flh* (De Robertis *et al*, 2001; Schier, 2001). La perte de fonction de ces gènes empêche la formation des tissus axiaux et leur gain de fonction bloque celle des structures non-axiales.

#### **I.4.b Formation du bourgeon caudal postérieur**

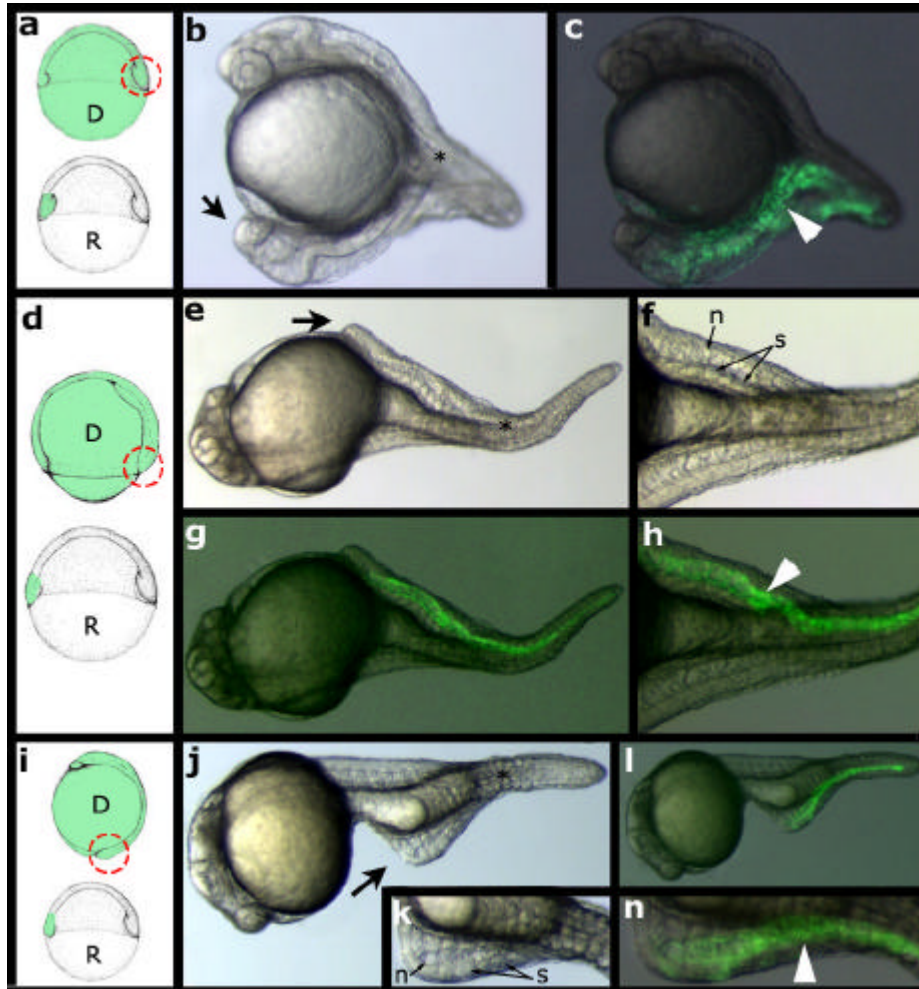
Même si l'implication de plusieurs facteurs de croissance au cours de la formation du bourgeon caudal est clairement établie, leurs relations et rôle respectifs ne sont pas clairs. Voici un rapide résumé des principales sources de signaux requis pour la formation du bourgeon caudal postérieur.

##### **I.4.b.1 Les BMP**

Les facteurs de croissances de la famille des BMP sont essentiels pour le développement des cellules de la marge ventrale car ils sont les principaux acteurs de l'établissement de l'identité ventrale (au niveau des trois feuilletts embryonnaires). Chez le poisson et la souris, des embryons mutants pour la signalisation BMP ont un développement des tissus postérieurs abolis (Winnier *et al*, 1995; Mullins *et al*, 1996; Nguyen *et al*, 1998; Hild *et al*, 1999). Chez de tels embryons défectifs, en l'absence de tissus non-axiaux, la notochorde peut s'enrouler sur elle-même (Fig.6c). De même, chez le poisson zèbre, le mutant *minifin* (*mnf*) faiblement dorsalisé, parvient à se développer jusqu'à l'âge adulte, mais est dépourvu de nageoire caudale (Connors *et al*, 1999; Fig.6m,n)

Inversement, après sur-expression des BMP, l'identité ventrale est fortement élargie vers le côté dorsal, ce qui inhibe le développement des structures axiales (De Robertis, 2001; Schier, 2001). Dans de tels embryons, la queue se développe correctement sans notochorde (Fig.6b).

L'importance de la voie BMP pour la formation de la queue a été montré chez le xénope par une autre approche. En effet, si des fragments d'ectoderme d'embryons sur-exprimant BMP4 sont greffés dans le blastocœle d'embryons en blastula (expérience d'Einstein), les cellules



**III-Figure 7: L'organisateur de Spemann ne peut jamais dupliquer les territoires les plus postérieurs.**

Les cellules de la marge dorsale ont été prélevées en début (a, 6hpf), milieu (d, 8hpf) et fin de gastrulation (i, 10hpf) pour être greffées vers la marge ventrale d'un embryon donneur en début de gastrulation (6hpf, a,d,i). Si les cellules de la marge dorsale sont prélevées en début de gastrulation, les embryons donneurs développent un axe secondaire comprenant une tête, ainsi qu'une notochorde. Si les cellules de la marge dorsale sont prélevées en milieu de gastrulation, les embryons donneurs développent un axe secondaire comprenant une notochorde, des somites et du système nerveux, mais jamais de tête (e). Enfin, si les cellules de la marge dorsale sont prélevées en fin de gastrulation, les embryons donneurs développent un axe secondaire très court comprenant des somites et une notochorde (j). Dans tous les cas, l'axe induit fusionne postérieurement avec l'axe endogène (étoile en b,e,j). De plus, les cellules du greffon participent essentiellement à la formation de la notochorde (triangle en c,h,n). Abréviations: n= notochorde; s=somites; D=Donneur; R=Receveur. Tous les embryons sont en vue latérale, côté antérieur vers la gauche.

greffées induisent la formation d'une queue ectopique composée de somites et de système nerveux (Jones *et al*, 1992).

#### **I.4.b.2 Les Wnt**

Il est aujourd'hui clairement établi que la signalisation Wnt est requise pour la postériorisation de l'embryon. Dans plusieurs organismes modèles, la sur-expression de Wnt peut induire l'expression de gènes neuraux postérieurs au sein de tissu neural de manière graduelle (McGrew *et al*, 1995; Itoh et Sokol, 1997; Nordström *et al*, 2002). Chez le poisson, la sur-expression zygotique de Wnt8 empêche la formation des tissus neuraux les plus antérieurs (Fig.6e; Kelly *et al*, 1995). Par ailleurs, la diminution de l'activité Wnt (chez des mutants génétiques ou par sur-expression d'antagonistes spécifiques tels que Dkk et Frzb) bloque la formation des tissus postérieurs (Greco *et al*, 1996; Niehrs, 1999; Yamaguchi, 2001; Erter *et al*, 2001; Lekven *et al*, 2001). Chez le poisson et le xénope, la sur-expression de l'antagoniste Dkk1 antériorise le système nerveux et le mésoderme (Glinka *et al*, 1998; Hashimoto *et al*, 2000; Shinya *et al*, 2001). Au niveau de la queue, seuls les tissus axiaux subsistent (Fig.6f).

Cette implication de la signalisation Wnt pour la détermination des territoires les plus postérieurs a été montré directement au sein de la plaque neurale de xénope, dans laquelle il existe un gradient de signalisation Wnt/ $\beta$ -catenin au sein des cellules qui la compose, avec la plus forte stimulation située postérieurement (Kiecker et Niehrs, 2001).

Par ailleurs, la signalisation Wnt est aussi requise pour la détermination du côté ventral de l'embryon en début de gastrulation (Hoppler *et al*, 1996; Itoh *et al*, 1999). Le signal Wnt est donc aussi requis pour maintenir l'identité ventrale de l'embryon. La transduction de ce signal Wnt se fait par le contrôle de la concentration intracellulaire du calcium et du facteur de transcription NF-AT (Saneyoshi *et al*, 2002).

Ainsi la signalisation Wnt joue un rôle pour la formation du bourgeon caudal à deux niveaux: détermination de la marge ventrale en début de gastrulation (voie du calcium) et postériorisation de l'embryon (voie  $\beta$ -catenin).

#### **I.4.b.3 Les FGF**

Parmi les signaux postériorisants, la signalisation FGF est classiquement mentionnée. Comme pour la signalisation Wnt, la diminution de l'activité FGF (sur-expression de forme dominante-négative du récepteur 1 ou chez des mutants génétiques) inhibe le développement des tissus postérieurs (Fig.6i; Amaya *et al*, 1993; Yamaguchi *et al*, 1994; Deng *et al*, 1994, Griffin *et al*, 1995; Draper *et al*, 2003). Un gain de fonction FGF (par sur-expression du FGF3

ou par application de billes chargées en FGF2) induit des gènes spécifiques des parties les plus caudales de l'embryon (Fig.6h; Alvarez *et al*, 1998; Storey *et al*, 1998).

De plus, comme avec BMP4, si une expérience d'Einstock est réalisée avec des fragments d'ectoderme d'embryons sur-exprimant le bFGF, une queue secondaire est induite (Ruiz i Altaba et Melton, 1989; Slack et Isaacs, 1993).

#### **I.4.b.4 L'Acide Rétinoïque**

L'acide rétinoïque (A.R.) possède aussi de fortes propriétés postériorisantes des trois feuilletts embryonnaires et plusieurs gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'A.R. sont exprimés précocement au cours du développement.

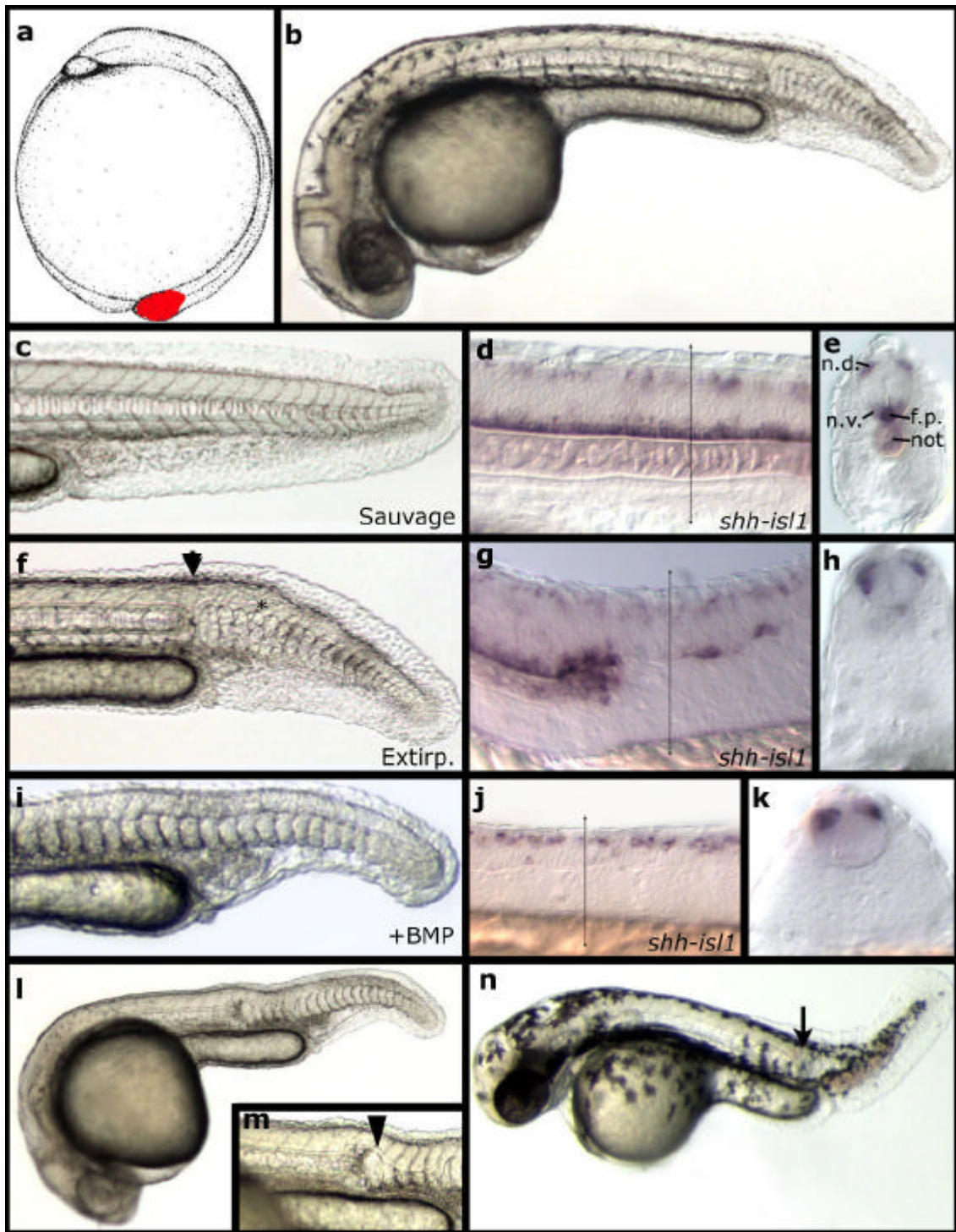
Chez le poisson zèbre en particulier, l'enzyme de dégradation de l'A.R. *Cyp26a* est produite très précocement dans les cellules du cerveau antérieur présomptif ainsi que dans une fraction des cellules marginales qui vont se différencier en bourgeon caudal (White *et al*, 1996; Thisse *et al*, 2001; Kudoh *et al*, 2002, Dobbs-Mc-Auliffe *et al*, 2004). Le gène *raldh2*, qui code pour une enzyme nécessaire pour la biosynthèse de l'A.R., est exprimé dans les cellules marginales au même moment et conserve une localisation dans la partie postérieure du système nerveux au cours du développement (Begemann *et al*, 2001; Grandel *et al*, 2002). Ces deux gènes possèdent une expression très complémentaire suggérant que la synthèse et la dégradation de l'A.R. sont étroitement régulés au cours du développement.

Cependant les études de perte ou de gain d'activité chez le poisson zèbre indiquent que l'acide rétinoïque est principalement impliqué dans la régionalisation correcte de l'embryon au niveau de la tête et du tronc, zones hypersensibles aux variations de d'A.R., les défauts de formation au niveau de la queue étant limités (Grandel *et al*, 2002; Dobbs-McAuliffe *et al*, 2004).

#### **I.4.c La signalisation Activin/Nodal**

Enfin, la signalisation Activin/Nodal est aussi requise pour la formation du bourgeon caudal (postérieur et antérieur). En effet, les embryons dépourvus de toute activité Nodal (mutants *MZoep* ou sur-exprimant *Atv1*) ne forment que des tissus neuraux antérieurs. Seuls subsistent une masse de cellules indifférenciées postérieurement (Fig.6l; Thisse *et al*, 2000).

Les facteurs Activin/Nodal possèdent un large spectre d'activité ce qui rend compliqué l'analyse de leur rôle pour la formation des tissus postérieurs (Fig.6k). Cependant, il est clair, au moins chez le poisson zèbre, que ces facteurs de croissance déterminent l'identité des cellules marginales le long de l'axe A/V et, en conséquence, sont requise pour déterminer ce territoire qui est à l'origine du bourgeon caudal (Schier et Shen, 2000).



**III-Figure 8: L'ablation de la marge dorsale n'affecte pas le développement de la queue.**

Les cellules de la marge dorsale ont été extirpées en fin de gastrulation juste avant la formation du bourgeon caudal (a). A 30h de développement, les embryons extirpés ont une morphologie normale dans leur partie antérieure mais leur queue est dépourvue de structures axiales (b,f,l,m). On peut remarquer clairement le niveau d'ablation de la notochorde (triangle en f et m). La queue de tels embryons est similaire à celle d'embryons ventralisés, sur-exprimant BMP4 (i). Le double marquage avec les gènes *isl1* et *shh* indique que dans les embryons extirpés ou ventralisés la notochorde, la plaque du plancher et les neurones ventraux sont absents (comparer d,e avec g,h,j,k). A deux jours de développement, la queue des embryons extirpés ne s'allonge pas normalement. Orientations: Tous les embryons ont été photographiés en vue latérale, côté antérieur à gauche, sauf en e,h et k qui sont des coupes transversales côté dorsal vers le haut. Le niveau de la coupe est indiqué en d,g et j. Abréviations: not=notochorde; f.p.=plaque du plancher; n.d.=neurones dorsaux; n.v.=neurones ventraux.



## **II. Résultats: Identification et caractérisation moléculaire de l'organisateur de la queue chez le poisson zèbre**

Chez le poisson zèbre, la formation des parties les plus postérieures a été moins étudiée que celles de la tête et du tronc. Par conséquent, j'ai exploré les capacités d'induction des différents territoires qui participent à la formation du bourgeon caudal. J'ai montré que, contrairement au cas du xénope, les cellules du centre organisateur de Spemann ne peuvent induire la formation d'une queue ectopique. Il existe un deuxième centre organisateur, indépendant de l'organisateur de Spemann, impliqué dans la formation des territoires les plus postérieurs.

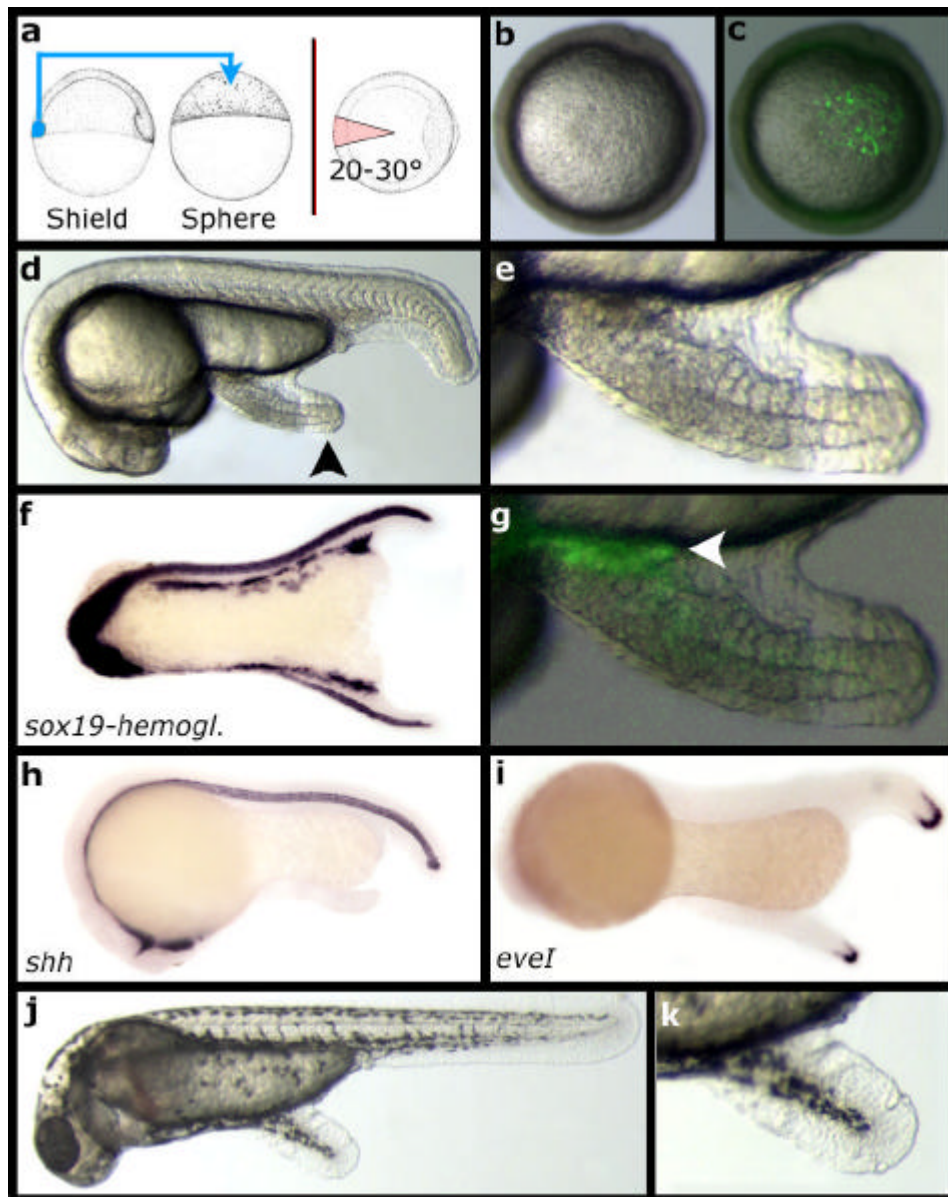
### **II.1 L'organisateur de Spemann ne peut induire de queue ectopique**

Afin d'analyser si l'équivalent de l'organisateur de Spemann chez le poisson zèbre (écusson embryonnaire ou marge dorsale) possède les mêmes propriétés que chez l'amphibien, j'ai greffé la marge dorsale d'embryons donneurs de différents stades à la marge ventrale d'un embryon en début de gastrula (stade Shield - 6hpf, Fig.7a,d,i).

Lorsque l'embryon donneur est en début de gastrulation (6hpf), la marge dorsale induit à 24h de développement la formation d'un axe ectopique, composé de système nerveux antérieur ainsi que de mésoderme axial et para-axial. La partie la plus antérieure de la tête, comprenant les yeux, n'est pas toujours induite (Fig.7a-c, Shih et Fraser, 1996; Saude *et al*, 2000).

Si la marge dorsale de l'embryon donneur est prélevée en milieu de gastrulation (75% epibolie), le greffon forme une deuxième notochorde, et induit des somites au niveau du tronc (Fig.7d-h). Les tissus céphaliques ne sont jamais induits. Il arrive que cet axe secondaire ne se sépare pas de l'axe endogène, ainsi l'embryon receveur présente un élargissement des somites et du tube neural dans la partie médiane du tronc, zone qui a intégrée la greffe.

Finalement, si la même opération est effectuée en fin de gastrulation (90-100% epibolie), avant que les marge dorsale et ventrale ne fusionnent, on peut observer une duplication postérieure de l'axe chez l'embryon receveur à 24hpf, comprenant des somites et une notochorde. Cependant cet axe secondaire de courte taille fusionne postérieurement avec la queue de l'animal (Fig.7i-n). Dans toutes les expériences de transplantation, les axes induits sont formés de cellules greffées (positives pour la fluorescéine) et de cellules recrutés chez l'hôte (négatives pour la fluorescéine) indiquant les capacités organisatrices du tissu greffé (Fig.7c,g,h,l,n).



### III-Figure 9: Les cellules de la marge ventrale possèdent des propriétés organisatrices de la queue

Les cellules de la marge ventrale ont été prélevée en début de gastrulation (6hpf) dans un arc de cercle de 20-30° et greffées au pôle animal d'un embryon receveur au stade Sphère (4hpf) (a). En cours de gastrulation, les cellules du greffon se sont bien intégrées dans le tissu du receveur et restent localisées au pôle animal (b,c). A 24h de développement, les embryons receveurs développent ventralement une queue secondaire composée d'un tube neural, de somites en "U", de sang et d'épiderme caudal, mais dépourvus de tissus axiaux (e,f,h,i). Les queues ectopique est composée de cellules du donneur (fluorescentes) et du receveur (g). A deux jours de développement, la queue secondaire est moins allongée que la queue endogène (j,k). Abréviations: t.n.= tube neural; s.=somites;ép=épiderme. Stades: b,c=début de gastrulation (7hpf); d-i=24hpf;j,k=48hpf. Orientations: b,c: vue animales; d-k=vues latérales, côté antérieur vers la gauche.

Ainsi la marge dorsale d'un embryon de poisson possède une activité organisatrice qui évolue au cours de la gastrulation. Comme chez l'amphibien, plus l'organisateur est prélevé tard au cours de la gastrulation plus l'identité de l'axe secondaire induit est postérieure. Cependant, l'extrémité postérieure de l'embryon ne se duplique jamais.

## **II.2 La marge ventrale et la marge dorsale participent à la formation du bourgeon caudal de manière indépendante**

De multiples données indiquent que les structures non axiales peuvent se développer en l'absence de tissus axiaux, suggérant que l'activité de la marge dorsale n'est pas nécessaire pour la différenciation de la marge ventrale (voir Section I.3).

Afin de confirmer cette donnée chez le poisson zèbre, j'ai réalisé des séries d'extirpation de la marge dorsale en fin de gastrulation (90-100% epibolie) avant que le bourgeon caudal ne se forme, et analysé le développement de la queue des embryons ayant subi l'ablation.

A 24h de développement, tous les embryons (100%, n=25) sont dépourvus de notochorde dans la partie postérieure de l'embryon, alors que leur morphologie est complètement sauvage antérieurement (Fig.8a-cf). Même si la queue de l'embryon est dépourvue de tissus axiaux, sa croissance semble comparable à celle d'un embryon sauvage. Cependant, à 2 jours de développement, alors que la tête et le tronc se développent normalement, la queue ne s'allonge plus, indiquant que les tissus axiaux sont requis pour l'allongement de la queue (Fig.8n). On remarque aussi que lorsque la notochorde est absente, les somites adoptent une forme en "U", indiquant une absence des cellules musculaire à contraction lente (Fig.8f ; Stickney *et al*, 2000). Cette observation confirme l'absence de la notochorde puisque la présence de ces fibres dépend de la présence des cellules de l'axe. La morphologie des queues dépourvues d'axe est comparable à celles d'embryons ventralisés (Fig.8i).

L'ensemble de ces observations ont été confirmées par hybridation *in situ* avec les marqueurs *shh* (notochorde et plaque du plancher) et *Isl1* (neurones dorsaux et ventraux). En effet, alors que dans la partie antérieure à l'ablation, la notochorde et le tube neural sont correctement formés, postérieurement, seuls les neurones dorsaux subsistent (Fig.8d,e,g,h,j,k). La perturbation de la polarité dorso-ventrale du tube neural est due à l'absence de tissus axiaux. En effet, les cellules de la plaque du plancher proviennent, comme la notochorde, des cellules de la marge dorsale et ont été extirpées en fin de gastrulation ou sont absentes dans les embryons ventralisés. Par contre, les neurones ventraux sont induits par un signal Shh

Stade du donneur	Stade du receveur	Queue ectopique (%)
Sphère 4hpf	Sphère 4hpf	57,9 (n=38)
Shield 6hpf	Sphère 4hpf	66,1 (n=59)
75%epibolie 8hpf	Sphère 4hpf	48 (n=27)
100%epibolie 10hpf	Sphère 4hpf	14,3 (n=28)
Shield 6hpf	Shield 6hpf	20 (n=60)

### III-Table 1: Activité du centre organisateur de la queue au cours du développement embryonnaire

Les greffes de cellules de marge ventrale ont été réalisées à partir d'embryons donneurs de différents âges vers le pôle animal d'embryon receveur au stade Sphère (4hpf). L'induction de queues ectopiques est reportée en pourcentages avec le nombre **n** de greffes effectuées. L'activité organisatrice des cellules de la marge ventrale débute dès le stade Sphère jusqu'en fin de gastrulation. La fréquence d'induction de queues secondaires est la meilleure pour les greffons prélevés en début de gastrulation (stade Shield, 6hpf) et diminue au cours de la gastrulation. La greffe isochronique du stade Shield au stade Shield donne un résultat plus faible indiquant que la capacité du développement d'une queue chez l'embryon receveur diminue avec l'âge de l'embryon receveur.

provenant des cellules de la plaque du plancher du tube neural (Sasaï et De Robertis, 1997). Par conséquent l'absence un signal Shh empêche la formation des neurones ventraux. Ainsi les tissus postérieurs de l'embryon peuvent se développer correctement en l'absence de structures axiales. Leur croissance apparaît normale jusqu'à un jour de développement.

### **II.3 Les cellules de la marge ventrale ont une activité organisatrice de la queue.**

Puisque les cellules de la marge ventrale peuvent participer à la formation des tissus postérieurs en l'absence d'activité organisatrice dorsale, il est possible qu'elles possèdent une activité organisatrice des tissus non-axiaux.

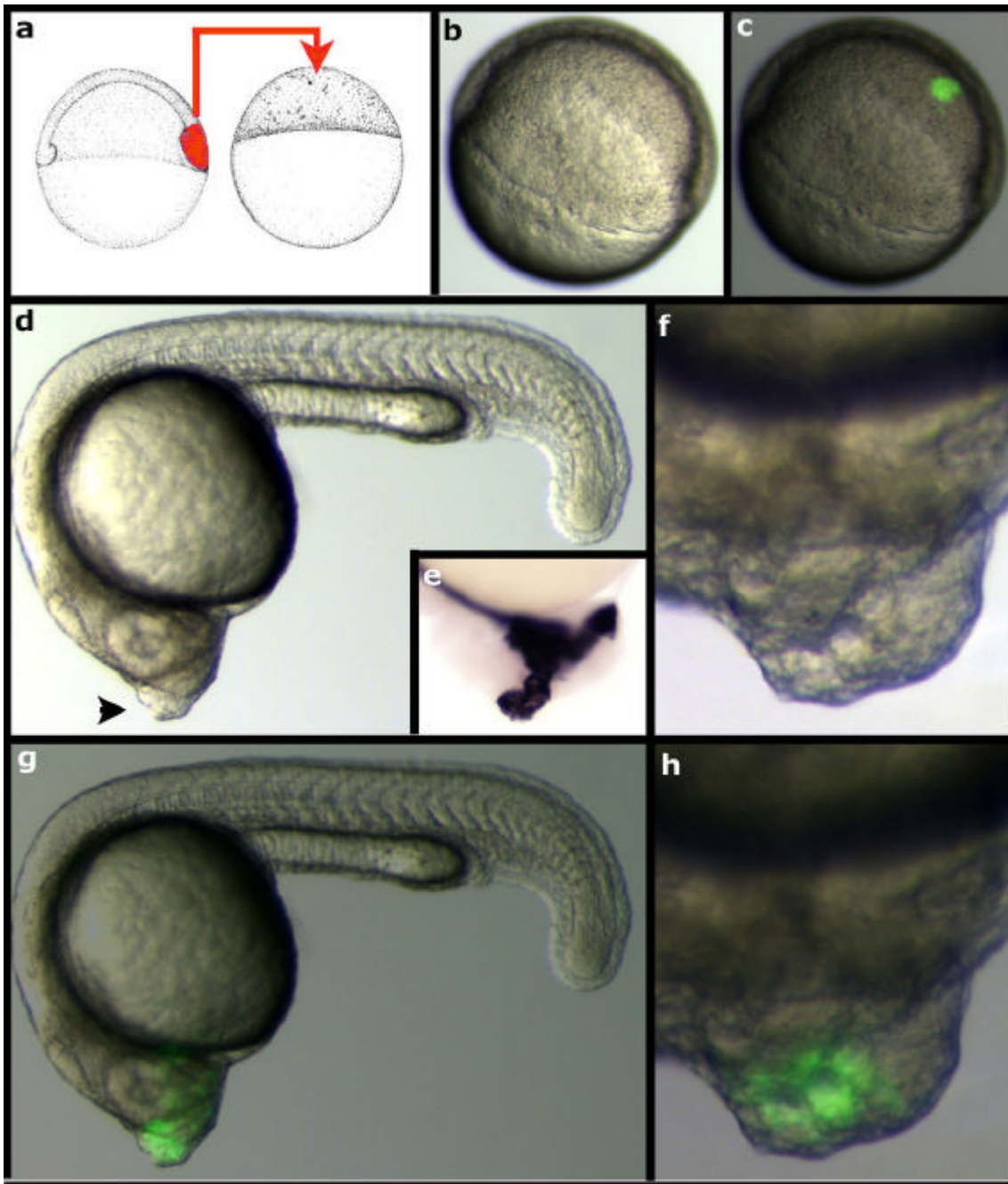
Afin de tester cette hypothèse, j'ai réalisé des séries de greffes homo et hétérochroniques en prélevant la marge ventrale d'un embryon donneur pour la greffer dans d'un embryon receveur (Fig.9a). Tous les greffons ont été transplantés au pôle animal de l'embryon receveur car ce territoire, qui constitue l'ectoderme présomptif, est celui qui se situe le plus loin de la marge endogène. En greffant au pôle animal, on peut limiter l'influence de signaux marginaux qui pourrait modifier la différenciation des cellules du greffon. Pour suivre le comportement des cellules greffées, les embryons donneurs ont été injectés avec de la fluorescéine (voir Matériel et Méthode).

La zone de prélèvement de la greffe a été définie selon les résultats de l'équipe de L. Solnica-Krezel qui a décrit que le bourgeon caudal postérieur se forme à partir de cellules marginales ventrales délimitées par un arc de cercle de 20 à 30° (Myers *et al*, 2002a). Les cellules transplantées ont été prélevées dans cette zone par aspiration (Fig.9a; voir Matériel et Méthodes). Le nombre de cellules transplantées est estimé entre 100 et 200 par greffe.

#### **II.3.a L'expérience initiale**

Dans l'expérience préliminaire, les embryons donneurs ont été prélevés en début de gastrulation (stade Shield, 6hpf) et les embryons receveurs en milieu de stade blastula (stade Sphère, 4hpf).

En cours de gastrulation, le greffon s'est bien intégré à l'ectoderme de l'embryon receveur et n'est pas distinguable du reste du tissu (Fig.9b,c). A 24h de développement, 66,1% (n=59) des embryons receveurs développent une queue ectopique qui s'insère au niveau de la tête et s'allonge ventralement vers le côté postérieur (Fig.9d). La structure induite est complètement organisée et présente des somites différenciés, un tube neural ainsi que de l'épiderme caudal (nageoire). Aucun tissu axial n'est observable (notochorde, plaque du plancher du tube



**III-Figure 10: Les cellules de la marge dorsale induisent la formation de structures axiales au pôle animal**

Les cellules de la marge dorsale ont été prélevées en début de gastrulation (6hpf) et greffées au pôle animal d'un embryon au stade Sphère (4hpf) (a). En cours de gastrulation, le greffon s'est bien intégré au pôle animal de l'embryon receveur mais rester très compact (b,c). A 24 de développement, le greffon forme une excroissance que au niveau du cerveau antérieur de l'embryon receveur (d,g). Les cellules de l'excroissance ont l'aspect de cellules de notochorde (f,h, flèche en f) et expriment le gène *shh* (e). Stades et orientation: b,c: début de gastrulation (7hpf), vue latéro-animale; d-h=24hpf, vues latérales, côté antérieur vers la gauche.

neural). Comme pour les embryons ventralisés ou issus des expériences d'extirpation, les somites des queues ectopiques adoptent une forme de "U", confirmant l'absence de structures axiales (Fig.9e). Alors qu'après 24h, la taille de la queue est similaire à celle de la queue endogène, après deux jours, la queue est beaucoup moins allongée (Fig.9j,k; comme pour les queues des embryons dont la charnière chordo-neurale a été extirpée).

La queue secondaire est composée de cellules positives et négatives pour la fluorescéine, indiquant que le greffon a recruté des cellules de l'hôte pour participer à la structure (Fig.9g). Les cellules du pôle animal de l'embryon receveur, qui contribuent normalement à la formation de l'ectoderme, participent aux tissus ectodermique et mésodermique de la queue ectopique.

Il est important de constater que la queue ectopique induite est complètement organisée et présente une polarité antéro-postérieure identique à celle de l'axe endogène et une polarité dorso-ventrale inverse.

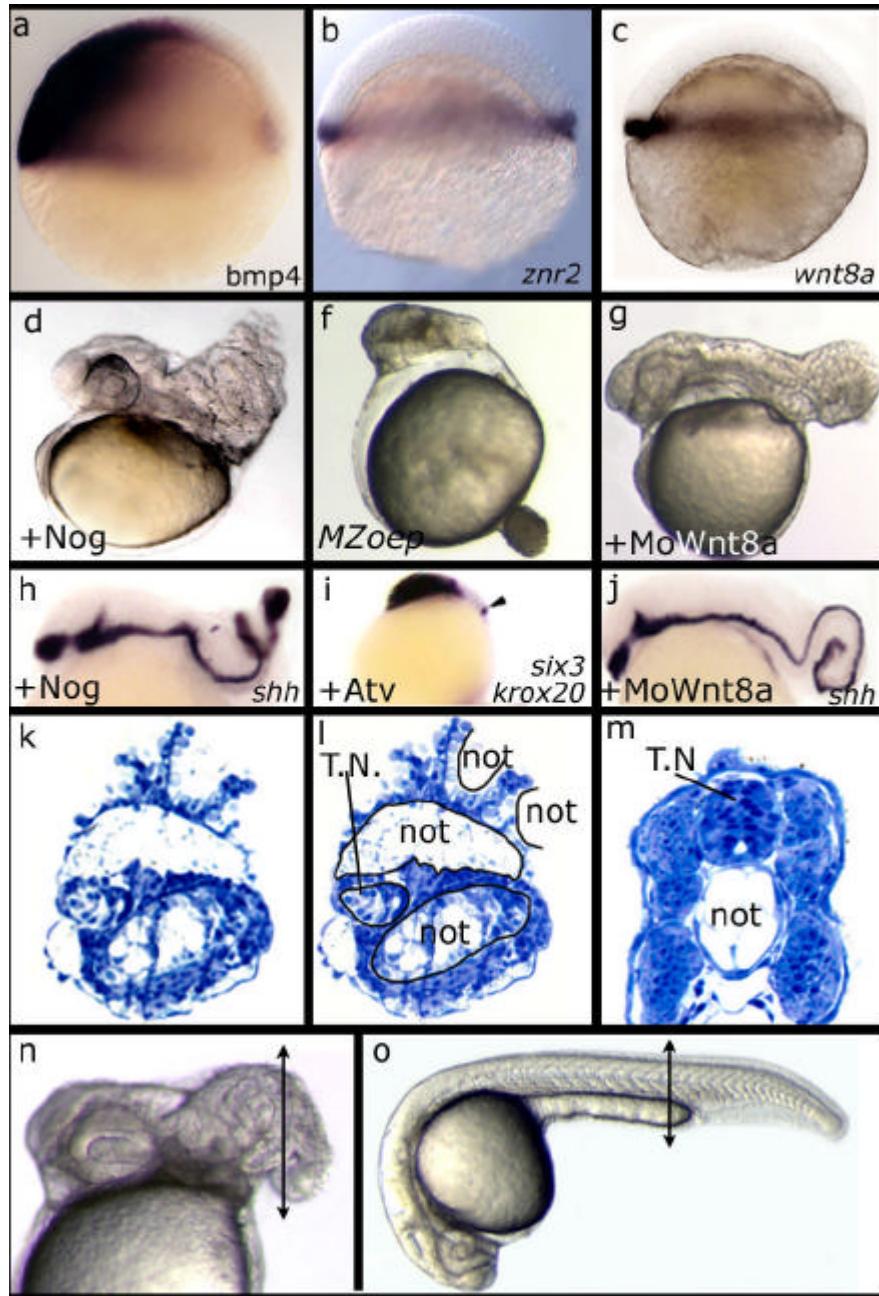
*Ainsi, les cellules de la marge ventrale d'un embryon en début de gastrulation peuvent induire la formation d'une queue ectopique bien organisée composée uniquement de tissus non-axiaux. Cette queue secondaire est composée de cellules du greffon et de l'hôte. Ainsi, conformément à la définition de Hans Spemann d'un centre organisateur, les cellules de la marge ventrale ont une capacité organisatrice des tissus non-axiaux de la queue. Par simplicité, les cellules de la marge ventrale seront par la suite appelées organisateur de la queue, même si les queues induites ne sont pas complètes.*

### **II.3.b Analyse de la composition des queues ectopiques**

Pour confirmer et compléter les observations sur les embryons vivants lors de la formation de queues ectopiques, j'ai réalisé une analyse des tissus induits avec différents marqueurs moléculaires par hybridation *in situ* après un jour de développement.

Les queues secondaires induites possèdent un tube neural et un territoire sanguin différenciés (Fig.9f; double marquage avec deux sondes dirigées respectivement contre les gènes *sox19* et *hemoglobin*). Par contre, la partie ventrale du tube neural, la notochorde ainsi que la charnière chordo-neurale sont absents (Fig.9h). Par ailleurs, on peut détecter l'expression de *eve1*, gène spécifique du bourgeon caudal non-axial (Fig.9i).

Ces données confirment que les queues induites sont composées exclusivement de tissus non-axiaux et sont correctement organisées et polarisées.



### III-Figure11: Les molécules candidates pour l'activité de l'organisateur de la queue

Les gènes *bmp* s'expriment dans la moitié ventrale de l'embryon en fin de stade blastula (a), les gènes nodal s'expriment dans toutes les cellules de la marge (b) et *wnt8a* s'exprime dans tout autour de la marge sauf au niveau dorsal (c). La perte de fonction de *bmp* (sur-expression de l'antagoniste Noggin - 5pg), des *nodal* (mutants *MZoep*) ou de *wnt8a* (25ng de morpholino dirigé contre *wnt8a*) conduit une absence de queue (d-g). Dans les embryons déficients pour la voie BMP ou pour *Wnt8a*, seules les structures axiales subsistent et expriment *shh* (h,j). En raison de l'absence de tissus non-axiaux, elles s'enroulent sur elles-mêmes. Une coupe transversale dans la partie postérieure de tels embryons (n) indique que les tissus postérieurs sont composés pratiquement que de cellules notochordales (comparer k,l et m). Dans les embryons déficients pour la voie Nodal, tous les tissus de la queue subsistent. Les embryons ne forment que les parties les plus antérieures du système nerveux comme le télencéphale (marqué par *six3*) ou le rhombencéphale (marqué par *krox20*) (i). Stades et orientations: a-c: fin de stade blastula (50% epibolie), vue latérale, côté dorsal à droite. d-j,n,o=24hpf, vues latérales, côté antérieur à gauche. k-m=coupes transversales (réalisées au niveau des flèches indiquées en n et o), côté dorsal vers le haut. Abréviations: t.n.= tube neural; not=notochorde.



### **II.3.c Evolution de l'activité de l'organisateur de la queue au cours du temps.**

Pour d'analyser le début de l'activité organisatrice de la marge ventrale, j'ai réalisé des transplantations à partir d'embryons d'âge variable (Sphère -> 100% épibolie) vers le pôle animal d'un embryon receveur au stade Sphère (blastula) et comparé la fréquence d'induction des queues ectopiques (Table1).

L'absence de visualisation morphologique du côté dorsal de l'embryon avant le début de la gastrulation m'a amené à utiliser deux colorants fluorescents (fluorescéine et rhodamine) afin de marquer chaque moitié de l'embryon et trier les embryons receveurs après la gastrulation (voir Matériel et Méthodes).

#### **II.3.c.1 La marge ventrale est active dès le stade Sphère jusqu'en fin de gastrulation, comme l'organisateur de Spemann**

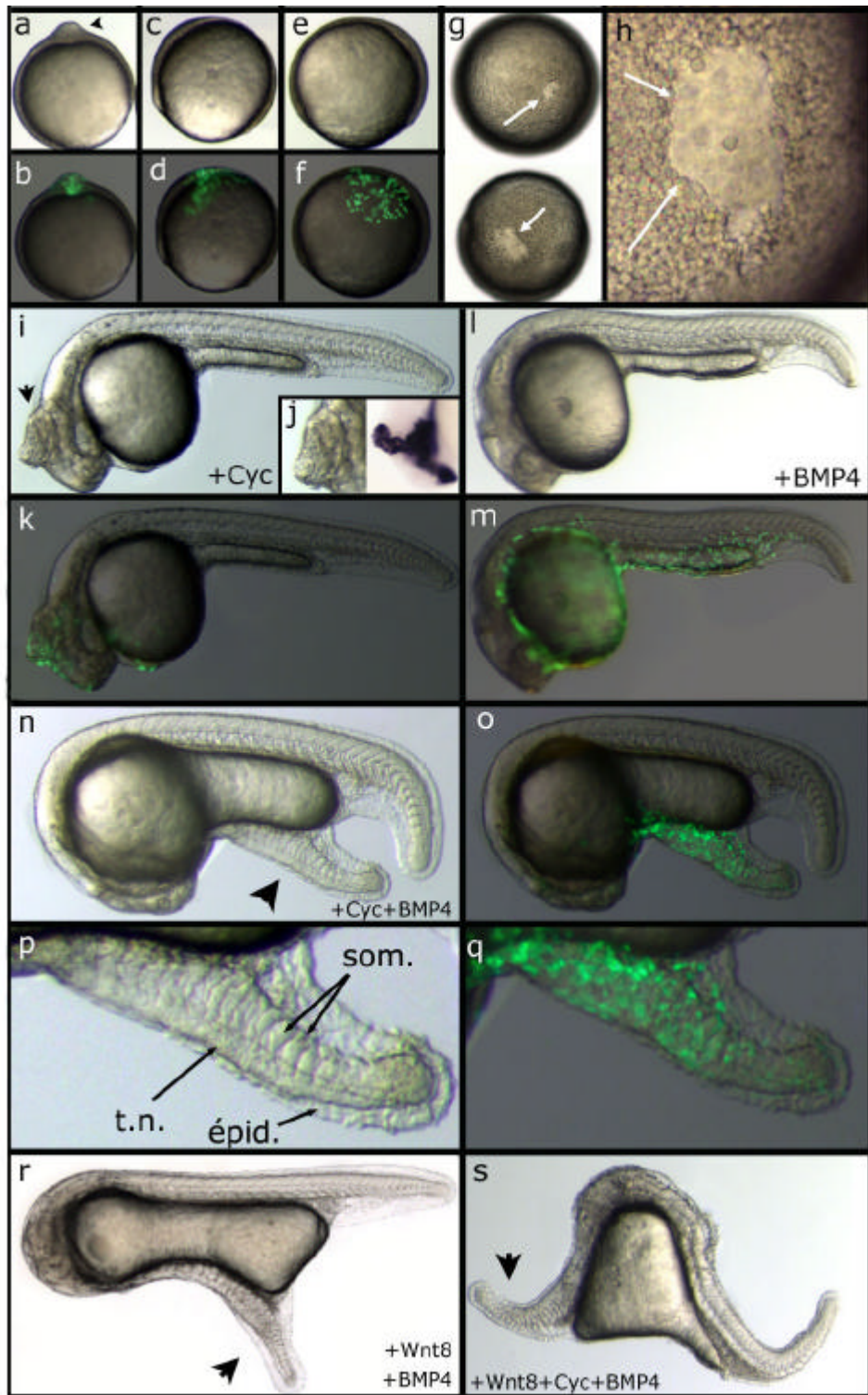
On remarque que la capacité organisatrice de la marge ventrale est détectée dès le stade Sphère (4hpf), c'est-à-dire peu de temps après le début de l'expression du génome zygotique ( $\approx$ 3hpf) (Table 1). Cette activité est maintenue pendant toute la gastrulation mais décroît au cours du temps (Table 1).

Il est important de noter qu'en plus de la fréquence, la "qualité" (taille, développement des tissus) des queues secondaires générées varie aussi au cours du temps. En effet, pour les transplants effectués à partir d'embryon aux stades Sphère et Shield, les queues secondaires sont bien développées et peuvent présenter un allongement similaire à la queue endogène. Pour les greffons prélevés plus tard (75% et 100% épibolie), les structures ectopiques induites sont plus courtes et la quantité de somites fortement diminuée. Les effets les plus faibles sont observés à 100% épibolie. Cependant je n'ai pas réalisé de quantification de ces différences.

*Ainsi l'organisateur de la queue se comporte comme l'organisateur dorsal de Spemann puisqu'il est actif dès le stade blastula jusqu'en fin de gastrulation. De même, son activité diminue avec le temps.*

#### **II.3.c.2 Aptitude de l'embryon receveur à recevoir le greffon**

Nous avons observé que les cellules de la marge ventrale ont une capacité organisatrice qui décroît au cours du temps. On peut se demander si la capacité organisatrice des cellules de la marge ventrale varie en fonction de l'âge de l'embryon receveur. Afin d'étudier ce paramètre, j'ai réalisé des transplantations isochroniques de marge ventrale d'embryons en début de gastrulation vers le pôle animal d'embryons en début de gastrulation (stade Shield).



**III-Figure 12: La sur-expression de Nodal/BMP, Wnt8/BMP ou Nodal/Wnt8/BMP mime l'activité de l'organisateur de la queue**

Alors que la sur-expression au pôle animal de Cyclops (15pg) induit la formation d'une excroissance (a,b), la sur-expression de BMP4 (250pg) ou de Cyc+BMP4 (15pg et 250pg) ne produit pas de changements morphologiques dans l'embryon injecté (c-f). En cours de gastrulation, l'observation du clone sur-exprimant Cyclops et BMP indique que les cellules créent une zone "d'échappement" au pôle animal (g,h). A 2'h de développement, la sur-expression de Cyclops induit la formation de cellules notochordales qui expriment *shh* (i-k). La sur-expression de BMP4 au pôle animal n'induit aucun changement morphologique visible (l-m). La double stimulation d'une cellule du pôle animal par Cyclops et BMP4 provoque la formation ventralement d'une queue ectopique semblable à celle obtenue après la greffe de marge ventrale (n,p). De même la structure induite est composée de cellules issues du clone injecté (cellules fluorescentes) et de cellules recrutées par le clone (o,q). La sur-expression au pôle animal de Wnt8 (100pg) et BMP4 (250pg) ou de Wnt8, Cyclops et BMP4 induit aussi la formation d'une queue ectopique (r,s). Orientations et stades: a-f= milieu de gastrulation (8hpf), vues latérales. g,h=Milieu de gastrulation vues animales. i-s=30hpf vues latérales, côté antérieur à gauche. Abréviations: t.n.=tube neural; som.=somites; épid.=épiderme caudal.

Après transplantation, seuls 20% des embryons (n=60) développent une queue ectopique. 58,3% (n=60) des embryons ne forment qu'une extension antérieure du système nerveux et possèdent des vésicules otiques ectopiques.

Cela suggère que la capacité de réponse des cellules du pôle animal à l'organisateur de la queue diminue avec le temps. Cela pourrait être expliqué par un état de détermination des cellules de plus en plus avancé au cours du développement. Cependant, il est possible que ce résultat provienne d'un biais technique. En effet, il semble que l'intégration du greffon soit moins bonne pour des embryons en cours de gastrulation, ce qui diminuerait l'efficacité d'induction du transplant.

### **II.3.d Localisation de l'organisateur**

Si les cellules greffées sont prélevées en dehors de l'arc de 20-30° situé le plus ventralement sur la marge, l'activité de l'organisateur de la queue décroît rapidement. Même si le tissu transplanté induit toujours des structures ectopiques avec un recrutement de cellules de l'hôte, la fréquence des queues ectopiques est très faible voire nulle (voir détail de ces expériences ci-après en section II.9). Cela suggère que l'organisateur de la queue possède une localisation très précise. Cependant, l'ablation des cellules de la marge depuis le stade Sphère jusqu'en fin de gastrulation ne perturbe jamais le développement des embryons. Dans tous les cas, la queue se développe correctement et se compose de tissus axiaux et non-axiaux (stade Sphère: 100% n=38; stade Shield: 100% n=59; 75% epibolie: 100% n=27; 100% epibolie: 100% n=28) . Ces données suggèrent que les cellules adjacentes peuvent régénérer l'activité de la marge ventrale.

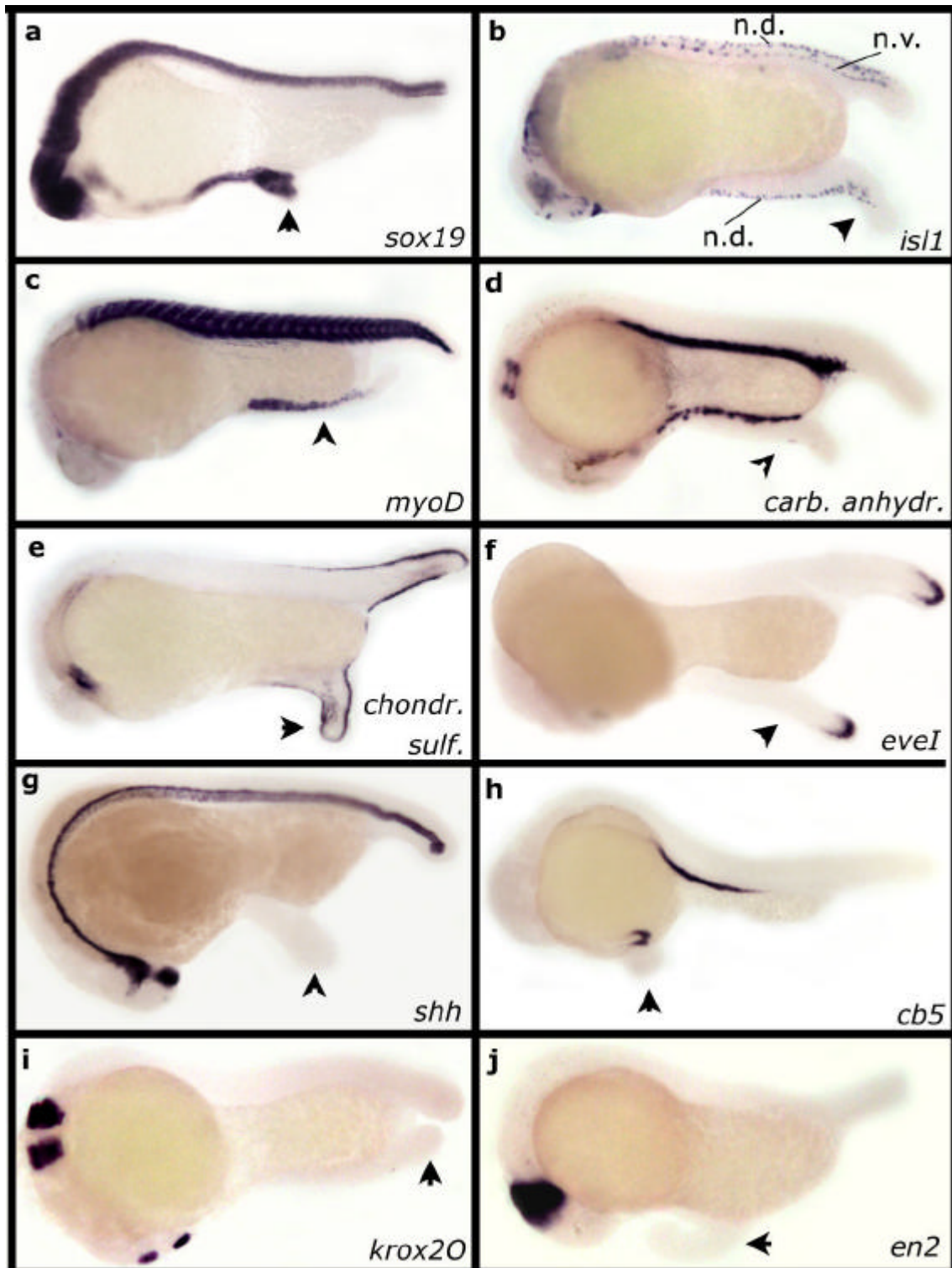
*Ainsi, même si la capacité organisatrice des cellules de la marge ventrale est très localisée, leur ablation n'abolit pas la formation des tissus non-axiaux suggérant que l'activité du centre organisateur est régénérée après ablation.*

### **II.3.e Comparaison avec l'activité de l'organisateur de Spemann**

Afin de comparer l'activité du centre organisateur de Spemann dans les mêmes conditions de transplantation, des cellules de la marge dorsale prélevées en début de gastrulation (Stade Shield) ont été greffées au pôle animal d'un embryon au stade Sphère (Fig.10a).

En cours de gastrulation, le clone s'est bien intégré à l'hôte. Cependant, les cellules greffées sont plus compactes qu'après la transplantation de cellules de marge ventrale (Fig.10b,c).

A 24h, 78,6% (n=42) des embryons transplantés développent une notochorde dans la tête (Fig.10d-h). La présence de cellules du tube neural ventral est aussi détectée grâce à



### III-Figure 13: Caractérisation des queues secondaires

L'analyse par hybridation in situ sur les queues ectopiques induites montre qu'elles sont composées d'un tube neural (marqué par *sox19* en a), mais dépourvues de neurones ventraux (marqués par *is11* en b). On peut détecter la présence aussi de muscles (marqués par *myoD* en c), de sang (marquée par l'anhydrase carbonique en d), d'une nageoire caudale (marquée par la chondroïtine sulfate en e), ainsi que des cellules les plus postérieures du bourgeon caudal (marquées par *eveI* en f). Les queues ectopiques sont dépourvues de structures axiales (marquées par *shh* en g). Occasionnellement, les queues induites présentent des tubes pronephriques (marqués par *cb5* en h) ou du rhombencéphale (marqué par *krox20* en i), mais jamais de mésencéphale postérieur (marqué par *en2* en j). Stades et orientations: tous les embryons sont à 24h de développement en vue latéral, côté antérieur vers la gauche. Abréviations: n.d.=neurones dorsaux; n.v.=neurones ventraux.

l'expression ectopique du gène *twhh*, spécifique des cellules de la plaque du plancher du tube neural (non montré).

Ainsi, l'activité de la marge dorsale est conservée au pôle animal et toujours complémentaire à celle de la marge ventrale, puisqu'elle produit des tissus axiaux.

## **II.4 Caractérisation moléculaire de l'organisateur de la queue**

Les bases moléculaires de l'activité de l'organisateur de Spemann ont été étudiées en détail et bien analysées dans tous les organismes modèles. Afin d'essayer d'identifier les gènes impliqués dans l'activité de l'organisateur de la queue, j'ai réalisé des expériences de sur-expression localisée de différentes molécules candidates seules et en combinaison.

### **II.4.a Molécules candidates**

Plusieurs gènes codant pour des facteurs de croissance impliqués dans le développement précoce sont de bons candidats pour être à l'origine de l'activité de la marge ventrale, sur la base de leurs territoires d'expression et de leurs pertes de fonction.

#### **II.4.a.1 Expression précoce à la marge ventrale**

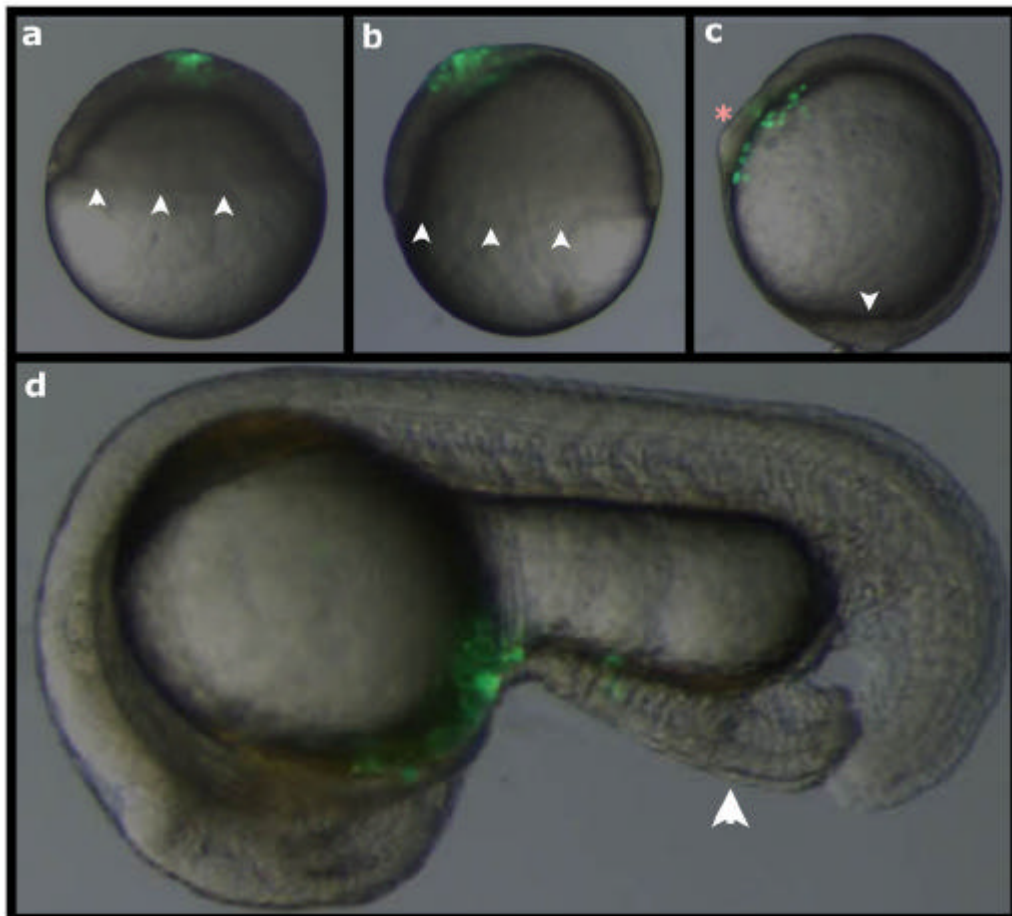
Nous recherchons des gènes exprimés à la marge ventrale dès le stade blastula, coïncidant avec le début de l'activité de l'organisateur de la queue.

C'est le cas des gènes codant pour les facteurs de croissance BMP2b, BMP7, Wnt8a, Cyclops/ZNR1 et Squint/ZNR2 (Fig.11a-c). Tous ces gènes sont donc co-exprimés dans les cellules de la marge ventrale et codent pour des molécules impliquées dans la mise en place des axes embryonnaires au cours du développement précoce.

#### **II.4.a.2 Perte de fonction**

Comme nous l'avons déjà décrit précédemment, la perte de fonction de ces gènes ou l'inhibition de leur activité par utilisation d'antagoniste spécifique conduit à une absence totale de queue (perte de signalisation Nodal) ou des structures non-axiales (perte de Wnt8a et de la signalisation BMP). Nous avons réalisé une hybridation *in situ* avec le marqueur axial *shh* ainsi que des sections semi-fines d'embryons dépourvus d'activité Wnt8a et BMP afin de vérifier que postérieurement, il ne reste plus que de la notochorde. L'ensemble de ces phénotypes est récapitulé en Fig.11.

Par conséquent, puisque les gènes *bmp*, *wnt8* et *nodal* sont tous exprimés dans les cellules de la marge ventrale dès le stade Sphère et que leur perte de fonction abolit complètement la



**III-Figures 14: Le développement d'une queue secondaire au pôle animal se fait loin de marge**

Après l'injection dans un blastomères au stade 128cellules des ARNm codant pour Cyclops et BMP4, les cellules restent localisée au pôle animal pendant toute la gastrulation (a,b) et restent loin de la marge (triangles blancs en a,b). En début de somitogenèse, les cellules commencent à former une structure qui s'allonge depuis la tête, loin du bourgeon caudal endogène (triangle blanc en c). A 24h de développement, les embryons forment une queue secondaire (d). Stades et orientations: a:fin de stade blastula, vue latérale. b: début de gastrulation (60% epibolie, 7hpf), vue latérale. c:début de somitogenèse (11hpf), vue latérale, côté dorsal à droite; d=24hpf, vue latérale, côté antérieur à gauche.

formation des tissus non-axiaux de la queue, suggérant que ces facteurs peuvent être impliqués dans l'activité organisatrice des cellules de la marge ventrale.

#### **II.4.b La sur-expression de BMP/nodal, BMP/Wnt8a et BMP/Nodal et Wnt8a mime l'activité de l'organisateur de la queue.**

Puisque les cellules de la marge ventrale expriment dès le stade Sphère les gènes codant pour les facteurs de croissance de type BMP, Nodal et Wnt8a, il est possible que ces molécules soient responsables de l'activité du centre organisateur de la queue.

Pour tester cette hypothèse, j'ai injecté l'ARNm codant pour de ces facteurs de croissance, seuls et en combinaison, dans un blastomère du pôle animal au stade 128-cellules, territoire ciblé lors des greffes de marge ventrale (Voir matériel et Méthodes). L'ARN codant pour la GFP (100pg) a été co-injecté pour suivre le comportement des cellules injectées.

##### **II.4.b.1 Recrutement des cellules de l'hôte**

En milieu de gastrulation, alors que l'injection localisée de l'ARNm codant pour Cyclops (15pg) induit la formation d'une excroissance au pôle animal (Fig.12a,b; Thisse *et al*, 2000), les embryons sur-exprimant à la fois BMP4 (250pg) et Cyclops (15pg) ne sont pas distinguables des embryons sauvages ou injectés avec l'ARNm codant pour BMP4 (250pg) (Fig.12c-f). Les cellules stimulées par Cyc et BMP4 adoptent des mouvements cellulaires anormaux. Elles semblent "fuir" la zone stimulée (contrairement aux cellules sur-exprimant Cyclops qui s'agrègent les unes sur les autres) laissant une zone dépourvue de cellules au centre du clone (Fig.12g,h). Ces résultats montrent que la sur-expression de Cyc ou de Cyc et BMP4 change les mouvements des cellules du pôle animal mais de deux manières distinctes.

A 24h de développement, l'injection localisée de l'ARNm codant pour BMP4 (250pg) ne produit aucun phénotype (n=43) (Fig.12l,m). Conformément à ce qui a été déjà décrit, la sur-expression de Cyclops/ZNR1 (15pg) induit la formation de structures axiales ectopiques au niveau de la tête (97,4%, n=39; Thisse *et al*, 2000), similaires à celles obtenues après greffe de marge dorsale (Fig.12i,j,k). Par contre, la double injection des ARNm codant pour BMP4 (250pg) et Cyclops (15pg) dans un blastomère du pôle animal induit la formation d'une queue ectopique secondaire, semblable à celle obtenue après transplantation de marge ventrale (58,8%, n=145) (Fig.12n-q). Les mêmes résultats ont été obtenus avec les ligands BMP2b (250pg d'ARN) et BMP7 (600pg d'ARN) d'une part, et Squint (1pg d'ARN) et Activin (1pg d'ARN) d'autre part. Par ailleurs, la sur-expression de Wnt8a (100pg d'ARN) et BMP4 (250pg d'ARN) ou de Wnt8a, BMP4 et Cyclops (100pg, 250pg et 15pg respectivement), dans les

Ligands		PHENOTYPES					
		GASTRULA		24h - morphologie		24h - Hybridation <i>in situ</i>	
<i>bmp4</i> (pg)	<i>cyclops</i> (pg)	<i>wnt8a</i> (pg)	<i>eveI</i> (1) (%)	Queue ectopique (2) (%)	Corrélation (3) (%)	<i>myoD</i> (4) (%)	<i>anhydrase carbonique</i> (%)
-	15	-	n.d.	0 (n=39)	0,0 (n=39)	n.d.	n.d.
10	5	-	96.7 (n=61)	49.9 (n=115)	51,6 (n=115)	100 (n=34)	31 (n=53)
10	15	-	90.7 (n=54)	29 (n=127)	31,9 (n=127)	100 (n=40)	33.3 (n=50)
10	45	-	75.5 (n=53)	18.5 (n=148)	24,5 (n=148)	100 (n=38)	25 (n=63)
50	5	-	91.7 (n=60)	53.6 (n=144)	58,5 (n=144)	100 (n=48)	84.2 (n=62)
50	15	-	100 (n=66)	48.3 (n=147)	48,3 (n=147)	100 (n=49)	39.1 (n=51)
50	45	-	96.8 (n=94)	47.1 (n=82)	48,6 (n=82)	100 (n=34)	14.3 (n=27)
-	-	100	0 (n=29)	0 (n=113)	0,0 (n=113)	n.d.	n.d.
50	-	100	100 (n=34)	53.9 (n=76)	53,9 (n=76)	93.5 (n=31)	90 (n=10)
250	-	-	0 (n=23)	0 (n=43)	0,0 (n=43)	n.d.	n.d.
250	5	-	100 (n=65)	51.6 (n=70)	51,6 (n=70)	100 (n=14)	36.4 (n=36)
250	15	-	98.4 (n=64)	58.8 (n=145)	59,8 (n=145)	100 (n=53)	76.9 (n=48)
250	45	-	100 (n=81)	54 (n=145)	54,0 (n=145)	100 (n=38)	25 (n=67)
250	-	100	100 (n=40)	56 (n=89)	56,0 (n=89)	95.2 (n=21)	86.4 (n=22)
250	15	100	100 (n=49)	42.4 (n=144)	42,4 (n=144)	100 (n=16)	85.7 (n=14)
				*76.3 (n=80)	76,3 (n=80)		

**III-Table 2: Comparaison des capacités inductrices de queues ectopiques des ligands Bmp4, Cyclops et Wnt8a.**

Chaque série d'embryons sur-exprimant une combinaison de ligands au pôle animal a été divisée en trois groupes équivalents. (1) Un tiers des embryons injectés ont été fixés en milieu de gastrulation pour analyser par hybridation *in situ* l'expression ectopique de *eveI* (colonne 1). (2): Les deux tiers des embryons restants ont grandi jusqu'à 24hpf et observés en morphologie afin de noter le nombre de queue ectopiques induites (colonne 2). (3) Le facteur de corrélation correspond à la fréquence d'embryons développant une queue ectopique à 24hpf après avoir exprimé *eveI* en cours de gastrulation. Puisque l'on ne peut tester l'expression de *eveI* en gastrulation et observer le développement d'une queue ectopique sur le même embryon, ce facteur de corrélation a été calculé avec le nombre d'embryons développant effectivement une queue ectopique à 24hpf et le nombre supposé d'embryons qui auraient exprimé *eveI* de manière ectopique en gastrula. (4) Tous les embryons présentant des queues ectopiques à 24h ont été fixés pour être analysés par hybridation *in situ* avec les marqueurs *myoD* (pour la présence de somites - colonne 4) et *anhydrase carbonique* (pour la présence de sang - colonne 5). \*: Pour la combinaison Bmp4 -250pg, Cyclops -15pg et Wnt8a - 100pg, une grande partie de la population présente des malformations sévères empêchant toute interprétations morphologiques (64/144). Ces embryons ont donc été soustraits des comptes et les pourcentages recalculés. Tous les chiffres sont des pourcentages.



mêmes conditions, conduit aussi au développement de queues ectopiques (56%, n=89 et 42,4, n=144 respectivement; Fig.12r,s) .

Dans tous les cas, la queue induite est composée de cellules positives pour la GFP (descendant du clone injecté) et négatives (recrutées au sein du pôle animal)(Fig.12o,q).

#### **II.4.b.2 Queue dépourvues de structures axiales**

La composition histologique des queues ectopiques a été analysée par hybridation *in situ*.

Les tissus induits possèdent un tube neural contenant les neurones dorsaux, des muscles et du sang différenciés ainsi que de l'épiderme caudal (Fig.13a-e). Les cellules les plus postérieures de la queue sont positives pour *eveI*, marqueur des structures non-axiales en cours de différenciation (Fig.13f). Aucun tissu axial n'est détecté (Fig.13g), et en conséquence, les neurones ventraux ne se différencient pas (Fig.13b).

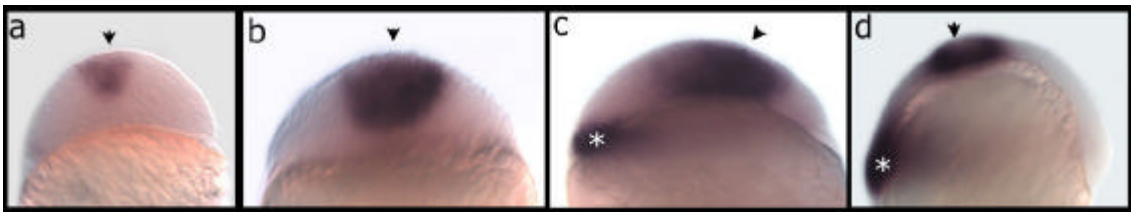
*Ainsi la sur-expression de Nodal et BMP, Wnt8a et BMP ou Wnt8a, Nodal et BMP mime l'activité de l'organisateur de la queue.*

#### **II.4.b.3 Limite antérieure des structures induites**

L'observation des queues ectopiques induites suggère qu'elles sont aussi composées de tissus plus antérieurs de type tronc ou même de cerveau postérieur.

Afin d'analyser la présence de tronc, j'ai testé l'induction des gènes *cb5* et *pax2.1*, exprimés au niveau du pronephros, tissu restreint à la région du tronc (les tube pronephriques s'arrêtant au niveau de l'anus). Après injection localisée des mêmes quantités d'ARNm codant pour Cyclops et BMP4, l'expression de *cb5* et *pax2.1* est induite de manière ectopique dans 24% (n=25) et 21,4% (n=28) respectivement (Fig.13h). Cela contraste avec le fort taux d'induction des gènes *anhydrase carbonique* (76,9%, n=48) et *eveI* (82,1%, n=39) exprimés dans les tissus plus postérieurs. Pour observer la limite antérieure des structures induites, j'ai testé l'expression de gènes spécifiques *en2* et *krox20* qui indiquent des frontières claires au sein du système nerveux central. *en2* est exprimés dans le mésencéphale postérieur et le rhombencéphale antérieur (rhombomère1). *krox20* est transcrit dans les rhombomères 3 et 5. *krox20* est induit dans 25,9% des cas (n=110) après sur-expression de BMP4 et Cyclops (Fig.13i). Par contre, l'expression ectopique de *en2* n'est pratiquement jamais observée (8%, n=25; Fig.13j).

*De l'ensemble de ces données, nous pouvons conclure que la sur-expression de BMP et Nodal induit la formation d'une queue secondaire dépourvue de tissus axiaux. Occasionnellement, la structure ectopique peut s'étendre dans le tronc et jusqu'au cerveau postérieur. Les territoires*



**III-Figure 15: La sur-expression de Nodal et BMP induit l'expression de *eve* dès le stade Sphère**

La sur-expression de Cyclops (15pg) et BMP4 (250pg) au pôle animal induit l'expression ectopique de *eve* dès le stade High (3hpf) (flèche en a-d), avant que l'expression endogène de *eve* soit détectée (étoile blanche en c et d). Cette induction est maintenue pendant tout le stade blastula et la gastrulation (b-d). Stades et orientations: a: high (3hpf), vue latérale; b: sphère (4hpf), vue latérale; 30% epibolie (5hpf), vue latérale; Shield (6hpf), vue latérale, côté dorsal à droite.

les plus antérieurs (après la frontière rhombencéphale - mésencéphale) ne sont jamais induits.

#### **II.4.c Développement des queues ectopiques à partir de cellules du pôle animal**

Etant donné que la marge de l'embryon est le lieu de localisation des organisateurs dorsal et ventral, il est important de vérifier que les cellules de la marge ne participent pas au développement des structures ectopiques. Pour tester cela, j'ai sur-exprimé Cyclops et BMP4 au pôle animal avec de la GFP et suivi le comportement des cellules au cours de la gastrulation. Les photos ont été prises à trois stades: début, milieu et fin de gastrulation. On peut remarquer que les cellules positives pour la GFP restent localisées au pôle animal. Les premières excroissances sont visibles dès la fin de la gastrulation (Fig.14a-c) et se situent loin de l'extrémité postérieure de l'embryon. On remarque déjà à ce stade que des cellules de l'ectoderme participent à la structure ectopique (Fig.14c).

Ainsi les cellules stimulées par BMP et Nodal se différencient en queue secondaire loin des cellules de la marge, sans participation physique de ces dernières.

#### **II.4.d. Quantification des effets**

Afin de déterminer les conditions optimales requises pour induire une queue ectopique avec les ligands utilisés, j'ai réalisé des séries d'injections en faisant varier la quantité d'ARN injecté.

La quantification a été analysée selon quatre critères différents et complémentaires:

(1) - la fréquence d'induction du marqueur *eveI* en milieu de gastrulation (Table2, colonne 1).

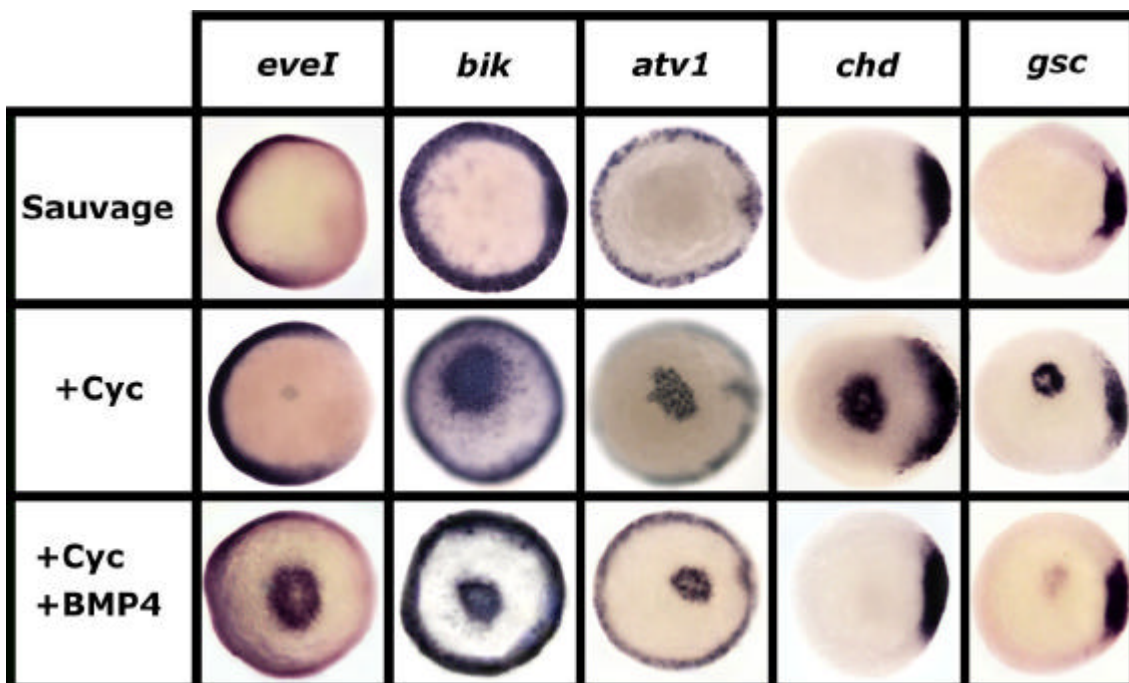
Dans un embryon sauvage, le gène *eveI* en gastrula s'exprime exclusivement dans les cellules du bourgeon caudal postérieur. Son expression ectopique au pôle animal en gastrula permet ainsi de détecter l'induction de ce tissu.

(2) - la fréquence d'induction de queue ectopique à 24h (Table2, colonne 2).

Cette quantification permet d'estimer le pourcentage des embryons qui développent une queue ectopique après induction de *eveI* au pôle animal pendant la gastrulation (colonne 3). Cela indique la capacité des cellules du bourgeon caudal induites dans l'ectoderme à se développer en tissu postérieur.

(3) - La fréquence d'induction de tissu somitique à 24h (expression du gène *myoD*; Table2, colonne 4).

La présence de somites dans la queue ectopique indique la capacité du bourgeon caudal à former du mésoderme para-axial.



**III-Figure 16: Les voies BMP et Nodal sont toujours actives au pôle animal dans les cellules sur-exprimant Nodal et BMP**

La sur-expression localisée au pôle animal de Cyclops seul (15pg) induit l'expression ectopique des gènes cibles *bikihari* (*bik*) et *antivin1* (*atv1*), ainsi que celles de *chordin* (*chd*) et *goosecoid* (*gsc*). L'expression de *eveI* n'est pas détectée. La sur-expression de Cyclops (15pg) et de BMP4 (250pg) au pôle animal induit fortement l'expression de *eveI* ainsi que celle de *bik* et *atv1*. Les gènes *gsc* et *chd* ne sont plus induits. Orientations et stades: Tous les embryons sont en début de gastrulation (6hpf) en vue animale, côté dorsal à droite.

(4) - La fréquence d'induction de tissu sanguin à 24h (expression de *l'anhydrase carbonique*; Table2 colonne 5).

La présence de tissu sanguin indique la présence d'un tissu postérieur, absent dans le tronc.

L'ensemble de ces critères permet d'évaluer l'efficacité d'induction de queue ectopique des différentes combinaisons de ligands testées.

Les résultats des co-injections sont présentés en Table2. Tous les pourcentages présentés ont été réalisés à partir d'au moins deux expériences indépendantes réunies. Pour chaque série d'embryons injectés, un tiers des individus ont été fixés en milieu de gastrulation pour tester l'expression du gène *eveI*. Les deux tiers des embryons restants ont été observés pour comptabiliser les queues ectopiques, puis fixés.

(1) On remarque que dans toutes les combinaisons testées (sauf quand la quantité de Nodal est trop forte par rapport à celle de BMP), l'expression de *eveI* au pôle animal est induite dans plus de 90% des cas.

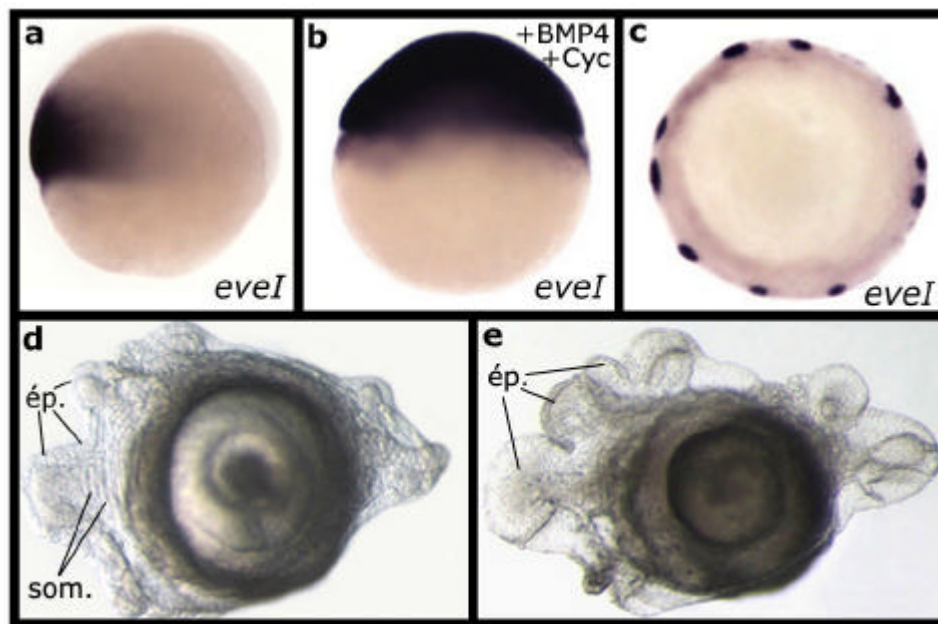
(2) La fréquence d'induction de queues ectopiques est au-dessus de 50% pour les toutes les co-injections avec Wn8 et BMP4 (double et triple) et quand la quantité de BMP4 utilisée dépasse de 10 fois celle de Nodal. Ce résultat est confirmé après analyse de la corrélation entre le nombre de queues ectopiques induites et la fréquence d'induction de *eveI* en milieu de gastrulation.

Dans les triples injections BMP4/Wnt8a/Cyclops, 64/144 embryons sont complètement malformés et adoptent une forme de "boule", qui empêche toute interprétation morphologique. Ceci est certainement dû à la trop forte stimulation de l'embryon par les trois facteurs de croissance. Puisqu'on ne peut réaliser d'analyse morphologique sur ces embryons, ils ont été retirés des statistiques. Ainsi après la triple injection, 76,3% (n=80) des embryons développent une queue ectopique.

(3) Dans les queues secondaires, le gène *myoD* est induit pratiquement dans tous les cas.

(4) Les résultats d'induction du territoire sanguin indiquent que les territoires les plus postérieurs sont fortement induits après les doubles et triples injections avec Wnt8a et lorsque la quantité de BMP4 est en excès par rapport à celle de Cyclops. Cela confirme les résultats obtenus précédemment.

*De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons donc conclure que le développement des queues ectopiques est favorisé lorsqu'une forte quantité d'ARNm codant pour BMP4 est utilisée, et surtout après la triple stimulation Wnt8a/BMP4/Cyclops.*



**III-Figure 17: La sur-expression généralisée de BMP et Nodal postérionise tout l'embryon.**

La sur-expression généralisée de Cyclops et BMP4 induit l'expression de *eveI* dans toutes les cellules de l'embryon (a,b). A 24 de développement, uniquement quelques groupes de cellules expriment le gène *eveI* suggérant qu'il existe de multiples bourgeons caudaux tout autour de l'embryon (c). Dans de rares cas, les embryons développent de nombreuses expansions comprenant des muscles et de l'épiderme caudal, indiquant leur nature caudale (d,e). Stades et orientations: a,b= Début de gastrulation (6hpf), vues latérales, côté dorsal à droite. c,d= 24hpf; e=48hpf. Abréviations: som=somites, ép= épiderme caudal.

#### **II.4.e Induction précoce de *eveI***

Le gène *eveI* est exprimé dans les cellules de la marge ventrale dès le stade Sphère (4hpf). Seuls quelques blastomères expriment ce gène et aucun signal n'est détecté dans la couche vitelline syncytiale ventrale (Joly *et al*, 1993). Progressivement, l'expression de *eveI* s'étend dans toutes les cellules de la marge à l'exception de la partie la plus dorsale, et ce jusqu'en fin de gastrulation. L'intensité d'expression semble être maximale à la marge ventrale et décroître en direction du côté dorsal. En fin de gastrulation, l'expression de *eveI* est restreinte au bourgeon caudal postérieur. Ainsi *eveI* est le gène spécifique du bourgeon caudal postérieur qui s'exprime le plus précocement. L'induction de *eveI* correspond donc à l'induction d'une identité de bourgeon caudal postérieur.

Pour tester à partir de quel stade *eveI* est induit dans les cellules du pôle animal lors d'expériences d'induction de queue ectopique, j'ai injecté les ARN codant pour BMP4 et Cyclops dans une cellule du pôle animal au stade 128 cellules et analysé l'expression de *eveI* par hybridation *in situ* à différents stades.

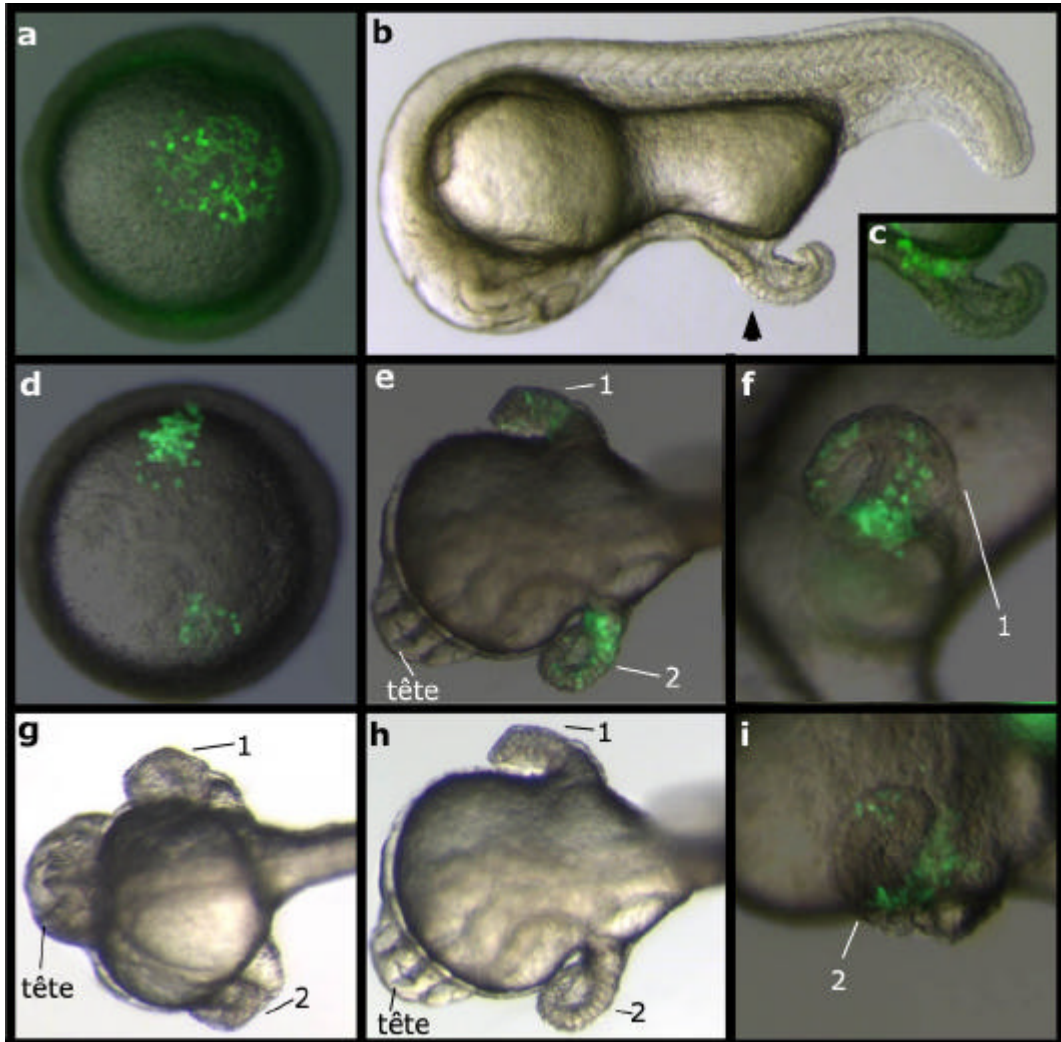
Après injection, une expression ectopique de *eveI* est détectée dès 3h20pf (stade High), c'est-à-dire juste après le début de l'expression du génome zygotique (Fig.15a). A ce stade *eveI* n'est pas détecté dans les embryons sauvages, ni à la marge ventrale des individus injectés. Cette induction ectopique est maintenue au pôle animal pendant toute la gastrulation (Fig.15b-d). Ce résultat indique que les cellules du pôle animal sont conduites très précocement vers un devenir caudal.

#### **II.4.f Interaction de la voie Nodal et BMP**

Plusieurs études indépendantes ont décrit que les voies de signalisation Activin/Nodal et BMP pouvaient interagir entre elles au niveau du recrutement du facteur commun Smad4 (Candia *et al*, 1997) ainsi qu'au niveau des ligands eux-mêmes (Yeo et Whitman, 2001). Ainsi dans les cellules sur-expriment Nodal et BMP, on peut se demander si les deux voies de signalisation sont toujours actives.

Nous avons observé que la sur-expression de BMP4 et Cyclops induit fortement l'expression de *eveI*, alors que la simple sur-expression de Cyclops (15pg d'ARN injecté) ne le fait jamais (Fig.16). Ainsi, puisque le gène *eveI* est exprimé normalement dans les cellules de la marge ventrale, lieu de forte signalisation BMP, on peut en conclure que dans des cellules stimulées par Nodal et BMP, la signalisation BMP fonctionne.

Pour tester l'activité de la signalisation Nodal, j'ai analysé l'induction des gènes cibles *atv1* et *bikihari* (*bik*) après simple sur-expression au pôle animal de Cyclops seul ou avec BMP4



**III-Figure 18: Le développement d'une queue ectopique ne nécessite qu'un nombre limité de cellules**

L'injection de Cyclops et BMP4 dans deux blastomères distincts du pôle animal au stade 256-cellules conduit, dans la majorité des cas, au rapprochement des deux clones en cours de gastrulation (a) et à la formation d'une queue ectopique à 24hpf (b,c). Cependant, parfois les clones restent séparés (d) ce qui conduit à la formation de deux queues ectopiques (1 et 2 en e-i). Les deux structures induites sont composées de cellules descendant du clone injecté (fluorescente) et de cellules recrutées (f,i). Stades et orientations: a,d= Milieu de gastrulation (8hpf), vue animale. b-e-i: 24hpf, vues dorsales, antérieures vers la gauche.



(Vogel et Gerster, 1999). La simple sur-expression de Cyclops (15pg d'ARNm) induit fortement l'expression de *bik* et *atv1* au pôle animal dans tous les cas (n=9 et n=15). La sur-expression de BMP4 seul au pôle animal n'induit jamais ces gènes (n=8). On peut détecter l'expression ectopique au pôle animal de *atv1* et *bik* dans 100% des cas (n=30 et n=32) chez les embryons sur-exprimant BMP4 et Nodal (Fig.16).

*Ainsi dans les cellules sur-exprimant Cyclops et BMP4, les deux voies de signalisation sont actives.*

#### **II.4.g Sur-expression généralisée de BMP et Nodal**

Nous avons observé que la stimulation d'une cellule de l'ectoderme par Nodal et BMP conduisait à la formation de structures postérieures ectopiques. Afin de tester si la sur-expression de BMP et Nodal peut postérioriser toutes les cellules de l'embryon, j'ai injecté les ARNm codant pour Cyclops (15pg) et BMP4 (250pg) au stade 2 cellules.

En cours de gastrulation, tous les embryons injectés expriment le gène *eveI* dans toutes les cellules (100%, n=36; Fig.17a,b).

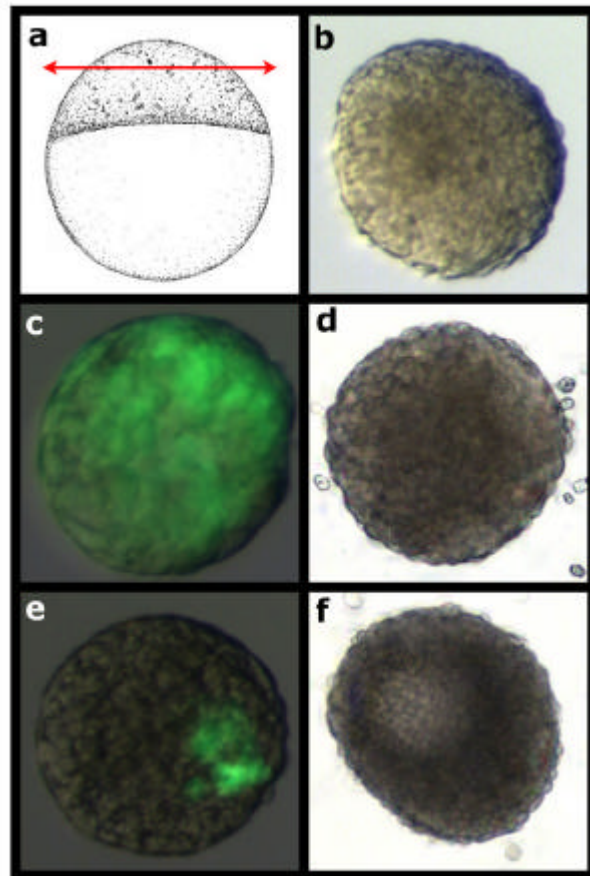
A 24h, une grande partie des embryons ne survivent pas. Une très faible proportion des survivants développe tout autour de la marge des expansions de type bourgeon caudal, avec des somites et des nageoires différenciées (1,1%, n=812; Fig.17d,e). Toutes ces excroissances expriment le gène *eveI* indiquant qu'elles sont de nature caudale (Fig.17c). Aucun tissu axial n'est détecté.

*Ainsi la sur-expression généralisée de BMP4 et Cyclops peut induire une information postérieure dans toutes les cellules de l'embryon qui semble former une queue unique avec de nombreux replis.*

#### **II.5 Les contraintes au développement d'une queue secondaire**

##### **II.5.a Création de deux clones sur-exprimant Nodal et BMP**

Nous avons observé que l'injection des ARNm codant pour Cyclops et BMP4 dans un blastomère du pôle animal au stade 128-cellules suffisait pour induire une queue ectopique complètement organisée. On peut se demander à partir de combien de cellules du pôle animal une queue secondaire peut se développer. Afin d'aborder cette question, j'ai co-injecté au pôle animal les ARNm codant pour BMP4 et Cyclops dans deux blastomères distincts au stade 256 cellules. Pendant la gastrulation, certains clones restent bien séparés, tandis que d'autres fusionnent (Fig.18a,d). Alors que 9,3% des embryons (n=64) développent une queue secondaire unique après la double injection (Fig.18b,c), dans 23,4% des cas, on peut observer



**III-Figure 19: Des explants d'ectoderme en culture sur-exprimant BMP et Nodal ne peuvent pas former de queue.**

Les explants d'ectoderme prélevés au stade sphère (a - 4hpf) ne présentent pas de morphogenèse après un jour en culture (b). De même, les explants d'ectoderme prélevés sur des embryons sur-exprimant Cyclops (15pg) et BMP4 (250pg) dans toutes les cellules (c), ou dans quelques cellules (e) ne forment aucune structure à 24hpf (d,e).

deux queues ectopiques dépourvues de structures axiales (Fig.18e-i). Ces embryons possèdent donc trois structures postérieures distinctes.

Ainsi même si les deux clones sur-exprimant BMP et Nodal sont proches, ils peuvent développer deux bourgeons caudaux postérieurs indépendants qui donnent naissance à deux queues ectopiques séparées. Cela indique que le nombre de cellules requises initialement pour la formation d'un bourgeon caudal est relativement limité.

### **II.5.b Culture d'ectoderme**

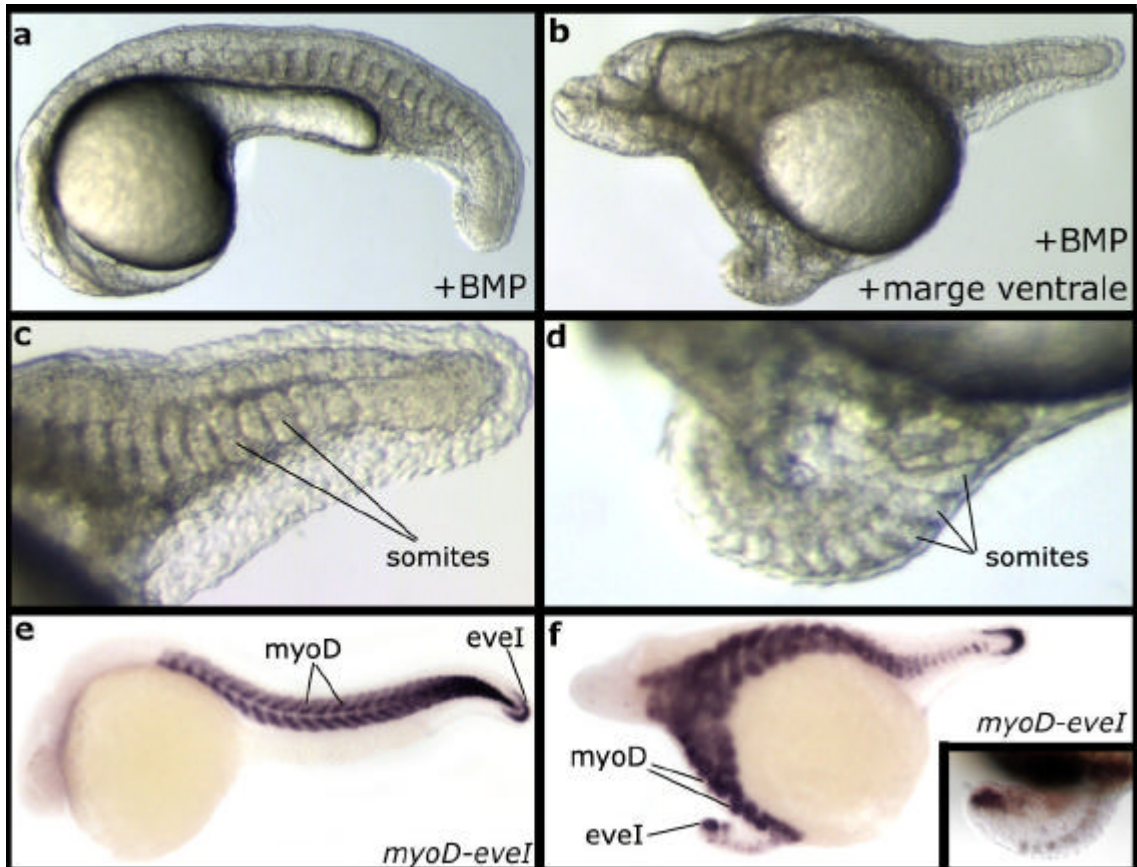
Puisque seul un petit nombre de cellules sur-exprimant BMP et Nodal est suffisant pour induire la formation d'une queue ectopique, il est envisageable qu'une queue ectopique puisse se développer à partir d'un explant embryonnaire *in vitro* sur-exprimant Nodal et BMP.

Pour tester cette hypothèse, j'ai injecté les ARNm codant pour BMP4 et Nodal au stade 2cellules, et réalisé une culture d'explants ectodermiques des embryons injectés (voir Matériel et Méthodes).

En culture, les cellules de l'ectoderme d'un embryon sauvage adoptent une forme de "boule", comme ce qui est observé chez le xénope (Fig.19b). La sur-expression généralisée de BMP4 et Cyclops dans toutes les cellules de l'ectoderme ne modifie pas la morphogenèse de l'explant d'ectoderme et aucune structure de type caudale n'est observée (Fig.19c,d). Cependant, dans toutes les expériences que nous avons réalisées dans le contexte d'un embryon entier, les queues ectopiques étaient composées de cellules injectées et de cellules recrutées. Ainsi il est possible que le développement d'une queue ectopique en culture nécessite des cellules "naïves" non-injectées.

Pour tester cette hypothèse, j'ai injecté les deux ARN codant pour BMP4 et Cyclops (ainsi que celui codant pour la GFP) dans un blastomère du pôle animal et réalisé une culture de l'ectoderme à partir de ces embryons. Seule une fraction des cellules de l'explant sont positives pour la GFP (Fig.19e). Même dans ces conditions, aucun signe de morphogenèse quelconque n'est observé (Fig.19f).

*Ces deux résultats indiquent que le développement des queues secondaires peut se réaliser dans l'ectoderme à partir d'un nombre limité de cellules mais il nécessite un contexte embryonnaire.*



**III-Figure 20: L'activité de l'organisateur de la queue ne dépend pas de celle de l'organisateur de Spemann**

La sur-expression de BMP4 (60pg) abolit complètement la formation des tissus axiaux de l'embryon (a). La greffe de cellules de marge ventrale au pôle animal d'un embryon au stade Sphère, ventralisé par BMP4, induit la formation d'une queue secondaire (b) dépourvue d'axe (d) qui est donc similaire à la queue de l'embryon receveur (c). Les tissus induits forment des somites reconnaissables dont les cellules expriment le gène *myoD* (f). De même, les structures secondaires expriment le gène *eveI* indiquant qu'elles sont de nature caudale (f). Orientations et stades : Tous les embryons sont à 24hpf en vue latérale, côté antérieur à gauche.

## **II.6 L'activité de l'organisateur de la queue ne dépend pas de celle de l'organisateur axial de Spemann.**

Il est possible que le développement des queues ectopiques dépende de l'activité de l'organisateur dorsal de Spemann, comme ce qui a été observé chez le xénope (Jones *et al*, 1992).

Pour tester cette éventualité, j'ai réalisé des transplantations de marge ventrale ou des sur-expressions de Nodal et BMP au pôle animal d'embryons dépourvus de marge dorsale. De tels embryons ont été générés par sur-expression de BMP4 (10pg d'ARNm injecté) au stade 2 cellules. Cette injection induit une ventralisation de tout l'embryon qui, par conséquent, perd son identité dorsale et l'organisateur de Spemann (Fig.20a).

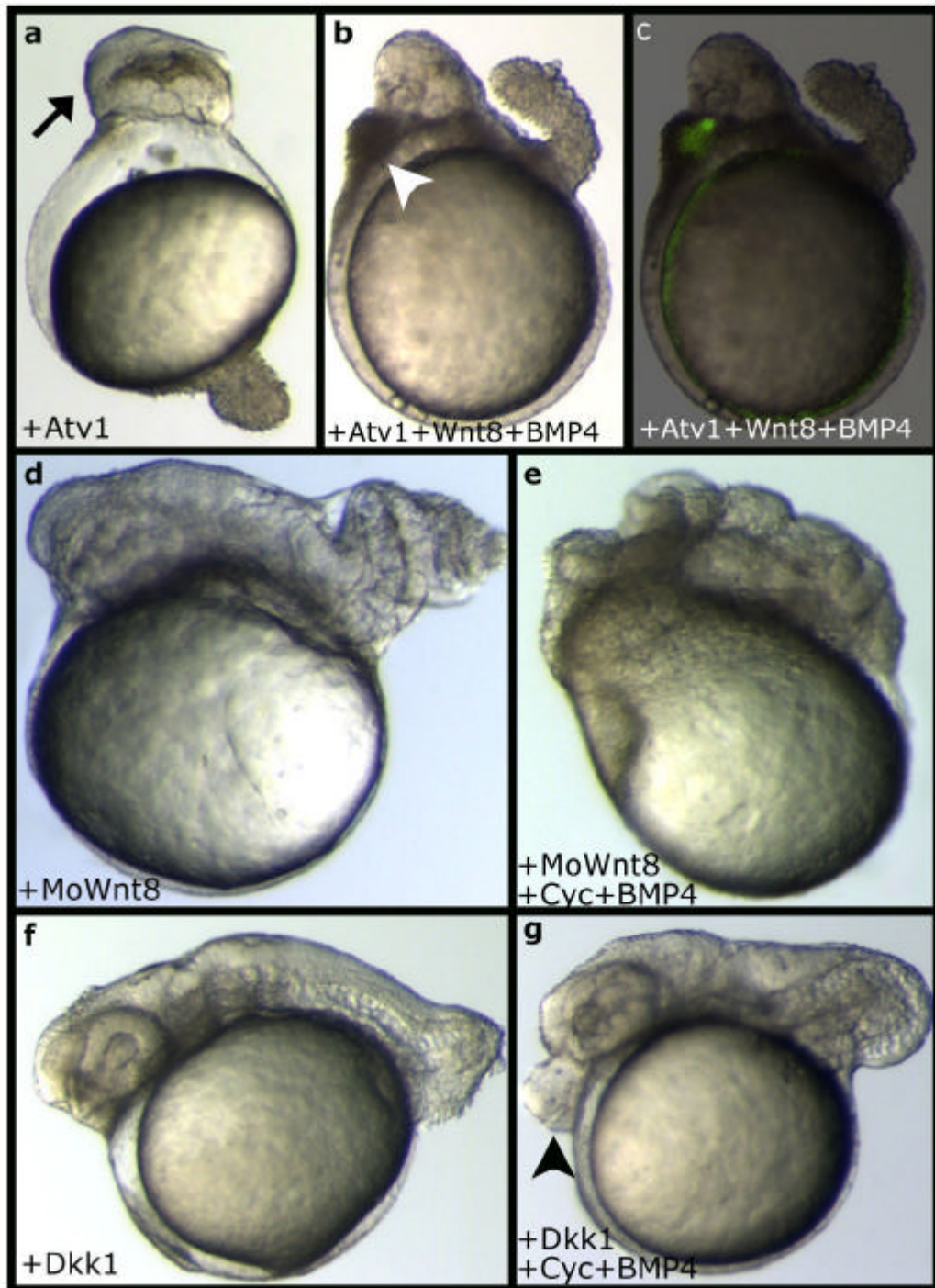
La transplantation de cellules de la marge ventrale d'un embryon en début de gastrulation vers le pôle animal d'un embryon receveur ventralisé au stade Sphère conduit au développement d'une queue ectopique secondaire dépourvue de structures axiales, comme la queue endogène de l'embryon ventralisé (Fig.20b-d). Les cellules du tissu induit expriment *myoD* et *eveI*, indiquant que les structures induites possèdent bien les tissus d'une queue (Fig.20e-f).

Le même résultat a été obtenu après sur-expression de Nodal (15pg) et BMP4 (250pg) au pôle animal d'un embryon ventralisé.

*Ces résultats montrent que l'activité de l'organisateur de la queue ne dépend pas de celle du centre organisateur de Spemann. De plus, puisque les cellules de la marge ventrale peuvent se développer correctement en l'absence du centre organisateur de Spemann (embryons ventralisés et embryons dont la charnière chordo-neurale a été extirpée), nous pouvons conclure que les deux centres organisateurs fonctionnent de manière indépendante.*

## **II.7 Les facteurs BMP, Nodal et Wnt8a forment une boucle de rétro-action positive**

Par sur-expression, nous avons observé que les combinaisons BMP/Nodal, BMP/Wnt8a et BMP/Nodal/Wnt8a sont capables de mimer l'activité de l'organisateur de la queue. Alors que la stimulation par BMP est absolument requise pour le développement d'une queue ectopique, les rôles respectifs de Wnt8a et Nodal ne sont pas clairement établis. Par plusieurs approches j'ai essayé de préciser l'importance relative de ces deux molécules et leurs éventuelles relations épistatiques pour la formation du bourgeon caudal.



**III-Figure 21: La formation d'une queue secondaire nécessite l'activité de Nodal et Wnt8a**

Dans des embryons injectés avec l'ARNm codant pour Atv1 (600pg), les embryons ne forment que la partie la plus antérieure du système nerveux (flèche en a). La sur-expression de Wnt8 et BMP4 dans de tels embryons n'induit pas la formation d'une queue ectopique. Les cellules issues du clone injecté semblent indifférenciées et s'agrègent en un paquet situé près de la tête (b,c). La perte de fonction de Wnt8a par injection du morpholino MoWnt8a (25ng) conduit à la perte des tissus de la queue (d). La sur-expression de Cyclops et BMP4 au pôle animal de tels embryons induit des malformations sévères empêchant toute interprétation phénotypique (e). Par contre, dans les embryons déficients pour la voie Wnt, sur-exprimant l'antagoniste Dkk1 (300pg), la sur-expression au pôle animal de Cyclops et BMP4 induit la formation d'une petite structure ectopique, qui ne comprend pas de somites (f,g). Stades et orientations: 24hpf, vue latérale, côté antérieur vers la gauche.

### **II.7.a Wnt8a et Nodal sont nécessaires pour la formation d'une queue ectopique.**

Tout d'abord, j'ai analysé si l'induction d'une queue ectopique était possible dans des embryons déficients pour le gène *wnt8a* ou la voie Nodal.

Dans des embryons déficients pour la signalisation Nodal (mutants *MZoep* ou embryons sur-exprimant *Atv1*), la queue ne se développe pas et seule une masse de cellules indifférenciées se forme postérieurement (Fig.21a; Thisse *et al*, 2000).

La sur-expression de Wnt8a (100pg) et BMP4 (250pg) au pôle animal de tels embryons ne produit pas de structures ectopiques développées. Les cellules injectées (positives pour la GFP) forment un paquet de cellules apparemment indifférenciées (Fig.21b,c).

Ainsi, la signalisation Nodal est épistatique sur Wnt8a pour le développement d'une queue secondaire.

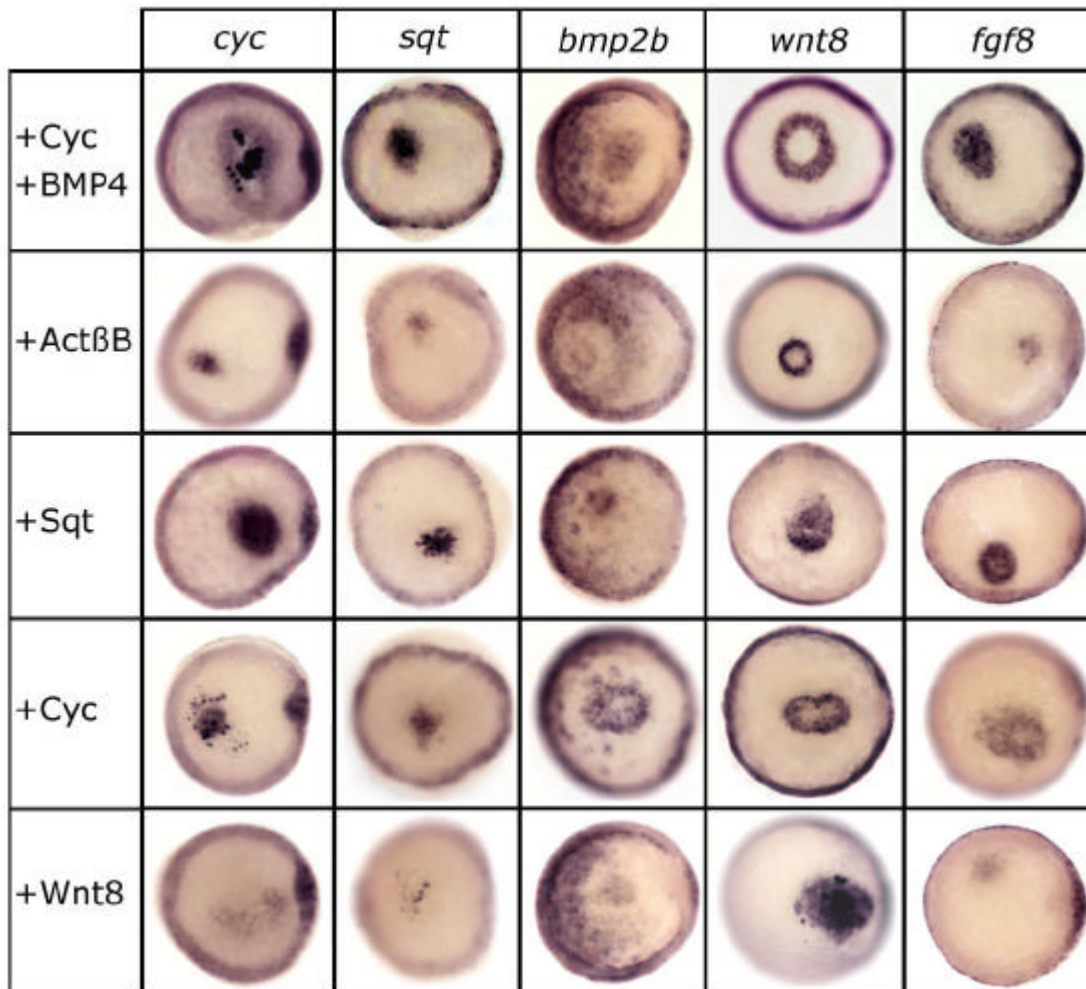
Pour inhiber la fonction du gène *wnt8a*, j'ai utilisé un morpholino dirigé contre l'ATG de l'ARNm correspondant (voir Matériel et Méthodes). Les embryons injectés avec ce morpholino (MoWnt8 - 800µM) ne développent pas de structures caudales non-axiales. Seule la notochorde se forme et s'enroule sur elle-même (Fig.21d). La majorité des embryons sur-exprimant Cyclops et BMP4 dans ce contexte ont de très fortes malformations empêchant toute interprétation morphologique (Fig.21e).

J'ai aussi bloqué la signalisation Wnt en injectant l'ARNm codant pour l'antagoniste Dkk1 (100pg d'ARNm injecté). La sur-expression de Cyclops et BMP4 au pôle animal de ces embryons permet d'observer l'induction d'une petite excroissance peu développée, qui présente des caractéristiques de cerveau postérieur comme la présence de vésicules otiques. Cependant, aucune queue ectopique avec des somites n'est observée.

*L'activité des signalisations Wnt8a, Nodal et BMP est donc absolument nécessaire pour le développement d'une queue secondaire.*

Si les trois signalisations sont absolument requises pour le développement d'une queue ectopique, pourquoi les doubles stimulations BMP/Nodal et BMP/Wnt8a sont-elles efficaces? Afin d'investiguer cette question, j'ai sur-exprimé Cyclops (15pg) et BMP4 (250pg) au pôle animal et analysé l'expression de *bmp2b*, *squint*, *cyclops* et *Wnt8a* par hybridation *in situ*.

Dans les embryons injectés avec les ARNm codant pour Cyc et BMP4, on peut noter une forte induction ectopique au pôle animal de *cyclops*, *squint*, *bmp2b* et *wnt8a*. Les résultats sont présentés en Table3 et Fig.22. Le même résultat a été obtenu après sur-expression de Wnt8a (100pg) et BMP4 (250pg) (non montré).



**III-Figure 22: La sur-expression de Nodal et BMP induit l'expression de *wnt8*, *bmp* et *nodal***

La sur-expression au pôle animal de Cyclops (15pg) et BMP4 (250pg) induit fortement l'expression des gènes *cyc*, *sqt*, *bmp2b*, *wnt8a* et *fgf8*. La sur-expression au pôle animal de différents ligands de la voie Act/Nodal, induit l'expression de *cyc*, *sqt*, *bmp2b*, *wnt8a* et *fgf8* (doses utilisées: actBB:1pg; sqt:1pg; cyc:15pg). Le même résultat est observé après la sur-expression de Wnt8a au pôle animal. Cependant, les inductions ectopiques de *cyclops*, *sqt*, *bmp2b* et *fgf8* sont plus faibles qu'avec les ligands de la voie Act/Nodal.

Stades et orientations: Tous les embryons sont en fin de stade blastula (5hpf) en vue animale.



*Par conséquent, après la double stimulation d'une cellule du pôle animal par Wnt8a et BMP ou par Nodal et BMP, les gènes codant pour les ligands des trois voies de signalisation sont induits. Nous pouvons supposer que les trois voies de signalisation sont donc activées.*

*De plus nous avons montré que l'activité de Wnt8a et de la voie Nodal sont nécessaires pour la formation d'une queue ectopique. Nous pouvons donc supposer que l'activation des trois voies de signalisation en même temps est nécessaire pour la formation d'une queue ectopique.*

### **II.7.b La sur-expression de Nodal et Wnt8a seuls**

La sur-expression individuelle au pôle animal de Cyclops (15pg), de Squint (1pg), de l'Activin $\beta$ B (1pg) ou de Wnt8a (50pg) induit aussi l'expression de *squint*, *cyclops*, *bmp2b* et *wnt8a* (Table 3 et Fig.22). Les inductions géniques après sur-expression de Wnt8a sont cependant plus faibles qu'après injection des ARNm codant pour les facteurs Activin/Nodal (Fig.22). Puisque la stimulation d'une cellule du pôle animal par la signalisation Activin/Nodal induit l'expression des gènes *bmp* et de *wnt8a*, on peut se demander pourquoi aucune queue ectopique ne se développe dans ces conditions.

En réalité, la sur-expression de Cyclops induit aussi fortement le gène *chordin*, qui code pour un inhibiteur de BMP (100%, n=16; Fig.16). Si BMP4 et Cyclops sont co-injectés dans le même blastomère, cette expression ectopique de *chordin* n'est plus observée (0%, n=26; Fig.16). Ainsi, même si la stimulation par Nodal induit l'expression de *wnt8a* et de *bmp2b*, il est possible que la voie BMP ne peut être activée à cause de la simple présence de l'antagoniste Chordin. Pour tester directement cette hypothèse j'ai injecté l'ARNm codant pour Cyclops (10pg) dans un blastomère du pôle animal d'un embryon sauvage et d'un embryon injecté avec un morpholino dirigé contre *chordin* (MoChd). Le phénotype des embryons injectés au stade 2cellules par ce morpholino (50 $\mu$ M) reproduit celui observé chez mutant génétique *chordino* indiquant que l'effet du morpholino est efficace et spécifique (Fig.23b; Kishimoto et al, 1997).

Dans l'expérience contrôle, la simple sur-expression de Nodal n'induit jamais de queue ectopique au pôle animal (0%, n=56; Fig.23a). Par contre, chez les embryons injectés avec le MoChd (50 $\mu$ M), on peut observer l'induction de queues ectopiques bien développées dans 46,4% des cas (n=56; Fig.23c).

*Ainsi l'incapacité de Cyclops à induire des queues ectopiques au pôle animal est due (entièrement ou en partie) à l'activité de Chordin.*

Pour la sur-expression de Wnt8a au pôle animal, les résultats sont quelque peu différents.

Ligand(s) injecté(s)	Doses	<i>znr1</i>	<i>znr2</i>	<i>bmp2b</i>	<i>wnt8</i>	<i>fgf8</i>
Cyc+BMP4	15pg/250 pg	100% (n=30)	92,9% (n=28)	94,4% (n=36)	91,4% (n=35)	100% (n=33)
ActβB	1pg	66,7% (n=36)	83,3% (n=24)	31% (n=29)	78,9% (n=19)	77,3% (n=22)
Squint	1pg	100% (n=13)	100% (n=17)	86,7% (n=15)	100% (n=9)	100% (n=16)
Cyclops	15pg	96,8% (n=31)	90,9% (n=22)	80% (n=30)	100% (n=21)	100% (n=31)
Wnt8	100pg	43,8% (n=16)	48% (n=50)	30,4% (n=23)	75% (n=20)	41,7% (n=24)

**III-Table 3: Fréquence d'induction des gènes *cyclops/znr1*, *sqt/znr2*, *bmp2b*, *wnt8a* et *fgf8* par différents ligands.**

Des ARNm codant pour différents facteurs de croissance (la dose utilisée est indiquée en colonne 2) ont été injectés dans un blastomère au pôle animal d'un embryon au stade 128-cellules. L'expression ectopiques des gènes *cyclops/znr1*, *sqt/znr2*, *bmp2b*, *wnt8a* et *fgf8* a été reportée dans la table. Tous les chiffres sont des pourcentages et le nombre d'embryons injectés est indiqué entre parenthèses.

En effet, pour des doses élevées (au dessus de 100pg d'ARNm injecté), la majorité des embryons développent des structures de type notochorde au niveau de la tête. De même, l'expression du gène *chordin* est aussi fortement induite (non montré).

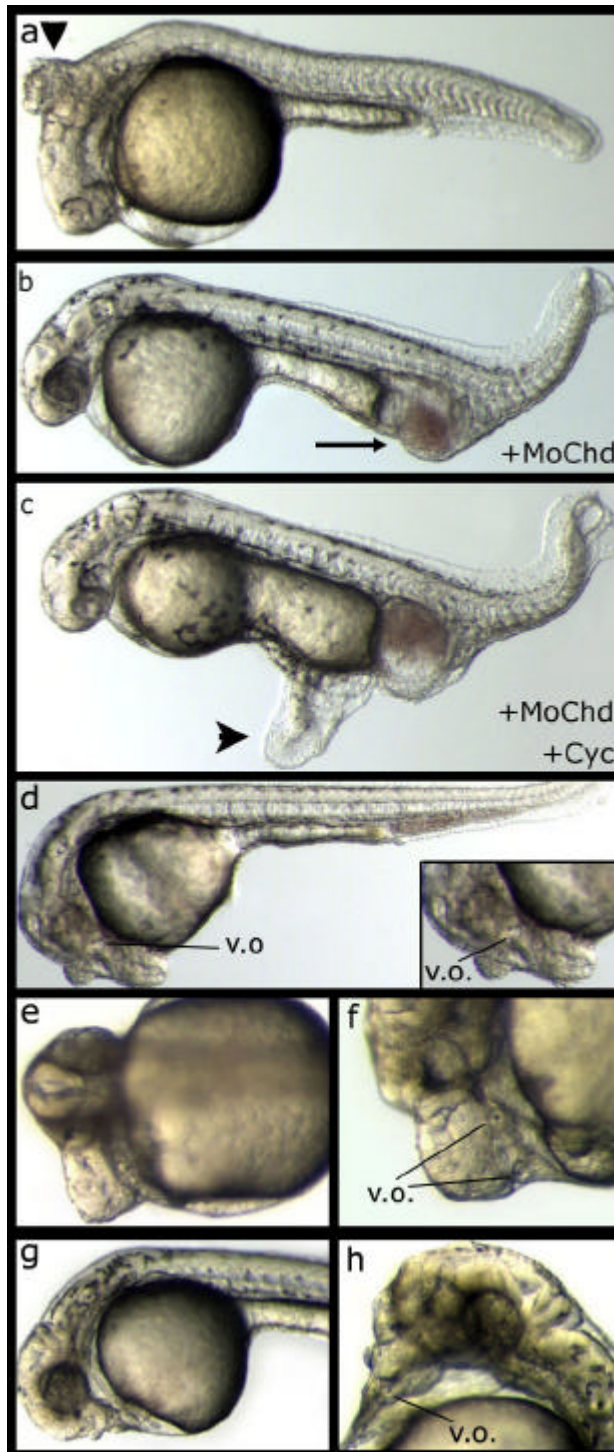
Par contre, pour des doses plus faibles (10pg à 50pg d'ARNm injecté) les embryons peuvent développer une queue ectopique composée de somites, de sang, mais dépourvue de structures axiales (Fig.24f). Par ailleurs, les embryons peuvent présenter des duplications de vésicule otique ou des notochordes ectopiques (Fig.24f,1-n).

Comment la sur-expression de Wnt8a peut-elle produire deux phénotypes aussi différents? Puisque nous avons vu que le niveau de signalisation BMP était crucial pour le développement d'une queue ectopique, il est possible que les cellules dérivant du blastomère injecté adoptent une position plus ou moins ventrale ou dorsale, ce qui influencerait sur le niveau de signalisation BMP. En position ventrale, la stimulation BMP serait renforcée par les molécules endogènes et dorsalement, elle serait diminuée sous l'influence des inhibiteurs de BMP.

Afin de tester cette hypothèse, j'ai injecté 50pg de l'ARNm codant pour Wnt8a dans un blastomère du pôle animal. En début de gastrulation, les embryons sont triés selon la position du clone décalée du côté ventral ou dorsal (Fig.24a-d). 12,5% des embryons sur-exprimant Wnt8a dont le clone est décalé vers le côté dorsal développent une queue ectopique et 66,7% une notochorde (n=48). Lorsque le clone est du côté ventral, 7,1% des embryons ont une notochorde secondaire dans la tête et 26,8% une deuxième queue (n=112).

Ainsi il existe une corrélation entre la position du clone sur-exprimant Wnt8a au pôle animal et la fréquence d'induction d'une queue ectopique ou d'une notochorde. Si le clone se situe dorsalement, Wnt8 induit l'expression des *nodal* et des *bmp* mais en raison de la présence d'antagonistes de BMP produit dans l'embryon du côté dorsal, la probabilité de développement d'une queue ectopique est diminuée. Si le clone se situe en position ventrale, les gènes *nodal* et *bmp* sont induits, et la signalisation BMP endogène favorise le développement d'une queue ectopique. Ces résultats seront rediscutés dans la partie Discussion.

*Par conséquent l'incapacité de Nodal ou de Wnt8 à induire des queues ectopiques résulte d'une signalisation BMP insuffisante.*



### III-Figure 23: Activité de Cyclops au pôle animal

La sur-expression de Cyclops (15pg) au pôle animal induit la formation d'une notochorde au niveau de la tête (a). L'injection d'un morpholino dirigé contre *chordin* (1,5ng MoChd) conduit à l'hypertrophie du mésenchyme ventral (b). La sur-expression de Cyclops dans des embryons injectés par la morpholino MoChd (1,5ng) induit la formation d'une queue ectopique (c). La sur-expression de doses plus faibles de Cyclops (2,5ng) induit des expansions antérieures du système nerveux avec la présence de vésicules otiques (v.o.) ectopiques (d-h). Stades et orientations: a-d,f,g: 30hpf; vue latérale côté antérieur à gauche; e: 30hpf, vue dorsale côté antérieur à gauche; h:30hpf, vue latérale, côté antérieur vers le haut.

**Les résultats présentés dans les deux sections suivantes complètent l'étude que je viens de détailler. Cependant, ce ne sont que des données préliminaires qui demandent à être plus amplement étudiées.**

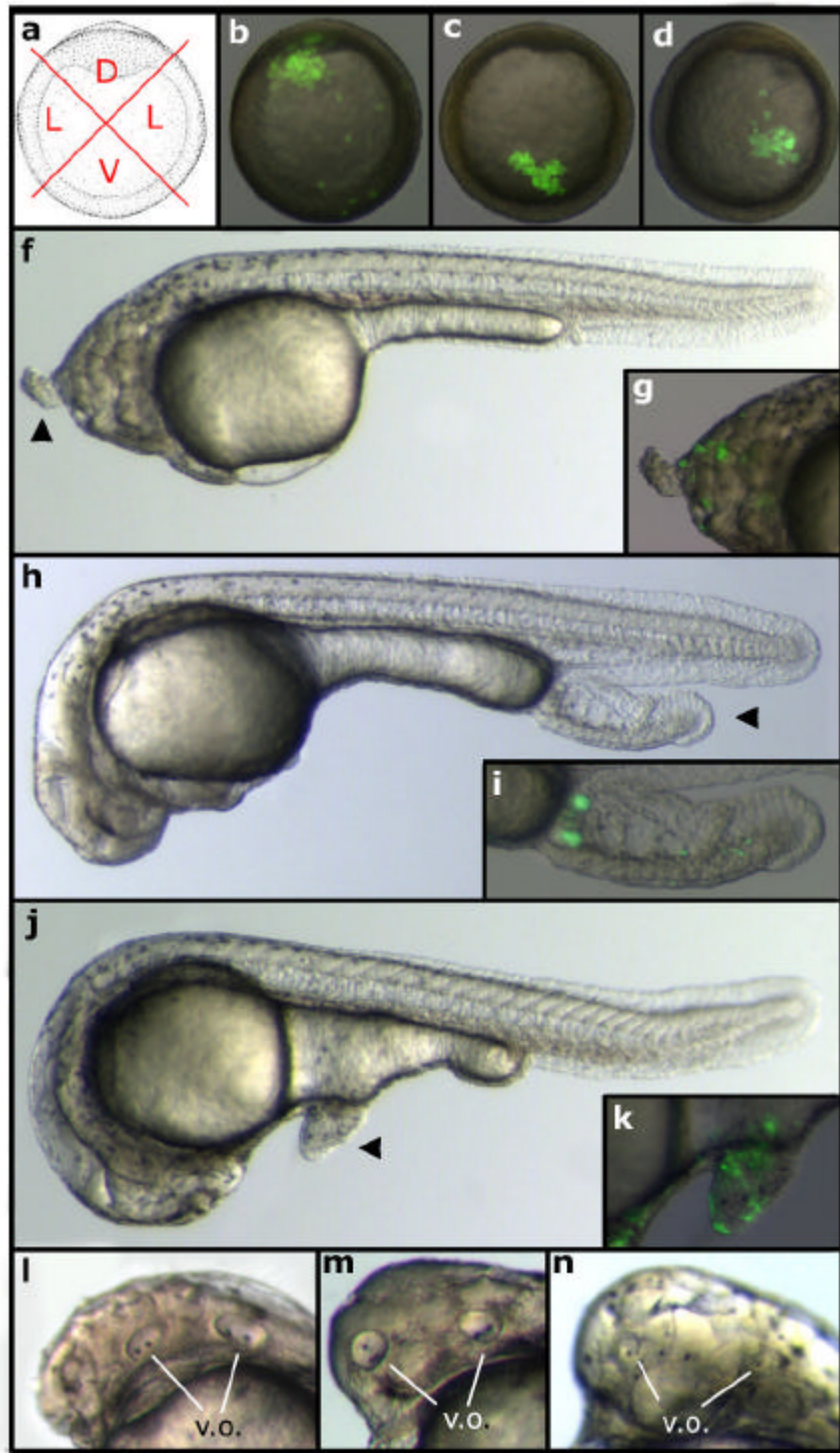
## **II.8 Résultats complémentaires: Les effecteurs de l'organisateur de la queue**

Les gènes *bmp2b*, *wnt8a* et *nodal* sont exprimés dès le stade Sphère, ce qui correspond au début de l'activité organisatrice de la marge ventrale, suggérant que ces trois familles de facteur de croissance sont les premiers effecteurs de l'organisateur de la queue. En aval de ces gènes, plusieurs molécules pourraient prendre le relais et permettre le développement des parties caudales de l'embryon. En particulier, les gènes *ntl/bra*, *caudal* et *eve1* sont de bons candidats pour agir en aval des signaux Nodal, BMP et Wnt8a car ils sont tous exprimés précocement dans les cellules de la marge ventrale et leur activité est requise pour le développement des tissus postérieurs (Joly et al, 1992; Joly et al, 1993; Halpern et al, 1993; Schulte-Merker et al, 1994; Golling et al, 2002). Afin de tester si l'activité des cellules de la marge ventrale passe par ces gènes, j'ai sur-exprimé Nodal et BMP au pôle animal d'embryons déficients pour ces gènes.

Les embryons mutants pour le gène *notail* sont dépourvus de notochorde et le développement de la queue est inhibé (Fig.25b; Halpern et al, 1993; Schulte-Merker et al, 1994). Ce phénotype correspond exactement à la perte des territoires dans lesquels *ntl* est exprimé en fin de gastrulation (notochorde et bourgeon caudal). Par ailleurs, *ntl* est un gène directement induit par la signalisation Nodal. Afin de tester si l'activité de Notail est nécessaire pour l'induction d'une queue ectopique, j'ai injecté les ARN de *bmp4* et *cyclops* au pôle animal d'embryons obtenus par croisement entre deux individus *notail*+/-.

Les embryons homozygotes pour la mutation sont facilement reconnaissables puisque leur axe endogène est dépourvu de queue et de notochorde (Fig.25b). Après sur-expression de BMP4 et Cyclops dans ces embryons, on peut observer une petite structure ectopique au niveau de la tête composée de cellules positives et négatives pour la GFP (Fig.25d,f). Dans tous les cas, ce tissu ne se développe pas et ni somites ni tube neural ne sont observés.

*Ainsi, l'activité de Notail/Bra est requise pour le développement d'une queue secondaire.*



### III-Figure 24: Activité de Wnt8a au pôle animal

Les clones issus de l'injection de l'ARNm codant pour Wnt8 (50pg) au pôle animal ont été triés en début en fonction de leur localisation le long de l'axe D/V (a). Les clones ont été séparés en clones dorsaux (b), ventraux (c) ou latéraux (d). Si le clone de sur-expression au pôle animal de Wnt8a est localisé du côté dorsal, les embryons développent à 24h préférentiellement une notochorde ectopique (f,g). Si le clone de sur-expression au pôle animal de Wnt8a est localisé du côté ventral, les embryons développent à 24h préférentiellement une queue ectopique (h,i). Si le clone de sur-expression au pôle animal de Wnt8a est localisé du côté latéral, les embryons développent à 24h préférentiellement des expansions du système nerveux avec éventuellement la formation d'une petite structure ectopique peu développée (j,k) et régulièrement des duplications de vésicules otiques (v.o.) (l-n). Stades et orientations: a-d=début de gastrulation (6hpf), vues animales, côté dorsal vers le haut. f-j=30hpf, vues latérales, côté antérieur vers la gauche. l-m=30hpf, vue latérale, côté antérieur vers le haut.

Le gène *eveI*, d'abord isolé chez la drosophile, est exprimé dès le stade Sphère dans les cellules de la marge ventrale (Fig.26a; Joly *et al*, 1993). J'ai réalisé la perte de fonction de ce gène en injectant un morpholino dirigé contre la partie 5' de son l'ARNm (MoEveI; voir Matériel et Méthodes).

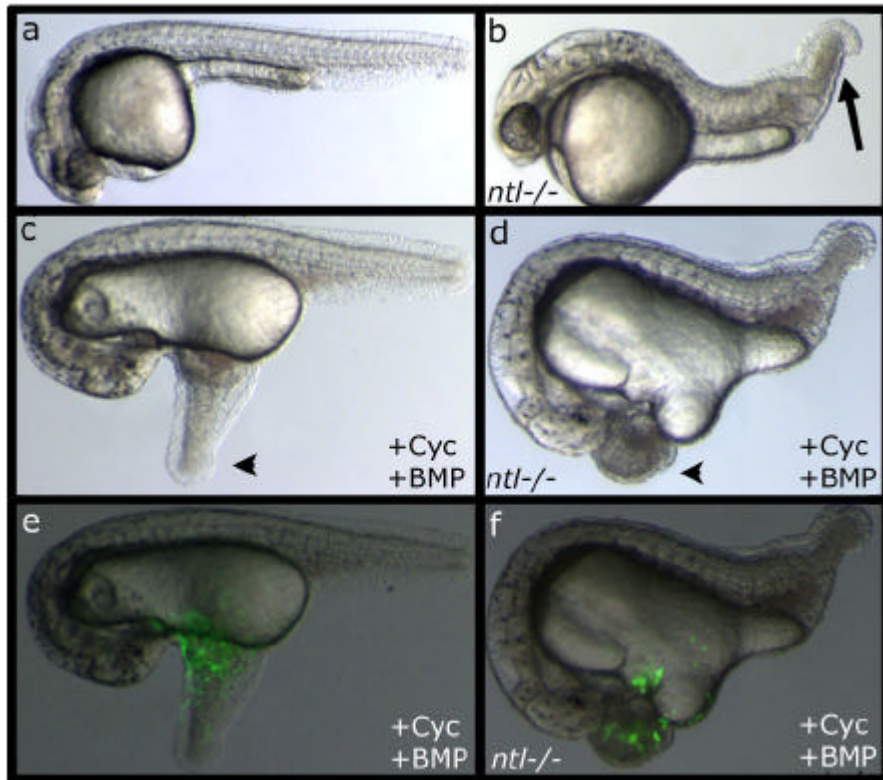
A 24h de développement, chez les embryons injectés avec 800µM du MoEveI, le développement du tronc et de la queue sont perturbés alors que la tête apparaît normale (50,9%, n=55, Fig.26b). Comme dans les embryons déficients pour Wnt8a ou BMP, seules les structures axiales subsistent (21,8%, n=55; Fig.26c). Ces résultats préliminaires suggèrent que l'activité de EveI est requise pour le maintien des tissus non-axiaux du tronc et de la queue, qui dérivent des cellules des marges ventrale et latérale.

Afin de tester si EveI est nécessaire pour le développement d'une queue secondaire, j'ai injecté le morpholino dirigé contre EveI (800µM) au stade 2 cellules et sur-exprimé Nodal et BMP4 au pôle animal de ces embryons. Dans l'expérience contrôle, la sur-expression de Cyc (15pg d'ARNm) et de BMP4 (180pg d'ARNm) au pôle animal d'un embryon sauvage induit des queues ectopiques chez 20% des embryons (n=30) (Fig.26d). Après la double injection des ARNm codant pour Cyclops et BMP4 au pôle animal d'embryons déficients pour *eveI*, cette fréquence d'induction n'est pratiquement pas changée (24,3%, n=37). Cependant, les structures induites sont très peu développées et les tissus induits sont difficilement reconnaissables (Fig.26e). Une certaine proportion des embryons présente des malformations sévères excluant toute interprétation morphologique (29,7%, n=37).

*Ainsi l'activité de EveI n'est pas essentielle pour l'induction d'une queue ectopique mais absolument requise pour sa bonne différenciation.*

Le gène codant pour le facteur de transcription Caudal est exprimé dans toutes les cellules de la marge en cours de gastrulation et restreint spécifiquement aux territoires postérieurs en début de somitogenèse (Joly *et al*, 1992; Fig.27a,b). A 24h de développement, l'expression de *caudal* n'est détectée que dans la queue à l'exception de la notochorde (Fig.27c). La perte de fonction de ce gène bloque spécifiquement la croissance de la queue (tissus axiaux et non-axiaux; Golling *et al*, 2002). Comme pour *eveI*, j'ai sur-exprimé Cyclops et BMP dans des embryons déficients pour le gène *caudal*.

L'injection de 800µM d'un morpholino dirigé contre *caudal* (MoCad) reproduit parfaitement le phénotype du mutant *caudal*<sup>-/-</sup> indiquant que l'action du morpholino est spécifique (Fig.27d,e; Golling *et al*, 2002).



**III-Figure 25: La formation d'une queue ectopique dépend de l'activité de Notail/Bra**

Les embryons mutants pour le gène *notail/bra* ont une queue atrophiée composée de cellules indifférenciées (b). Alors que la sur-expression de Cyclops et BMP4 au pôle animal d'un embryon sauvage induit à 24h la formation d'une queue ectopique (c,e), dans un embryon mutant pour *ntl*, Cyc et BMP4 n'induisent qu'une petite excroissance au niveau de la tête ne présentant aucune structure différenciée (d,f). Stades et orientations: 30hpf, vues latérales, côté antérieur vers la gauche.



Dans l'expérience contrôle, la sur-expression de Cyclops (15pg d'ARNm) et de BMP4 (180pg d'ARNm injecté) induit chez 23,9 % (n=46) des embryons une queue ectopique (Fig.27f). La double stimulation BMP4-Cyclops dans des embryons injectés avec le MoCad induit 28,6% de queue ectopique (n=56; Fig.27g). Même si cette fréquence est comparable à celle de l'expérience contrôle, les queues secondaires induites sont atrophiées.

*Le facteur de transcription Caudal est donc essentiel au développement d'une queue secondaire mais pas à son induction.*

*Les trois facteurs de transcription Ntl/Bra, EveI et Caudal sont donc essentiels pour le développement de la queue endogène au cours de l'embryogenèse ainsi que pour le développement d'une queue ectopique induite par la sur-expression de Nodal et BMP. Par conséquent, Ntl/Bra, EveI et Caudal agissent en aval de Nodal, BMP et Wnt8 lors du développement des tissus non axiaux de la queue.*

## **II.9 Résultats complémentaires: Existence d'une activité organisatrice tout autour de la marge**

Nous avons montré qu'il existe précocement deux activités organisatrices au niveau de la marge. L'une est ventrale et induit une identité postérieure, l'autre est dorsale et contrôle l'établissement des tissus axiaux. Les facteurs de croissance des familles BMP, Nodal et Wnt sont impliqués dans l'activité de ces deux activités organisatrices. Puisque les gènes codant pour ces molécules sont aussi exprimés dans les tissus intermédiaires (marge latérale), et que la marge présente une continuité spatiale tout autour de l'embryon, il est possible que les cellules de la marge latérale possèdent aussi une activité organisatrice.

### **II.9.a Greffes de marge latérale**

Afin de tester la possible activité organisatrice de ce tissu, j'ai réalisé des greffes de cellules issues de la marge latérale d'un embryon en début de gastrulation vers le pôle animal d'un embryon au stade blastula (stade Sphère), selon le même protocole que pour les transplantations de marge ventrale (Fig.28a). A 24h, trois types d'excroissance se distinguent:

- des queues ectopiques très peu développées (peu de somites et extension très faible)
- une extension du système nerveux antérieur comprenant des vésicules otiques et parfois des somites différenciés (Fig.28b-e).
- une notochorde enroulée dans la tête



**III-Figure 26: La formation d'une queue ectopique dépend de l'activité de EveI**

*eveI* est exprimé dans les cellules de la marge ventrale (a). La perte de fonction de *eveI* par injection de 25ng de MoEveI abolit la formation des tissus non-axiaux de la queue (b,c). Seules les structures axiales subsistent et s'enroulent sur elles-mêmes (c). Alors que la sur-expression de Cyclops et BMP4 au pôle animal d'un embryon sauvage induit à 24h la formation d'une queue ectopique (d), dans un embryon déficient pour *eveI*, Cyc et BMP4 n'induisent qu'une excroissance peu développée et peu différenciée (e). Stades et orientations: a: milieu de gastrulation (7hpf), vue animale, côté dorsal à droite. b-e: 30hpf, vues latérales, côté antérieur vers la gauche.

Dans tous les cas, les structures induites sont composées de cellules du greffon et de l'hôte. Ainsi les cellules de la marge latérale possèdent une activité organisatrice et peuvent induire des tissus postérieurs (queue), axiaux (notochorde) et intermédiaires (vésicule otique et excroissance du système nerveux avec présence de somites ou non).

Puisque la marge latérale possède des activités communes avec les cellules ventrales et dorsales, j'ai comparé au cours de la même séance de transplantation les capacités d'induction des cellules des marges ventrale, latérale et dorsale (greffes hétérochroniques Shield -> Sphère). Dans chaque cas, les fréquences d'induction à 24hpf de structures axiales, postérieures ou de type intermédiaire ont été reportées dans la Table 4. Cette expérience comparative indique clairement que les cellules de la marge latérale possèdent des potentialités variées, au contraire des cellules des marges dorsale et ventrale. De plus il semble que la marge latérale puisse induire la formation de tissus intermédiaires, qui participent à la formation de tissus considérés comme du tronc comme le cerveau postérieur et les somites.

Afin d'explorer cette hypothèse en détail, j'ai réalisé le même type de greffe et analysé la fréquence d'induction des gènes *en2* et *gs225* à 24hpf par hybridation *in situ*. L'expression de *en2* indique la présence de cellules du mésencéphale postérieur et du rhombencéphale antérieur. *gs225* s'exprime dans tout le pronephros, structure spécifique du tronc.

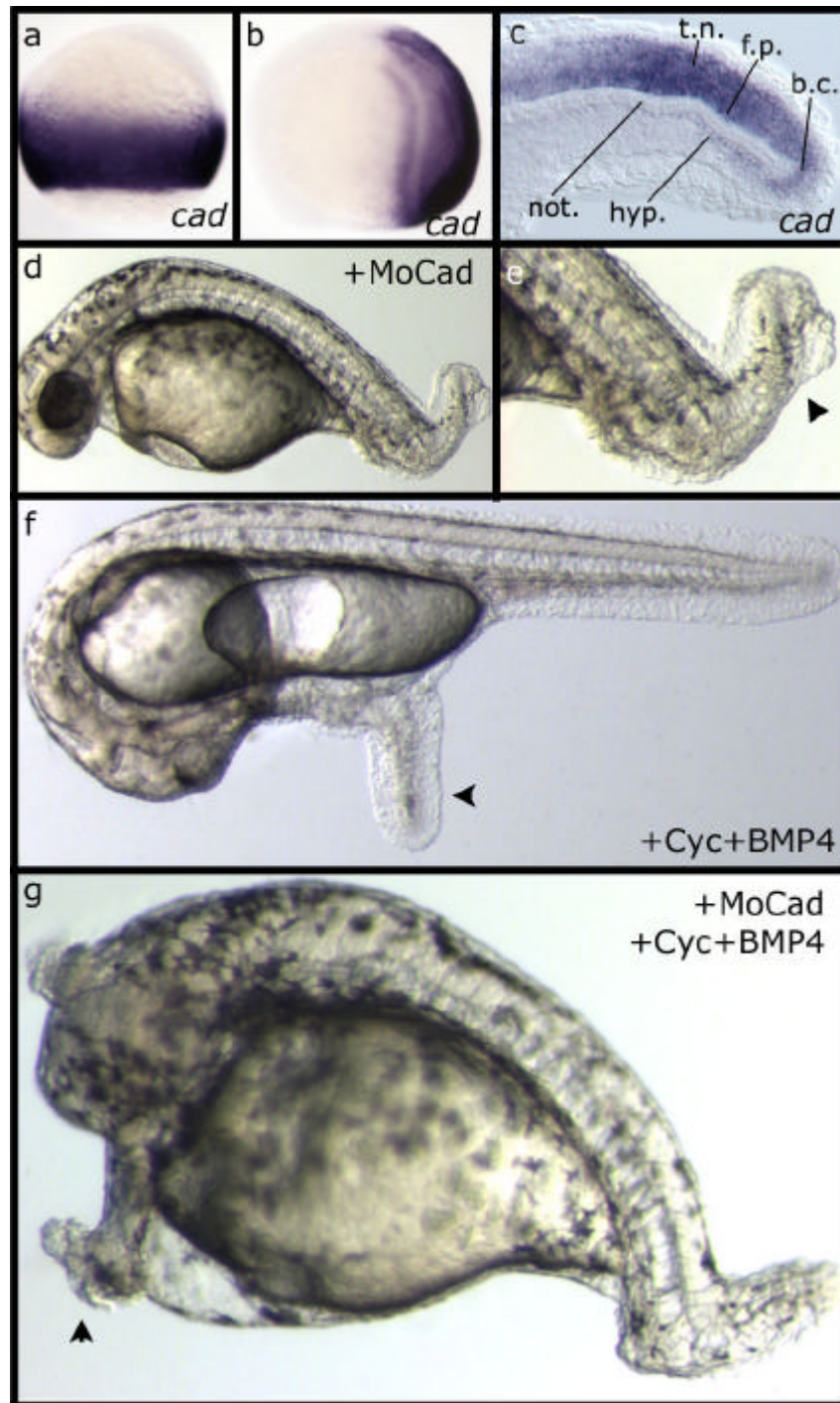
Après transplantation au pôle animal de cellules de la marge dorsale, l'induction ectopique de ces gènes n'est jamais observée (*en2*: 0%, n=10; *gs225*: 0%, n=9).

Par ailleurs la greffe de cellules de marge ventrale induit l'expression ectopique de *en2* dans 8% (n=25) des cas et celle de *gs225* dans 25% (n=24) des cas.

Après greffe de marge latérale au pôle animal, la fréquence d'induction de ces deux gènes est fortement augmentée (*en2*: 35,7%, n=42; *gs225*: 55,3%, n=47; Fig.28f,g).

En plus de cela, j'ai noté l'induction de vésicules otiques ectopiques, signe de la présence de cerveau postérieur. Alors que les greffes de cellules des marges dorsale et ventrale n'induisent pas ou peu (0%, n=16 et 10,5%, n=19, respectivement) de vésicule otique ectopique, la transplantation de marge latérale forme dans 48,4% des cas (n=64). L'ensemble de ces données est reporté en Table4.

*Ces observations indiquent que les cellules de la marge latérale peuvent induire du cerveau moyen et postérieur (vésicules otiques ectopiques) ainsi que des tissus du tronc, avec des fréquences plus élevées que les cellules des marges ventrale et dorsale. Ces données préliminaires suggèrent que les cellules de la marge latérale possèdent une activité*



### III-Figure 27: La formation d'une queue ectopique dépend de l'activité de Caudal

En cours de gastrulation, le gène *caudal* est exprimé tout autour de la marge (a). En début de somitogénèse, *caudal* est exprimé fortement dans la partie postérieure de l'embryon (b). A 24h de développement, *caudal* s'exprime dans la queue au niveau du tube neural (y compris la plaque du plancher), du bourgeon caudal et de l'hypochorde (c). La perte de fonction de *caudal* par injection de 25ng de MoCad abolit la formation de la queue (d). Seule une masse de cellules indifférenciées subsiste postérieurement (e). Alors que la sur-expression de Cyclops et BMP4 au pôle animal d'un embryon sauvage induit à 24h la formation d'une queue ectopique (f), dans un embryon déficient pour *caudal*, Cyc et BMP4 n'induisent qu'une excroissance peu développée et peu différenciée (g). Stades et orientations: a: milieu de gastrulation (7hpf), vue latérale, côté dorsal à droite. b: début de somitogénèse (11hpf), vue latérale, côté antérieur à gauche; d-g: 30hpf, vues latérales, côté antérieur vers la gauche. Abréviations: t.n.=tube neural; f.p.=plaque du plancher; b.c.=bourgeon caudal; not.=notochorde; hyp.=hypochorde.

*organisatrice des tissus intermédiaires (de type tronc) entre la marge ventrale et la marge dorsale.*

### **II.9.b Caractérisation moléculaire de l'activité de la marge latérale**

Les cellules de la marge latérale expriment fortement les gènes *nodal* et *wnt8a*. Le niveau de signalisation BMP est à priori moins élevé qu'à la marge ventrale puisque le niveau d'expression des gènes *bmp* est moins important, et à cause de la proximité des antagonistes Chordin et Noggin sécrétés dorsalement. Ainsi, en utilisant la même logique que pour les cellules de l'organisateur de la queue, nous pouvons supposer que l'activité de la marge latérale est contrôlée essentiellement par les signalisations Nodal et Wnt8a.

#### **II.9.b.1 Sur-expression de Wnt8a**

Lorsque Wnt8a (50pg) est sur-exprimé au pôle animal, à 24hpf les embryons présentent les trois mêmes types de phénotypes obtenus après les greffes de marge latérale (Fig.24).

Comme nous l'avons déjà mentionné, il semble que la position du clone au pôle animal ait une influence sur le phénotype observé à 24h. J'ai donc injecté l'ARNm codant pour Wnt8a au pôle animal et trié les clones en début de gastrulation en fonction de leur position en trois groupes: clones dorsaux, latéraux et ventraux. L'ensemble des résultats est résumé en Table 4

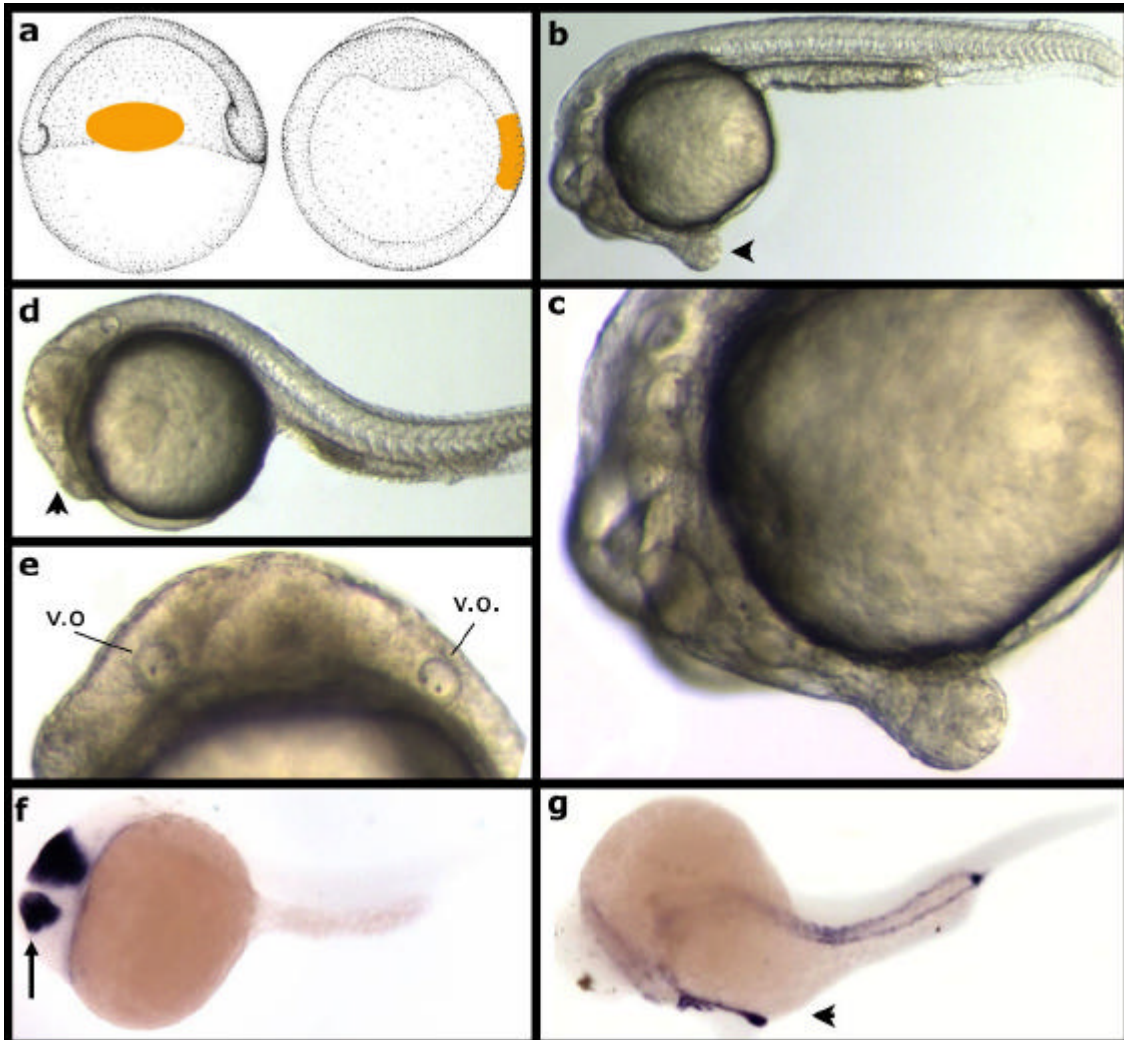
Ces données préliminaires indiquent que le développement d'une queue ectopique est favorisé en position ventrale, et celui d'une notochorde plus important dorsalement (Table 4 et Fig.24). En position latérale, les embryons développent préférentiellement des excroissances du système nerveux comprenant des vésicules otiques et parfois des somites (Table 4 et Fig.24j-n).

*Ainsi la sur-expression de Wnt8a récapitule les potentialités organisatrices des cellules de la marge latérale.*

#### **II.9.b.2 Sur-expression de Nodal**

Si l'on sur-exprime Cyclops au pôle animal à une dose moindre que celle utilisée précédemment (2,5pg d'ARNm injecté au lieu de 15pg), les embryons développent à 24h certains phénotypes qui ressemblent à ceux obtenus après la greffe des cellules de marge latérale.

En effet, alors que la sur-expression de Cyclops à forte dose (15pg) induit préférentiellement des notochordes ectopiques (92,9%, n=54), à plus faible dose (2,5pg) seuls 41% (n=61) des



**III-Figure 28: Les cellules de la marge latérale possèdent une activité organisatrice**

La greffe de cellules de la marge latérale prélevées en début de gastrulation au pôle animal d'un embryon au stade sphère (a) induit la formation d'excroissances du tube neural au niveau antérieur (b,c). Il est possible de noter la présence de vésicules otiques ectopiques (d,e). La frontière entre le mésencéphale et le rhombencéphale est dupliquée dans les excroissances (marqué par le gène *en2* en f) et ces dernières possèdent des tubes pronéphriques différenciés (marqués par le gène *gs225* en g). Orientations et stades: a:début de gastrulation vue latérale et vue animale; b-d,f,g=24hpf, vues latérales, côté antérieur à gauche; e=24hpf, vue latérale, côté antérieur vers le haut.

embryons forment une notochorde. L'induction de tissus axiaux a été vérifiée par l'induction ectopique du gène *shh*. Par contre, dans les embryons sur-exprimant Cyclops à faible dose, on peut observer des extensions antérieures du système nerveux avec des vésicules otiques ectopiques (32,8%, n=61; Fig.23a-d), suggérant que ces extensions sont de nature rhombencéphalique, comme décrit précédemment (Thisse *et al*, 2000). Afin de confirmer cette hypothèse, j'ai analysé l'expression du gène rhombencéphalique *krox20* par hybridation *in situ* dans les embryons sur-exprimant Cyclops. Alors que 37% (n=54) des embryons injectés avec 15pg d'ARNm codant pour Cyclops expriment *krox20* de manière ectopique, 49,2% (n=61) des embryons sur-exprimant Cyclops à faible dose (2,5pg) expriment *krox20* de manière ectopique. Ces résultats sont résumés en Table 4.

De ces résultats on peut conclure que la sur-expression de Cyclops à faible dose peut induire du cerveau postérieur organisé avec des vésicules otiques ectopiques. A forte dose, même si Cyclops, peut induire l'expression de ectopique de *krox20*, on ne peut jamais détecter de vésicule otique ectopique.

*Par conséquent, il semble que la sur-expression de Cyclops à de faible doses puisse mimer en partie l'activité de la marge latérale.*

*De l'ensemble de ces données, il apparaît qu'il existe une activité organisatrice entre les marges dorsale et ventrale qui peut induire préférentiellement la formation de tissus contribuant au tronc. Cette activité peut être mimée par les facteurs de croissance *Wnt8* et *Nodal*.*

*Par conséquent, il apparaît que la marge est le siège d'activités organisatrices le long de l'axe dorso-ventral déterminées par des niveaux de signalisation *Nodal*, *BMP* et *Wnt* bien précis.*

(1)						
Origine du transplant	Stade	Localisation du clone	"Axe"	"Tronc"	"Queue"	n
marge ventrale	Shield -> Sphere	P.A.	5,4%	18,9%	43,2%	37
marge latérale	Shield -> Sphere	P.A.	18,5%	37%	22,2%	54
Marge dorsale	Shield -> Sphere	P.A.	60%	0	0	20
(2)						
Origine du transplant	Stade	Localisation du clone	<i>en2</i>	<i>gs225</i>	Ves. Otique	/
marge ventrale	Shield -> Sphere	P.A.	8% (n=25)	25% (n=24)	10,5% (n=19)	
marge latérale	Shield -> Sphere	P.A.	35,7% (n=42)	55,3%(n=47)	48,4% (n=64)	
marge dorsale	Shield -> Sphere	P.A.	0% (n=10)	0% (n=9)	0% (n=16)	
(3)						
Ligand(s)	Dose	Localisation du clone	"Axe"	"Tronc"	"Queue"	n
Wnt8	50pg	P.A. Ventral	7,1%	59,0%	26,8%	112
Wnt8	50pg	P.A. Latéral	40,5%	33,4%	16,7%	84
Wnt8	50pg	P.A. Dorsal	66,7%	20,8%	12,5%	48
(4)						
Ligand(s)	Dose		Shh	Krox20	«Queue»	n
Cyclops	2,5pg	P.A.	41,0%	49,2%	0,0%	61
Cyclops	15pg	P.A.	92,6%	37,0%	0,0%	54

### III-Table 4: Induction de tissus de type tronc

(1) Les transplantations de cellules de marge ventrale, latérale ou dorsale prélevées en début de gastrulation (6hpf) pour être greffées au pôle animal d'un embryon receveur, ont été comparées pour leurs capacités inductrices de tissus axiaux (de type notochorde), intermédiaires (de type tronc) et de queue. Une structure induite a été considérée comme tronc lorsqu'elle s'allonge depuis le système nerveux antérieur de l'embryon receveur et possède une ou des vésicules otiques ectopiques ou des somites. (2) La même expérience a été réalisée une seconde fois et, pour chaque type de greffe le nombre de vésicules otiques ectopiques a été comptabilisé à 24h. Les embryons ont été ensuite fixés pour analyser l'expression ectopiques des gènes *en2* (marqueur de mésencéphale postérieur) et *gs225* (marqueur de tubes pronéphriques). (3) Wnt8a a été sur-exprimé au pôle animal et les clones ont été triés en fonction de leur position le long de l'axe D/V. Trois catégories ont été conservées: pôle animal (P.A.) dorsal, latéral et ventral. La fréquence d'induction de tissus de type axe, tronc ou queue a été reportée, selon les mêmes critères morphologiques utilisés précédemment. (4) Cyclops a été sur-exprimé au pôle animal à deux doses distincts. Les embryons ont été fixés en début de somitogenèse pour tester l'expression ectopique du marqueur axial *shh* et du gène rhombencéphalique *krox20*. Tous les résultats de la table sont donnés en pourcentages, avec le nombre réel d'embryon testés dans la colonne de droite ou entre parenthèse.



## III. DISCUSSION

### III.1 Rôle de l'organisateur de Spemann chez le poisson zèbre

Nous avons montré que les cellules de la marge dorsale, possédant l'activité organisatrice de Spemann, ne peuvent dupliquer les structures non-axiales de la queue. De plus, leur présence n'est pas nécessaire pour le développement des tissus postérieurs (Fig.5 et 8). Cependant, plusieurs observations indiquent que la queue ne peut pas s'allonger correctement au-delà d'un jour de développement sans la présence des cellules de la charnière chordo-neurale (Fig.8). Il est donc possible que ces structures axiales fournissent une force de poussée indispensable à l'élongation postérieure de la queue. On peut imaginer aussi qu'en l'absence de tissus axiaux les divisions cellulaires sont normales mais qu'en l'absence de notochorde les tissus se rétractent.

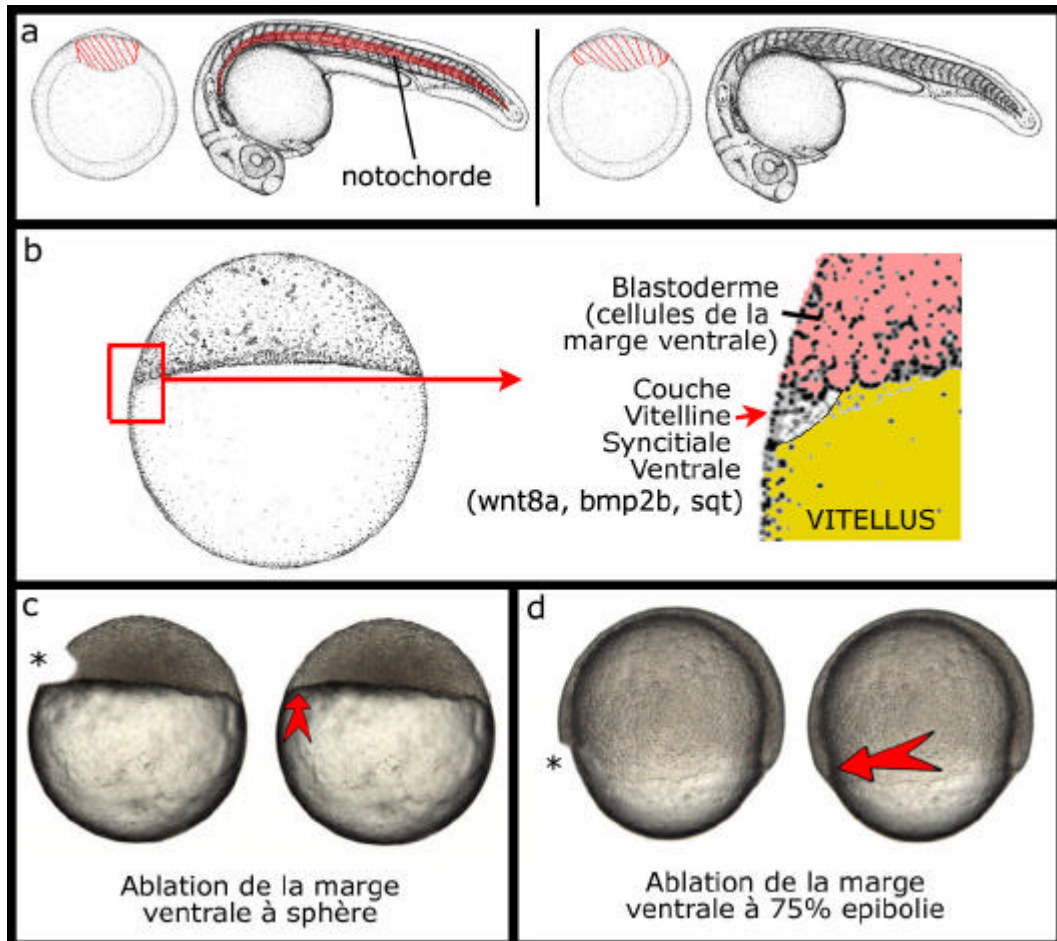
Ainsi, chez le poisson zèbre, les cellules de la marge dorsale sont responsables de la formation des cellules axiales (plaque du plancher, notochorde et hypochorde) et possèdent une activité organisatrice de tissus non-axiaux (tube nerveux dorsal et mésoderme para-axial) limitée à la tête et au tronc. Ces observations confirment ce qui avait été proposé chez le poisson zèbre et dans d'autres organismes modèles (Bang *et al*, 1997; Muhr *et al*, 1997; Woo et Fraser, 1997; Fujii *et al*, 2002), que l'organisateur de Spemann ne contrôle pas toute la régionalisation antéro-postérieur chez le poisson zèbre.

### III.2 Identification de l'organisateur de la queue

#### III.2.a Les cellules de la marge ventrale possèdent une activité organisatrice de la queue

Nous avons montré que les cellules les plus ventrales situées au sein d'un arc de 20 à 30° induisent les tissus non-axiaux de la queue de manière ectopique dans l'ectoderme d'un embryon receveur. Ce tissu recrute des cellules de l'hôte, qui se différencient en structures auxquelles elles n'auraient pas participé normalement (Fig.9). Cela correspond à la définition d'un centre organisateur proposée par H. Spemann (Spemann, 1924).

Les tissus composant les queues secondaires sont bien organisées et possèdent des régionalisations A/P et D/V correctes. Même si il avait déjà été montré que la marge ventrale possédait une activité postériorisante (Woo et Fraser, 1997; Jujii *et al*, 2002), notre étude est la première à décrire une telle propriété organisatrice indépendante de l'activité de l'organisateur de Spemann.



**III-Figure 29: L'activité organisatrice de la queue peut se régénérer après l'ablation des cellules de la marge ventrale**

Si l'on réalise l'ablation de l'organisateur de Spemann (écusson embryonnaire) morphologiquement visible, les embryons se développent correctement et à 24h possèdent une notochorde bien formée (a, gauche). Si l'ablation dépasse l'épaississement de la marge dorsale alors les embryons ne forment pas de tissus axiaux (a, droite). Les gènes *wnt8*, *sqt/znr2* et *bmp2b* s'expriment au stade sphère au niveau de la couche vitelline syncytiale ventrale (b). On peut supposer qu'après l'ablation de la marge ventrale au stade sphère, les signaux provenant de la YSL ventrale régénèrent l'activité organisatrice de la marge ventrale (c). Si l'ablation se fait en cours de gastrulation, des cellules immédiatement adjacentes pourraient régénérer l'activité de la marge ventrale (d).

### **III.2.b L'activité de la marge ventrale décroît au cours du temps**

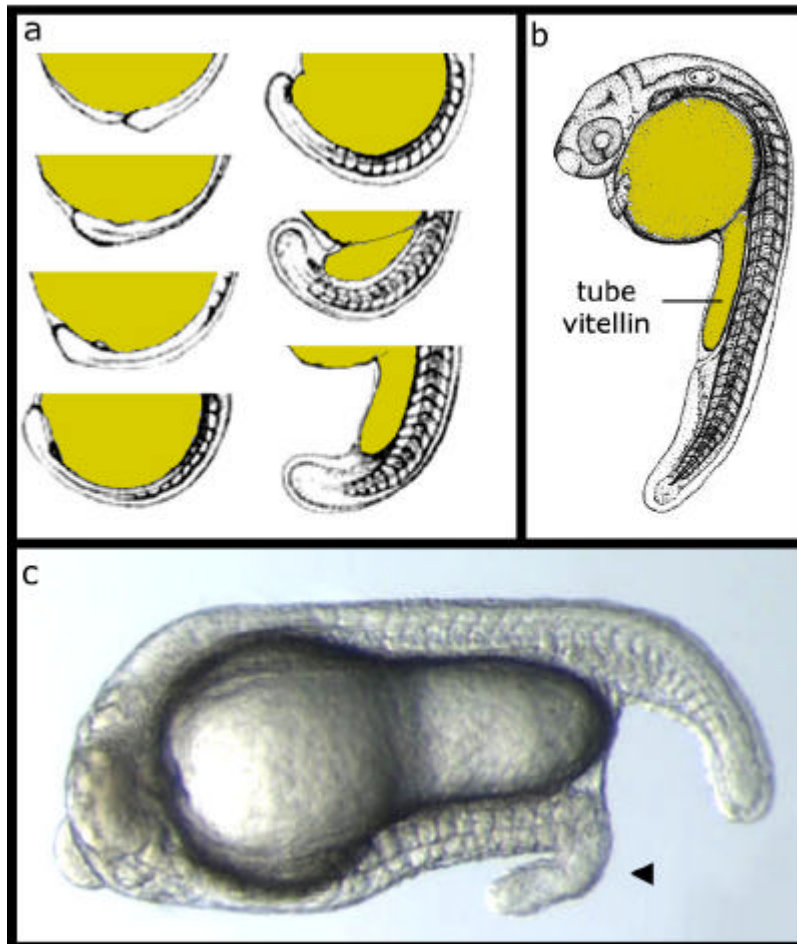
Nous avons montré que l'activité de l'organisateur de la queue était détectée juste après le début de l'expression du génome zygotique et maintenue jusqu'en début de somitogenèse. Cette activité décroît au cours de la gastrulation. Ainsi l'organisateur de la queue possède les mêmes caractéristiques que l'organisateur de Spemann.

Cependant, on ne peut exclure que ces différences d'activité proviennent aussi de biais techniques. En effet, il est possible que le nombre de cellules prélevées entre les embryons en cours de blastula et en fin de gastrula soit sensiblement différent. En particulier la marge ventrale d'embryon en milieu et en fin de gastrulation est constituée d'une couche de cellules beaucoup plus fine que celle en début de gastrulation. De plus, on peut supposer que les cellules prélevées en fin de gastrulation n'ont pas la même capacité d'intégration dans l'ectoderme de l'hôte que des cellules prélevées dans des embryons en cours de blastula, à priori moins déterminées. Ainsi, même si la baisse d'activité des cellules de la marge ventrale est claire d'après nos résultats, ces incertitudes n'autorisent pas à réaliser une comparaison précise de l'activité de l'organisateur de la queue au cours du développement. On peut toutefois préciser que ces variations expérimentales sont les mêmes pour les cellules de la marge dorsale (nombre de cellules prélevées et intégration du greffon), ce qui confirme que le comportement des deux organisateurs varie en parallèle au cours de la gastrulation.

### **III.2.c Localisation de l'organisateur de la queue**

Nous avons observé que les capacités organisatrices de la queue sont restreintes aux cellules marginales les plus ventrales (lieu de plus forte signalisation BMP et Wnt8a). De plus, il semble qu'un nombre limité de cellules soit suffisant pour former un bourgeon caudal postérieur. Cependant, l'ablation des cellules de la marge ventrale (depuis le stade blastula jusqu'en fin de gastrulation) n'induit aucune malformation chez l'embryon. Cela suggère que la marge ventrale est régénérée. Cette propriété peut être mise en relation avec l'absence de gènes s'exprimant spécifiquement dans cette région en cours de gastrulation, contrairement aux cellules de la marge dorsale. Le gène *even-skipped* en est l'exemple, puisqu'il s'exprime dans toutes les cellules de la marge à l'exception des plus dorsales (Joly *et al*, 1993).

Une telle régénération a été aussi observée dans le cas de l'organisateur de Spemann. En effet, chez le poisson zèbre, la perte des tissus axiaux n'est observée qu'après ablation d'une large partie de la marge dorsale, dépassant la localisation morphologique de l'organisateur (Fig.29a, Saude *et al*, 2000). De même, chez le poulet, après l'ablation du nœud de Hensen certains



**III-Figure 30: La formation de la queue chez le poisson zèbre requiert a présence du vitellus**

A partir de la formation du bourgeon caudal, la queue se développe en étroite relation avec le vitellus (a). A 24h le tronc est superposé à une extension du vitellus (b) qui est peut-être essentielle pour la croissance de la queue. Les queues ectopiques induites par la sur-expression de Cyclops et BMP4 ou par la greffe de cellules de la marge ventrale "reposent" sur le vitellus comme la queue endogène (c).

gènes spécifiques de l'organisateur sont ré-induits, et l'activité de l'organisateur est maintenue. Cette régénération est dépendante de cellules du sillon primitif sous l'activité de *Vg1* et *Wnt8c* (Joubin et Stern, 1999).

Cette dernière donnée est particulièrement intéressante car *wnt8a*, *bmp2b* et *squint* sont exprimés ventralement dans la couche vitelline syncytiale, structure extra-embryonnaire non soumise à l'ablation de la marge ventrale (Schier, 2001; Fig.29b). On peut supposer ainsi qu'après l'ablation précoce de la marge ventrale les signaux provenant de la YSL ventrale puissent ré-induire les cellules sus-jacentes. Cependant, au cours de la gastrulation, ces trois gènes ne sont plus détectés dans la YSL ventrale. Ainsi si l'ablation de la marge ventrale se fait après le début de la gastrulation, il devrait exister un autre mécanisme de régénération (Fig.29c).

Toutefois, chez la souris, si l'ablation des cellules à l'origine des tissus non-axiaux est réalisée plus tardivement (une fois que le bourgeon caudal est formé), l'élongation et la morphogenèse des tissus postérieurs sont fortement perturbés, indiquant que les cellules du bourgeon caudal ne peuvent pas se régénérer à ce stade là (Goldman *et al*, 2000). Par conséquent la capacité de régénération des cellules du bourgeon caudal non-axial est limitée dans le temps.

### **III.2.d Contraintes pour le développement d'une queue**

Par la culture d'explants d'ectoderme sur-exprimant de manière généralisée ou localisée BMP4 et Cyclops, nous avons montré que le développement d'une queue ectopique nécessite le contexte embryonnaire (Fig.19). De même, des cellules de marge ventrale en culture ne subissent aucune morphogenèse et adoptent une forme de boule (Sagerström *et al*, 1996). Ce résultat contraste avec ce qui a été observé chez le xénope. En effet, la région génératrice de la queue prélevée en fin de gastrulation maintenue en culture se différencie toujours en queue avec des somites, un tube neural et du mésenchyme reconnaissables (Tucker et Slack, 1995). Ces différences peuvent provenir de la différence qui existe entre les mécanismes de morphogenèse et d'élongation de la queue chez les deux organismes. Comme nous l'avons déjà évoqué, au cours du développement du bourgeon caudal, les cellules reposent directement sur le vitellus (Fig.30a; Kimmel *et al*, 1995; Kanki et Ho, 1997). Il est possible que ce dernier serve de substrat pour assurer les mouvements cellulaires nécessaires. De plus, à 24h de développement, le tronc repose sur une extension du vitellus (tube vitellin), qui pourrait servir de support pour l'extension de la queue (Fig.30b). De même, chez les embryons qui sur-expriment BMP et Nodal au pôle animal, la queue secondaire se développe aussi sur le vitellus. Les cellules reposent directement dessus (Fig.30c). Ainsi, on peut

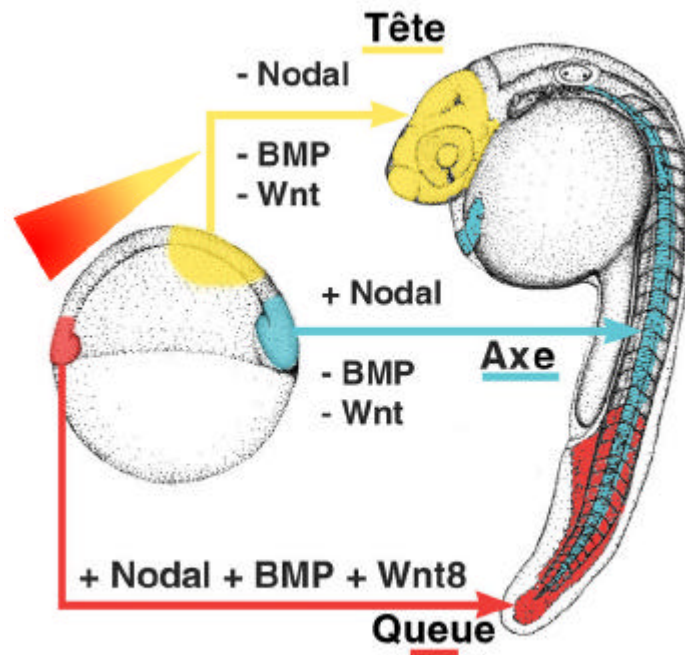
supposer que l'absence de morphogenèse dans les cultures d'explants d'ectoderme sur-exprimant BMP et Nodal est due à l'absence d'un support, rôle que joue le vitellus dans un embryon sauvage. Par ailleurs, les signaux provenant de la YSL dans le vitellus pourraient aussi jouer un rôle pour la survie ou le maintien de l'identité des cellules.

### **III.2.e Mouvement des cellules de l'organisateur de la queue au cours de la gastrulation**

Comme nous l'avons déjà évoqué, les cellules de la marge ventrale ne subissent pas de mouvements d'extension et de convergence pendant la gastrulation en raison d'une forte signalisation BMP. Ce territoire "glisse" sur le vitellus jusqu'au pôle végétal (Warga et Kimmel, 1990; Myers *et al*, 2002). En début de gastrulation, la marge ventrale est composée essentiellement de cellules du mésoderme et de l'endoderme (Kimmel *et al*, 1990). Dès 75% epibolie, ces cellules ont involués sous l'épiblaste mais conservent leur localisation ventrale. Ainsi la marge ventrale transplantée à partir d'embryons en milieu de gastrulation est composée de cellules hypoblastiques et épiblastiques. La population cellulaire qui forme la marge ventrale reste homogène au cours de la gastrulation. Cette particularité contraste avec le cas des cellules de l'organisateur de Spemann. En effet, les cellules de la marge dorsale subissent des mouvements d'involution pendant toute la gastrulation. La population cellulaire composant ce tissu est donc en renouvellement constant (Schier et Talbot, 1998; Joubin et Stern, 1999; Bouwmeester, 2001; Kinder *et al*, 2001).

### **III.2.f Comparaison de mes résultats avec ceux d'autres expériences de transplantation**

La transplantation de cellules provenant de la marge ventrale vers le pôle animal d'un embryon receveur avait déjà été réalisée par l'équipe de S. Fraser chez le poisson zèbre (Woo et Fraser, 1997). Dans leur étude, les auteurs ont prélevé la marge ventrale d'un embryon en début de gastrulation pour la greffer vers le pôle animal d'un embryon du même âge. A 24h de développement, 68% (n=34) des embryons développèrent une excroissance neurale au niveau de la tête, présentant des vésicules otiques ectopiques et des cellules positives pour le gène rhombencéphalique *krox20*. Cependant aucun des embryons transplantés n'a développé de queue ectopique. En réalisant exactement la même expérience, nous obtenons 20% d'induction de queue ectopique et 58,3% d'induction de vésicules otiques surnuméraires. Ainsi même si nous pouvons obtenir des duplications d'oreille, nos résultats sont très différents. Par ailleurs, nous avons remarqué que la quantité de cellules transplantées est un facteur important pour l'induction des queues ectopiques. Ainsi il est possible que la différence entre les résultats de nos études respectives corresponde à une différence du nombre de cellules



**III-Figure 31: Modèle de gradient d'activité de la marge ventrale vers le pôle animal**

Les cellules de la marge ventrale ont un haut niveau de stimulation BMP, Nodal et Wnt8 et sont à l'origine de la formation des structures non-axiales de la queue. Les cellules de la marge ventrale, qui forment les tissus axiaux de l'embryon, présentent une forte stimulation Nodal et une inhibition des signalisations BMP et Wnt. Le pôle animal est dépourvu de toute activité Nodal, BMP et Wnt, et se différencie en système nerveux antérieur. Il existe donc un gradient d'activité Nodal, BMP et Wnt allant de la marge latérale vers le pôle animal (triangle dégradé).

greffées. On peut supposer que si la quantité de cellules transplantées est faible, la quantité de signal BMP sera alors plus faible (le niveau de signalisation BMP étant un facteur déterminant pour le développement d'une queue secondaire). De plus, dans leur étude, Woo et Fraser n'ont pas utilisé la même méthode de transplantation, ce qui pourrait expliquer la différence de nos résultats.

### **III.3 Nature moléculaire de l'organisateur de la queue**

#### **III.3.a Gradient de signalisation BMP, Nodal et Wnt**

Nous avons montré que les signalisations BMP, Nodal et Wnt8a sont nécessaires et suffisantes pour induire l'organisateur de la queue. De plus, la stimulation d'une cellule du pôle animal avec Nodal et BMP ou Wnt8 et BMP active les trois voies de signalisation. Par ailleurs, la perte de fonction de l'une des voies de signalisation bloque la formation des tissus non-axiaux de la queue ainsi que la formation de queue ectopique. Par conséquent, pour que les cellules de la marge ventrale possèdent leur activité organisatrice des tissus non-axiaux de la queue, il faut que les trois voies de signalisation soient fonctionnelles. Nous proposons qu'au sein des cellules de la marge ventrale, il existe une triple stimulation des voies de signalisation Nodal, Wnt8a et BMP qui s'auto-régulent les unes les autres. Par ailleurs, il a été démontré chez l'amphibien que la mise en place des territoires les plus antérieurs résulte de la triple inhibition des voies de signalisation Wnt, BMP et Nodal, par la présence des antagonistes spécifiques Dkk1, Frzb1, Cerberus, Noggin et Chordin (Glinka *et al*, 1997; Piccolo *et al*, 1999). Plusieurs études ont montré que ce modèle était valable aussi chez le poisson zèbre (Schier, 2001 ; Thisse *et al*, 2000).

*Au regard de l'ensemble de ces données, nous proposons qu'au sein de l'embryon en début de gastrulation, il existe un gradient de signalisation des voies BMP, Wnt et Nodal dirigé depuis la marge ventrale vers le pôle animal dorsal (cerveau antérieur présomptif) (Fig.31) qui est responsable de régionalisation de l'embryon le long de l'axe antéro-postérieur.*

#### **III.3.b Signalisations intracellulaires**

##### **III.3.b.1 Interaction des voies BMP et Nodal**

Plusieurs études ont suggéré que les signalisations BMP et Nodal pourraient interagir entre elles. Il a été notamment montré que BMP7 et Nodal peuvent former des hétérodimères inactifs (Yeo et Whitmann, 2001). De même puisque les deux signalisations convergent vers Smad4, co-facteur des R-Smad, les deux voies peuvent entrer en compétition pour le recrutement de cette molécule (Candia *et al*, 1997).



Dans notre étude, il semble que les deux voies de signalisation agissent en parallèle et qu'il y a une addition de leur activité. En effet, alors que Nodal est requis pour la formation de tout le mésendoderme, BMP est essentiel pour la détermination du côté ventral. Or l'organisateur de la queue est composé principalement de cellules du mésendoderme ventral, ce qui correspond, conceptuellement, à une addition des deux activités. L'observation directe des gènes cibles de Nodal (*bik* et *atv1*, Fig.16) dans les embryons sur-exprimant BMP et Nodal montre que la signalisation Nodal est toujours fortement active dans les cellules stimulées par BMP.

Le fait que les deux voies de signalisation Activin/Nodal et BMP puissent interagir pour former du mésoderme ventral avait déjà été observé par l'équipe de J. Hogan chez le Xénope. En effet, les auteurs montrent que des cultures d'explants d'ectoderme d'embryons sur-exprimant BMP4 et Activin adoptent une identité de mésoderme ventral, phénotype non obtenu avec les facteurs de croissance seuls. De même, les cellules en culture stimulées par les deux voies de signalisation expriment fortement *xhox3* (l'homologue de *eve1*), contrairement aux blastomères injectés par les molécules seules (Jones et al, 1992). Dans cette étude, les auteurs n'avaient pas réalisé de sur-expressions localisées dans l'embryon.

### III.3.b.2 Signalisation par la voie Wnt

La stimulation d'un récepteur Frizzled par un ligand Wnt peut être transmise vers le noyau d'au moins trois manières différentes: la voie canonique utilisant la  $\beta$ -catenin, la voie du calcium recrutant le facteur de transcription NF-AT et la voie de la polarisation cellulaire impliquée dans les mouvements (Pandur et al, 2002). Nous pouvons donc nous demander dans le cas de l'organisateur de la queue, quelle voie de signalisation est activée par Wnt8a.

Tout d'abord, il a été établi chez le xénope que pour la postériorisation de l'embryon, la signalisation Wnt utilise la voie canonique Dsh/ $\beta$ -catenin (Kiecker et Niehrs, 2001). L'implication de la  $\beta$ -catenin est d'autant plus probable que nous avons observé après sur-expression de Wnt8a maternel l'induction du gène *sqt*. Or il a été montré, dans le contexte de la YSL dorsale, que l'expression de *sqt* était contrôlée par la  $\beta$ -catenin, et que son promoteur possède des sites de fixation au facteur de transcription Tcf/Lef (Sirotkin *et al*, 2000a; Leung *et al*, 2003). Cependant, on ne peut exclure que la voie du calcium soit aussi activée. Concernant la voie de polarisation cellulaire, il ne semble pas qu'elle soit activée dans l'organisateur de la queue puisque ces cellules ne subissent aucun mouvement de convergence et d'extension (Myers *et al*, 2002a).

Au sein de l'organisateur de la queue, nous pouvons supposer que le signal Wnt est transmis vers le noyau par deux signalisations indépendantes et complémentaires par la  $\beta$ -catenin et la voie Wnt.

### **III.3.c Les gènes en aval des signalisations BMP, Nodal et Wnt**

#### **III.3.c.1 Les facteurs de transcription *EveI* et *Caudal***

L'activité des gènes *eveI* et *caudal* est requise dans l'embryon pour la formation des tissus postérieurs (Golling, 2002; nos observations). De plus, nous avons montré que l'activité de ces gènes était requise en aval des Nodal, BMP et Wnt pour la formation d'une queue ectopique.

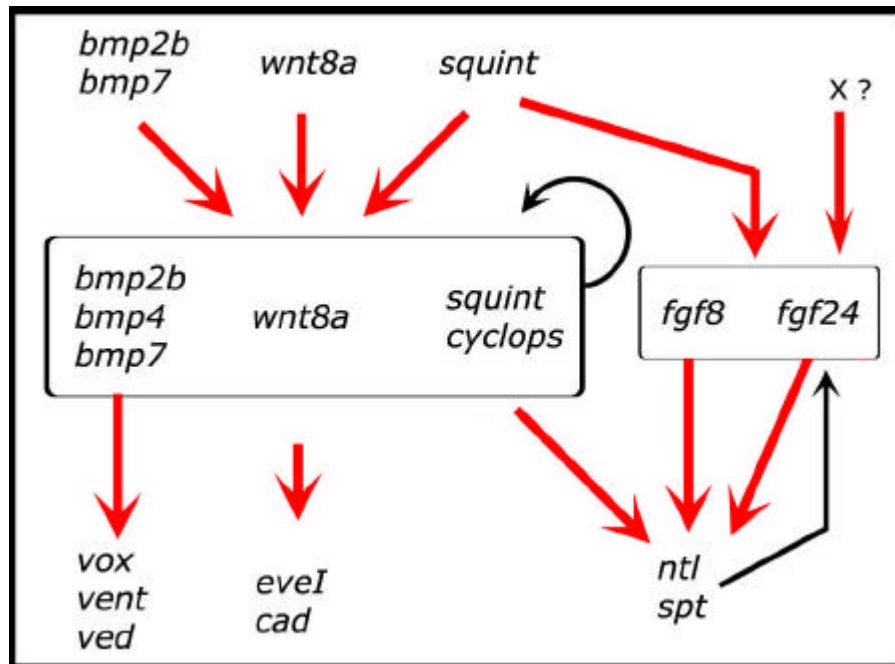
Par ailleurs, les gènes *ved*, *vox* et *vent*, cibles directes de la voie BMP, sont absolument requis pour le développement des tissus non-axiaux. Leur perte de fonction induit des phénotypes similaires aux pertes de fonction de *wnt8a* ou *eveI* (Imai *et al*, 2001; Shimizu *et al*, 2002). Ces facteurs de transcription ont tous une activité de répression essentielle pour l'inhibition de gènes dorsaux (comme *chordin*) (Imai *et al*, 2001; Shimizu *et al*, 2002).

Le rôle de ces différents facteurs de transcription pour la formation des tissus postérieurs reste à être déterminé. Certaines données suggèrent que l'ensemble de ces facteurs contrôlent la taille de l'organisateur de Spemann en réprimant la transcription de certains gènes spécifiques tels que *chordin* (nos observations; Imai *et al*, 2001; Levy *et al*, 2002; Shimizu *et al*, 2002).

#### **III.3.c.2 Les facteurs de transcription "T-box" et la signalisation FGF**

Nous avons montré que *ntl* est essentiel pour l'induction d'une queue secondaire. Plus généralement, l'activité des facteurs de transcription de type T-Box est importante pour le développement de la queue. En particulier, *Ntl/Bra* et *Spt/Tbx16* agissent en synergie pour le développement du mésoderme para-axial du tronc et de la queue (Amacher *et al*, 2002).

Comme nous l'avons cité plusieurs fois, la signalisation FGF joue également un rôle dans la détermination postérieure de l'embryon. Dans les expériences de sur-expression de *Cyclops* et BMP ou de *Wnt8* et BMP au pôle animal, nous avons observé une forte induction de *fgf8* (Fig.22). Chez le poisson zèbre, la double perte de fonction des gènes *fgf8* et *fgf24* bloque complètement la formation du bourgeon caudal (Draper *et al*, 2003). Cette activité des FGF pour la formation de la queue passe entièrement ou en partie par les deux facteurs "T-box" *Ntl* et *Spt* (Draper *et al*, 2003; Griffin et Kimmelman, 2003). Ces derniers maintiennent le niveau d'expression des *fgf8* et *fgf24* formant ainsi une boucle d'autorégulation positive. Pour



**III-Figure 32: Modèle de signalisation**

Au sein des cellules de la marge ventrale, les gènes *bmp2b*, *bmp7*, *wnt8a* et *squint* sont les premiers à être exprimés. Ils activent l'expression des gènes *bmp*, *nodal* et de *wnt8*. Ces trois voies de signalisation maintiennent un haut niveau d'expression des gènes codant pour les ligands et induisent l'expression de différents gènes cibles dont *eveI* et *cad*. Les gènes *vox*, *vent* et *ved* sont directement activés par la signalisation BMP. La signalisation Nodal initie l'expression des gènes *fgf8* et *fgf24* qui régulent à leur tour l'expression des gènes de type "T-box" *ntl* et *spt*, en synergie avec la voie Nodal. Il semble que l'expression des gènes *fgf8* et *fgf24* puissent être induit par un facteur X inconnu, indépendant de Nodal. Par ailleurs l'activité des gènes *spt* et *ntl* est requise pour le maintien de l'expression de gènes *fgf*.

l'instant, il n'est pas clair si les FGF agissent en aval, en parallèle ou en amont des gènes *bmp*, *nodal* et *Wnt8a*.

Chez le poisson, un gain de fonction des voies Wnt ou FGF après la MBT postériorise la plaque neurale (forte induction de gènes postérieurs et répression de gènes antérieurs). L'inhibition de la signalisation FGF suffit à bloquer l'effet postériorisant de Wnt, suggérant que les FGF agissent en aval des Wnt (Kudoh *et al*, 2002). Cependant, l'inhibition de la voie Wnt suffit aussi à bloquer l'effet postériorisant des FGF, indiquant que les Wnt agissent en aval des FGF (Kudoh *et al*, 2002). Le même résultat a été observé chez le xénope (Kazanskaya *et al*, 2000). Ces données montrent que les signalisations Wnt et FGF sont étroitement liées et dépendent l'une de l'autre pour la postériorisation de la plaque neurale. Par ailleurs, chez le poisson, dans des embryons déficients pour la signalisation Nodal, l'expression de *fgf8* n'est plus détectable dans les cellules de la marge en début de gastrulation (M. Fürthauer, communication personnelle; Mathieu *et al*, 2004). Cependant, dans ces mêmes embryons, l'expression de *fgf8* réapparaît en cours de gastrulation (Mathieu *et al*, 2004), indiquant que si l'initiation de son expression dépend de l'activité Nodal, ce gène peut être activé de manière indépendante. De plus, l'expression de *fgf3*, *fgf8* et *fgf24* débute plus tardivement dans les cellules de la marge ventrale que celles de *wnt8a*, *bmp2b* et *znr2*.

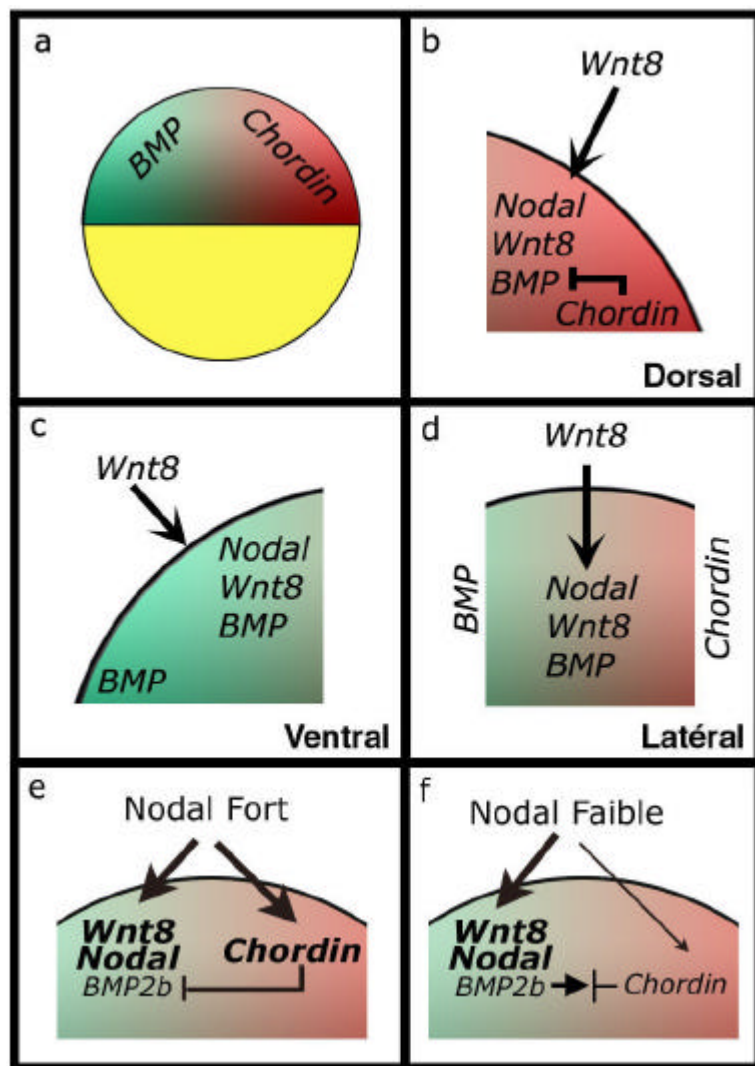
De ces données on peut supposer qu'initialement l'expression des *fgf* est induite par Nodal et que par la suite la signalisation FGF est absolument requise pour la détermination des territoires postérieurs en formant une boucle de régulation positive avec Wnt.

Un modèle récapitulatif incluant l'ensemble de ces données est présenté en Fig.32

### **III.4 Une activité organisatrice tout autour de la marge**

#### **III.4.a Activité de la marge latérale**

Les dernières expériences préliminaires que j'ai présentées dans ce manuscrit montrent que les cellules de la marge latérale possèdent aussi une activité organisatrice, indiquant que toute la marge est le siège d'activités organisatrices. Cependant, l'activité de ces cellules est moins bien définie qu'aux extrémités ventrale et dorsale, puisque les phénotypes observés sont assez variables. Malgré les diverses potentialités organisatrices de ces cellules, il apparaît que les greffes de marge latérale induisent préférentiellement des tissus d'identité intermédiaire de type tronc (cerveau postérieur, vésicule otique, somites et pronéphros), activité peu ou pas repérée dans les greffes de marge ventrale ou dorsale.



### III-Figure 33: La capacité de Wnt8 et de Nodal à induire une queue ectopique dépend d'un niveau d'activité BMP

Au sein d'un embryon en fin de stade blastula, il existe un gradient de signalisation BMP depuis le côté ventral vers le côté dorsal. Dorsalement, les antagonistes de BMP, dont Chordin, sont fortement exprimés et empêchent toute signalisation BMP (a). La sur-expression de Wnt8 au pôle animal induit dans tous les cas l'expression de Nodal, BMP et Wnt8 (b-d). Si le clone est décalé vers le côté dorsal (b), l'activité de Chordin bloque les signaux BMP induits par Wnt8. Les embryons développent préférentiellement une notochorde. Si le clone est situé ventralement (c), la signalisation BMP induite par la sur-expression de Wnt8 est renforcée par les molécules BMP endogènes. Les embryons développent préférentiellement une queue. Enfin, si le clone sur-exprimant Wnt8 est situé en position latérale (d), le niveau de signalisation BMP est faible mais pas nulle car cette zone intermédiaire est l'interface entre les molécules BMP et Chordin endogènes. Les embryons développent à 24h des tissus d'identité intermédiaire de type tronc. La sur-expression de Cyclops à faible et forte doses induit l'expression de *wnt8a*, *nodal* et *bmp2b* (e,f). Cependant, à forte dose, Cyclops induit aussi l'expression de Chordin qui bloque toute activité BMP (e). A faible dose, le niveau de Chordin induit est plus faible et ainsi la signalisation BMP plus élevée (f). Les embryons développent à 24h des structures intermédiaires de type tronc.

Il est cependant nécessaire de réaliser des expériences complémentaires pour multiplier ces résultats, quantifier et analyser par hybridation *in situ* les potentialités exactes des cellules de la marge latérale.

### **III.4.b Caractérisation moléculaire de l'activité organisatrice des cellules de la marge latérale**

Nous avons observé que la sur-expression des facteurs de croissance Wnt8a et Nodal, dans certaines conditions bien précises, peut induire des phénotypes qui ressemblent à ceux générés par les greffes de marge latérale, en particulier la formation de tissus de type cerveau postérieur (avec présence de vésicules otiques).

Concernant l'activité de Wnt8a, nous avons montré qu'il existait une corrélation entre la localisation du clone sur-exprimant Wnt8a au pôle animal et le phénotype obtenu à 24h. Plus le clone adopte une position ventrale, plus la probabilité de développement d'une queue ectopique est élevée. À l'inverse, une localisation dorsale favorise l'émergence d'une notochorde secondaire dans la tête. Latéralement les excroissances sont moins importantes et la duplication des oreilles est plus fréquente. Comme nous l'avons déjà évoqué, il existe aussi un gradient de signalisation BMP le long de l'axe D/V au niveau des cellules du pôle animal. Sur la base de ces résultats, on peut ainsi proposer un modèle dans lequel la sur-expression de Wnt8a induit l'expression des *bmp* et des *nodal* (essentiellement celle de *sqt*):

Si le clone sur-exprimant Wnt8a est situé dorsalement, alors les antagonistes Chordin et Noggin endogènes suffisent à bloquer les BMP produits par le clone. L'effet Nodal domine et une notochorde se développe (Fig.33b).

Si le clone sur-exprimant Wnt8a est situé ventralement, alors la signalisation BMP endogène renforce le signal BMP induit par Wnt8a et, grâce à Squint produit par le clone, une queue ectopique peut se développer (Fig.33c).

Finalement, si le clone est situé latéralement, la signalisation BMP est moyenne et une structure de type intermédiaire (rhombencéphale et pronéphros) est créée (Fig.33d).

Pour la signalisation Nodal, nous avons observé que pour des faibles doses de Cyclops utilisées (2,5pg d'ARNm), la fréquence d'induction de mésoderme axial diminue, alors que la probabilité d'induire le gène *krox20* et de former des vésicules otiques ectopiques augmente (Fig.23 et Table4). Or, la sur-expression de Nodal à de fortes doses (15pg d'ARNm injecté) induit fortement l'expression de *chordin*, et, la simple perte de fonction de Chordin suffit pour permettre à Nodal d'induire une queue secondaire. Nous pouvons donc supposer qu'à des



doses plus faibles de Nodal (2,5pg) l'induction de *chordin* est diminuée ce qui permet un niveau de signalisation *bmp* moyen. Par conséquent, on peut supposer que la différence des phénotypes observés après sur-expression de Nodal à forte et faible doses soit dû, en partie, à une variation du niveau de signalisation BMP (Fig.33e,f).

#### **III.4.c Modèle**

Sur la base de tous ces résultats indépendants, je propose que toutes les cellules de la marge possèdent une activité organisatrice qui est définie par le niveau de signalisation de Nodal, BMP et Wnt8a (Fig.34). En marge dorsale, le niveau d'activité Nodal est élevé, alors que les signalisations BMP et Wnt8a sont bloquées par la présence d'antagonistes spécifiques. En marge ventrale, les trois voies de signalisation sont actives. C'est le niveau maximal d'activité BMP. En marge latérale, les cellules sont stimulées principalement par les voies Nodal et Wnt8a; la signalisation BMP étant à un niveau moyen.



## **IV. Conservation des mécanismes de différenciation postérieure et croissance de la queue**

Même si l'existence d'une queue semble être une particularité des organismes chordés, plusieurs gènes spécifiques du bourgeon caudal ont une expression postérieure conservée entre les vertébrés et les invertébrés.

### **IV.1 Activités organisatrices au sein du bourgeon caudal**

Il a été établi chez l'amphibien et le poulet que la greffe de cellules du bourgeon caudal induit la formation de structures ectopiques d'identité postérieure (Storey *et al*, 1992 ; Gont *et al*, 1993 ; Tucker et Slack, 1995 ; Knezevic *et al*, 1998). Cependant, l'origine exacte (cellules du bourgeon caudal antérieur ou postérieur) des cellules greffées n'avait pas été analysée.

Une étude récente menée chez le poulet a identifié une population de cellules situées au niveau du bourgeon caudal qui possède une activité organisatrice de mésoderme para-axial (Liu *et al*, 2004). Ces cellules participent à la formation du mésenchyme ventral et sont strictement exclues de la charnière chordo-neurale. Ce groupe de cellules semble donc posséder la même activité que les cellules de la marge ventrale chez le poisson zèbre. Cependant, les auteurs n'ont pas analysé si cette activité était détectable plus tôt au cours de la gastrulation (Liu *et al*, 2004).

### **IV.2 Les gènes à identité postérieure**

Les gènes *even-skipped* ont été clonés chez différents invertébrés (arthropodes, nématodes, annélides, oursin) et chordés (amphioxus, ascidie, vertébrés), et leur expression dans les tissus postérieurs est conservée (<http://www.flybase.org/genes/>). La conservation d'expression dans les tissus postérieurs est aussi observée pour les gènes codant pour les facteurs de transcription de type Caudal et "T-box" (Lohnes *et al*, 2003; Pocock *et al*, 2004). Ces observations montrent que l'activité de ces gènes pour le développement des parties postérieures de l'embryon a été conservé, même si l'embryon ne développe pas de queue.

Plus ailleurs, il est intéressant de constater que chez les vertébrés, certains homologues de *even-skipped* s'expriment dans la partie distale des bourgeons de membre. Cela suggère que l'activité de ces gènes est plus généralement requise pour la croissance de différents bourgeons (Niswander et Martin, 1993).

### **IV.3 Conservation des signaux TGFB-Wnt chez les vertébrés**

L'activité des trois voies de signalisation BMP/Nodal/Wnt pour la détermination des structures postérieures semble être conservée chez les Vertébrés. En effet, l'importance des Wnt et des BMP pour la formation de la queue a été démontrée chez la souris par perte de fonction (Winnier *et al.*, 1995; Greco *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 1999; Pinson *et al.*, 2000) et chez le xénope par gain de fonction (Beck et Slack, 1999; Beck *et al.*, 2001). De même, la signalisation Nodal est généralement requise pour la formation de cellules de la marge et du sillon primitif (Whitman, 2001), régions depuis laquelle le bourgeon caudal se forme.

Il est cependant difficile de généraliser l'implication de ces facteurs car le nombre de données expérimentales sur la formation de la queue reste faible.

### **IV.4 Le couple Wnt-Notch**

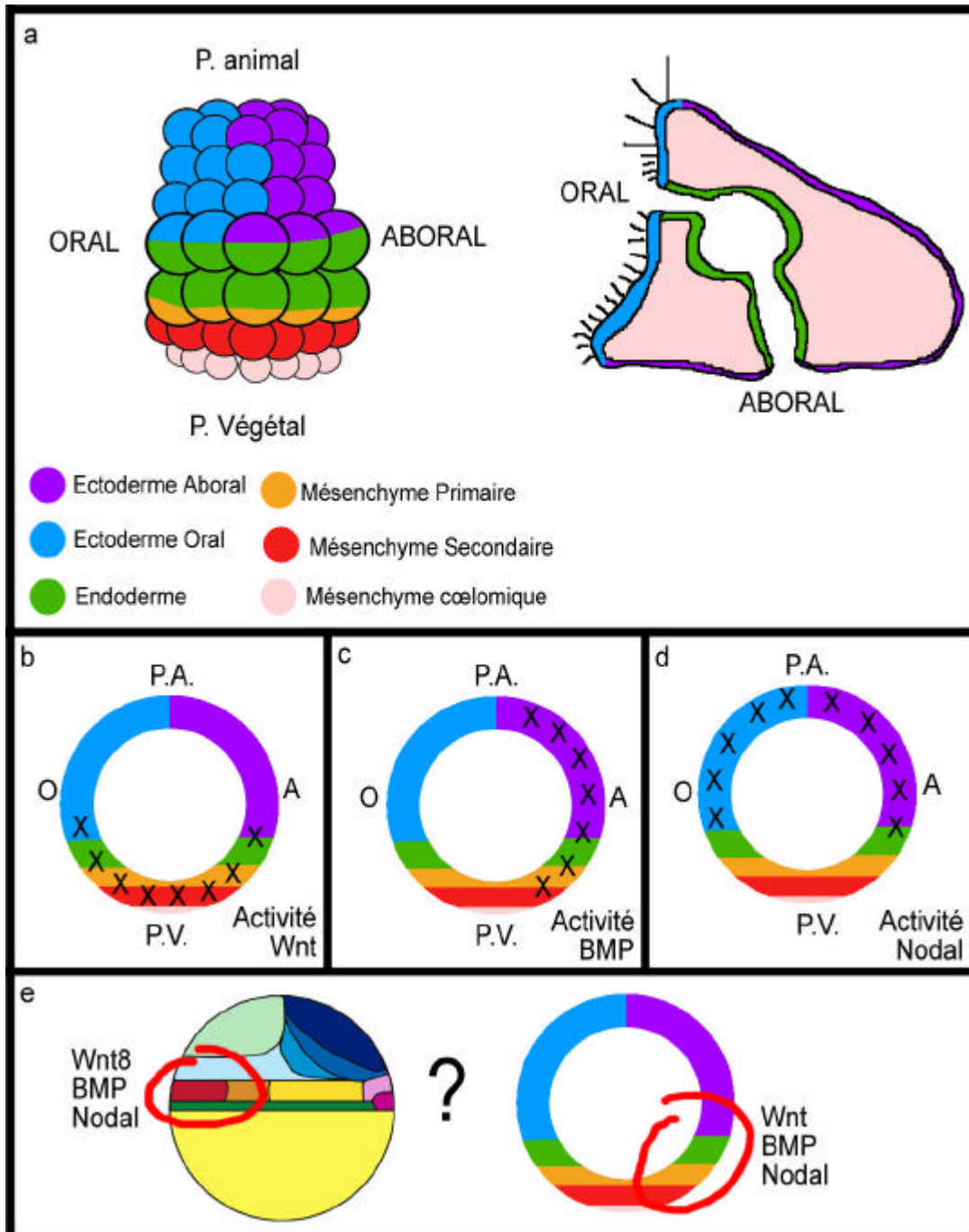
Cependant, certains mécanismes moléculaires impliqués dans la croissance de la queue sont très conservés dans plusieurs organismes vertébrés et invertébrés.

Chez le xénope, l'équipe de J. Slack a montré que les signalisation Wnt et Notch sont impliquées pour la croissance du bourgeon caudal (Beck et Slack, 1998; Beck et Slack, 1999; Beck *et al.*, 2002). Le couple Notch – Delta serait notamment impliqué dans la définition du site de croissance de la queue. L'activité et les domaines d'expression d'homologues des gènes *wnt* et *notch* semblent très conservés chez les deutérostomiens (Holland, 2002).

Ainsi il est possible que l'ancêtre commun des deutérostomiens possédait un système moléculaire impliquant les voies Wnt et Notch ainsi que les facteurs de transcription Even-skipped, Brachyury et Caudal pour contrôler le développement des parties postérieures de l'embryon (Holland, 2002). Il n'y a qu'un pas pour étendre ce modèle à l'ensemble des triblastiques puisque chez certains protostomiens (drosophile et annélide) les gènes *wnt*, *caudal*, *eve* et *bra* sont exprimés dans les tissus postérieurs (Wu et Lengyel, 1998; Arendt, 2001). Cependant, en l'absence de données suffisantes, cette hypothèse ne peut être confirmée.

### **IV.5 Le rôle de Nodal, BMP et Wnt chez l'oursin**

Chez l'oursin, il semble que les signalisations BMP, Nodal et Wnt soient actives très précocement au cours de l'embryogenèse pour la détermination des axes.



### III-Figure 35: Existence d'une zone de superposition des activités BMP, Nodal et Wnt chez l'oursin

Au stade 60cellules, l'embryon d'oursin est organisé selon l'axe animal-végétal et l'axe oral - aboral (a, gauche). Les cellules végétales participent à la formation du mésoderme et de l'endoderme, les cellules animales forment l'ectoderme (a, droite). Au sein de l'embryon d'oursin au stade blastula, les cellules du pôle végétal requièrent une forte signalisation Wnt (b), les cellules du côté aboral sont soumises à une stimulation Nodal et BMP (c,d) et les cellules oral nécessitent un signal Nodal (d). Par conséquent, les cellules végétales - aborales sont stimulées par les signalisations Nodal, BMP et Wnt, ce qui rappelle la triple stimulation des cellules de la marge ventrale chez le poisson zèbre (e).

Au cours du développement de l'oursin, il existe deux axes embryonnaires: l'axe animal - végétal et l'axe oral - aboral qui sont perpendiculaires au stade 60-cellules, un peu à la manière des axes D/V et A/V chez le poisson zèbre (Fig. 35a). Les cellules les plus végétales vont former l'endoderme et le mésoderme. Il a été clairement établi que l'axe animal - végétal est déterminé par un signal Wnt provenant des cellules les plus végétales (Fig.35b; Angerer et Angerer, 2000). L'axe oral - aboral est déterminé par l'activité un gène homologue des *bmp*, *bmp2/4*. Bien qu'il soit exprimé dans les cellules de l'ectoderme du côté oral, sa sur-expression induit une identité de type aborale (Fig.35c; Angerer *et al*, 2000).

Dans une étude récente, l'équipe de T. Lepage a cloné un homologue de *nodal* chez l'oursin et montré que sa perte de fonction perturbe à la fois les identités orale et aborale de l'embryon (Fig.35d; Duboc *et al*, 2004). De plus, les auteurs montrent que l'activité endogène de BMP2/4 est requise pour la mise en place du côté aboral.

Ainsi il semble que les cellules situées au pôle végétal du côté aboral nécessitent la stimulation des voies de signalisation Nodal, BMP et Wnt. Ces cellules participent à la formation du mésoderme et de l'endoderme dans la région aborale.

Le parallèle avec les cellules de la marge ventrale est assez frappant. Chez le poisson zèbre, les gènes Nodal sont requis pour la mise en place des cellules dorsales et ventrales et les BMP pour la détermination ventrale, où il existe une forte signalisation Wnt à la marge. Il est donc tentant de proposer que les cellules de la marge ventrale du poisson et les cellules végétales - aborales sont topologiquement équivalentes (Fig.35e). Des études complémentaires chez l'oursin pourraient permettre d'éclaircir ce point.

## **V. Conclusion**

Nous avons démontré que les cellules de la marge ventrale possèdent une activité organisatrice des tissus non-axiaux de la queue qui fonctionne de manière indépendante de l'organisateur dorsal de Spemann. Cette activité est déterminée par la triple stimulation des voies BMP, Nodal et Wnt8a.

Nous avons observé que l'activité organisatrice des cellules de la marge est continue le long de l'axe D/V et repose essentiellement sur une variation de l'activité BMP.

**La Java du caniveau**  
(Eric TOULIS)

Voici l'histoire bien ordinaire  
Qui m'est arrivée cet hiver.  
Cette histoire, c'est un peu la vôtre  
Car elle n'arrive pas qu'aux autres.  
Un jour, le grand patron m'a dit :  
« Vous passerez m'voir à mon bureau,  
Monsieur Machin. On vous r'mercie ! »  
Et j'ai jamais retrouvé d'boulot.  
Une compression de personnel  
Fut mon dernier cadeau de Noël.  
Alors tout s'est accéléré :  
Mon existence a basculé.  
Depuis j'habite rue de Null'Part,  
Comm' ça, ça m'est tombé dessus.  
Certains choisissent d'être clochard,  
Moi j'ai pas choisi d'être à la rue.

Refrain :  
Ça s'est passé en moins d'six mois,  
Avant je vivais comme toi.  
Maintenant je dors dans un caniveau  
Avec mes sacs et mon manteau.

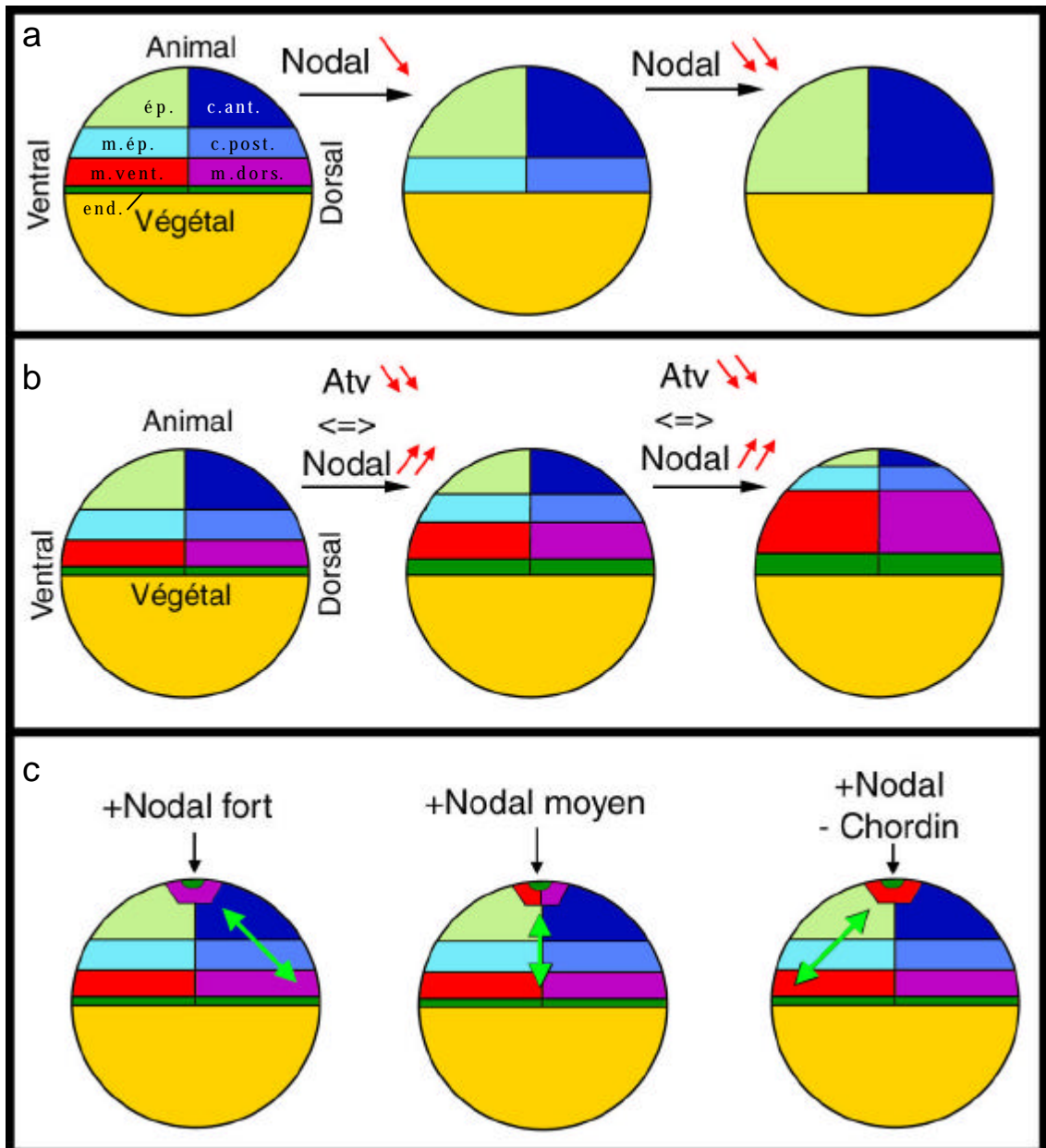
Les règles du grand capital  
M'ont tout volé, mêm' le vital.  
Le nécessaire avant l'envie :  
Ma vie est devenue la survie.  
Ma maison, c'est un carton  
D'emballage Ikea.  
C'est là que j'bossais comme un con,  
Avant qu'ils aient plus besoin d'moi.  
« J'ai faim » marqué sur un panneau,  
Je fais l'mendiant dans le métro.  
Ça fait bizarre, je vous assure,  
D'plus voir les gens, mais leurs  
chaussures.  
Et croyez pas que ça m'amuse  
De devoir faire le p'tit numéro  
Du « Messieurs-dames, je m'excuse,  
Une pièce ou un ticket-resto. »

Refrain

Les grandes vacances toute l'année  
Et les joies du camping forcé,  
Je vous l'souhaite pas mais méfiez-vous,  
Un jour, ça tombera pt'êt' sur vous.  
Peut-êt' qu'un jour, ce sera vot' tour  
D'aller crever aux pieds des tours,  
L'œil ébloui par la lumière  
Des grands fabricants de misère.  
Les belles multinationales  
Qui font des pauvres et des maudits,  
Des millions d'gens qui crèvent la dalle  
Pour la cinglerie du profit.  
Et quand arrivera l'euro,  
Vous n'en verrez pas la couleur.  
Ce seront les mêmes qu'en auront d'trop  
:  
« Messieurs, mesdames. A vot' bon cœur  
! »

Refrain

Alors vous vivrez l'aventure  
Que vivent les nouveaux clodos,  
Car dans la rue, la vie est dure.  
La rue, ça fait pas de cadeaux.  
Assis sur le banc de touche,  
Non, vous n'aurez pas le choix :  
On vous mènera d'force à la douche,  
Et que vous soyez sale ou pas !  
Pour conserver bonne apparence,  
Vous vous raserez tous les matins.  
Mais les jours de grande affamance,  
Vous volerez les grands magasins.  
A un feu rouge, pour dix francs,  
A des gens tous indifférents,  
Vous serez vendeur du « Lampadaire »,  
L'hebdomadaire de la galère..



### Discussion - Figure1: Les axes D/V et A/V sont indépendants

A: la perte de fonction de Nodal abolit la formation des territoires le long de l'axe animal-végétal sans perturber la régionalisation le long de l'axe dorso-ventral. B: La perte de fonction des antagonistes Antivin (Atv) augmente le niveau de signalisation Nodal depuis la marge. Cela conduit à une augmentation de tous les territoires de la marge sans modifier la régionalisation D/V. c: Sur-expression de Nodal au pôle animal. La sur-expression de Nodal à forte dose induit une identité de type marge dorsale (c, à gauche) et à faible dose, une identité de marge latérale (c, au milieu). La sur-expression de Nodal dans des embryons dépourvus de Chordin induit une identité de type marge ventrale (c, à droite). Les dessins représentent tous une carte des territoires présomptifs en fin de stade blastula (50% epibolie) en vue latérale, côté dorsal à droite. Abréviations: ép.=épiderme; c.ant.=cerveau antérieur; c.post.=cerveau postérieur; m.ép.=moëlle épinière; m.vent.=mésoderme ventral; m.dors.=mésoderme dorsal; end.=endoderme.

# DISCUSSION

## I. Coordonnées spatiales des cellules au sein de l'embryon en début de gastrulation

En introduction, nous avons souligné que la mise en place des axes embryonnaires dorso-ventral et animal-végétal se faisait de manière indépendante chez le poisson zèbre. À partir de ces observations, nous avons postulé que les cellules au sein de l'embryon en fin de blastula étaient déterminées par deux coordonnées le long des axes D/V et A/V (Intro-Fig.17). De plus, les valeurs de ces coordonnées sont définies par des niveaux de signalisation BMP et Nodal indépendants (Intro-Fig.17).

Les résultats que j'ai obtenus pendant ma thèse m'ont permis de confirmer et d'affiner ce modèle.

### **I.1 Indépendances de axes dorso-ventral et animal-végétal**

Chez le poisson zèbre, il a été établi que la perte de fonction de la signalisation Nodal conduisait à l'absence de dérivés endodermiques et mésodermiques (Feldman *et al*, 1999 ; Gristman *et al*, 1999 ; Thisse *et al*, 2000) sans affecter la régionalisation des cellules le long de l'axe dorso-ventral (Fig.1a). Cependant, les résultats obtenus jusqu'alors par gain de fonction indiquaient que la signalisation Nodal déterminait préférentiellement les cellules de la marge dorsale (Rebagliati *et al*, 1998, Gristman *et al*, 2000).

En réalisant la perte de fonction des gènes *atv1* et *atv2*, j'ai induit une augmentation de la signalisation Nodal depuis leur site endogène de production que sont les cellules de la marge. Dans ces conditions, j'ai observé grâce à plusieurs marqueurs moléculaires que la taille de l'endoderme et du mésoderme augmentait en direction du pôle animal sans que leur régionalisation ne soit affectée le long de l'axe D/V (Fig.2b). De même, l'ectoderme est réduit en taille (en direction du pôle animal) mais les différentes régions sont correctement déterminées. *Ces résultats indiquent clairement qu'un gain d'activité Nodal augmente la taille de toute la marge sans modifications le long de l'axe dorso-ventral.*

Dans la troisième partie de mon manuscrit, j'ai aussi approché cette question en sur-exprimant Cyclops/Znr1 au pôle animal, région éloignée de toute activité Nodal endogène qui pourrait influencer le comportement des cellules. J'ai observé que la sur-expression de Cyclops à forte

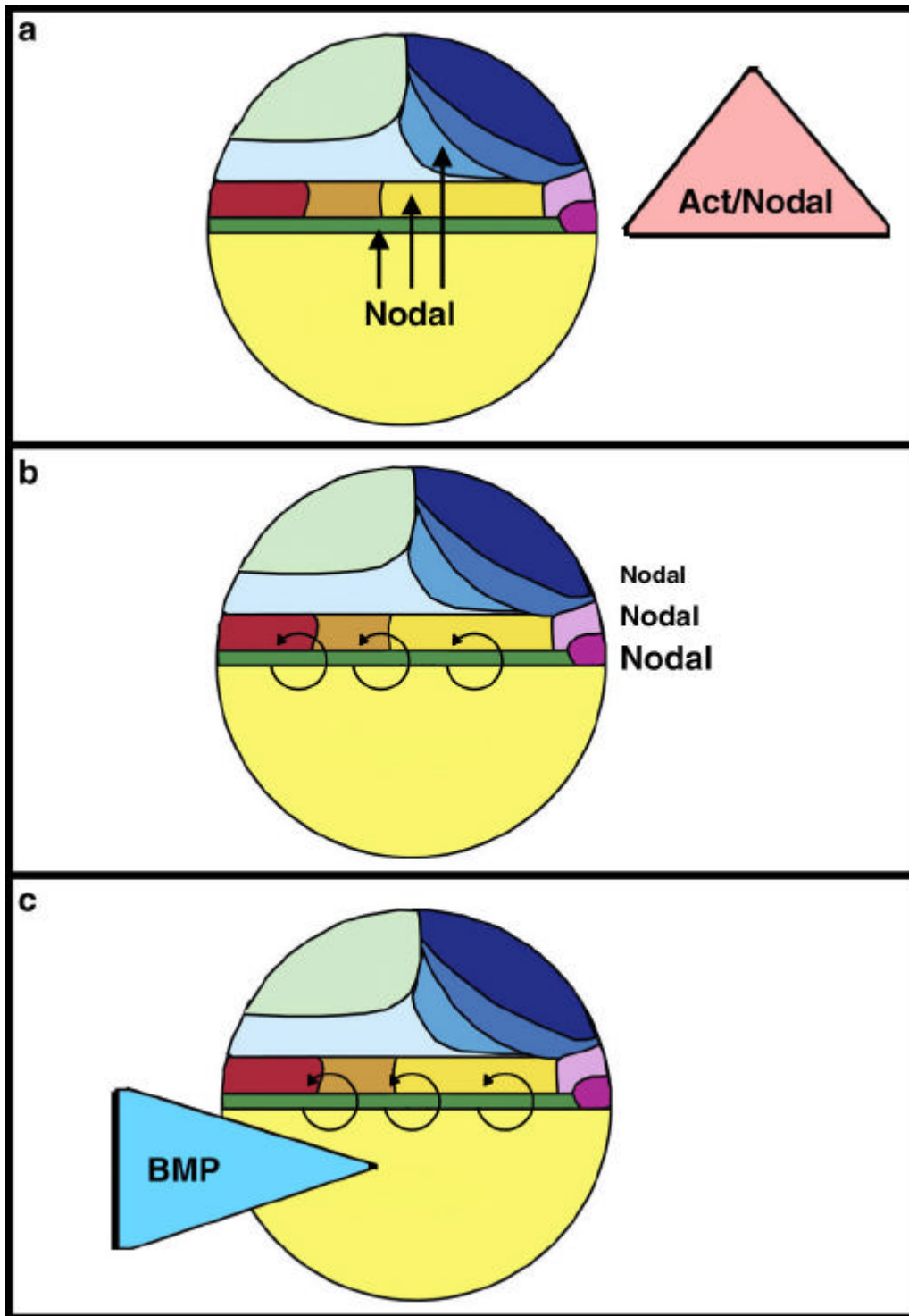
et faible dose conduit les cellules du pôle animal vers une identité de type marge dorsale ou marge latérale, respectivement (Fig.1c). De plus, la simple perte de fonction d'un antagoniste de BMP (Chordin) suffit pour permettre à Cyclops d'induire une identité de type marge ventrale. Comme nous l'avons déjà évoqué, dans tous les cas la signalisation Nodal est bien active (induction de gènes cibles spécifiques de la signalisation Activin/Nodal), et seul change le niveau de signalisation BMP (voir Partie III-Fig.34). Par conséquent, il semble que la signalisation Nodal puisse induire toutes les identités cellulaires autour de la marge quelle que soit la position le long de l'axe D/V, qui est déterminée de manière indépendante par la signalisation BMP.

*En conséquence, ces deux approches distinctes confirment que :*

- (1) la signalisation Nodal détermine bien l'identité des cellules le long de l'axe animal-végétal ;*
- (2) les signalisations BMP et Nodal coopèrent de manière indépendante au niveau des cellules de la marge pour déterminer l'identité des cellules le long des deux axes.*

Les liens étroits entre la voie Nodal et la mise en place des axes D/V et A/V ont été en partie expliqués grâce à des observations réalisées chez le xénope. En effet, l'équipe de M. Whitman a analysé le niveau d'activation de la voie Activin/Nodal dans les cellules de l'embryon en observant directement l'état de phosphorylation de la molécule Smad2, située en aval des récepteurs de l'Activin (Faure *et al*, 2000 ; Lee *et al*, 2001). Les résultats de ces expériences ont montré qu'il existait réellement un gradient de signalisation Activin/Nodal le long de l'axe animal-végétal (c'est-à-dire un gradient de phosphorylation de Smad2 dirigé du pôle végétal vers le pôle animal). Cependant, les auteurs de cette étude ont observé qu'en fonction du stade testé, le niveau de phosphorylation de Smad2 n'était pas le même le long de l'axe dorso-ventral. En fin de stade blastula, le signal est d'abord détecté dans les cellules dorsales, puis tout autour de la zone marginale, pour finalement se concentrer exclusivement dans la zone ventrale en début de gastrulation. Ces résultats montrent donc qu'il existe un gradient de signalisation Nodal le long de l'axe animal-végétal qui évolue le long de l'axe D/V au cours du temps. Une telle différence de niveau de signalisation le long de l'axe dorso-ventral a été aussi observée chez le poisson zèbre (Dougan *et al*, 2003).





**Discussion-Figure2: Détermination de l'endoderme.**

La signalisation Nodal détermine les cellules le long de l'axe animal végétal, la plus forte activité définissant les cellules de l'endoderme (a). La stimulation graduelle des cellules par Nodal induit l'expression de casanova dans les cellules de l'endoderme qui maintient un haut niveau de signalisation Nodal (b). Perpendiculairement, la signalisation BMP régionalise les cellules de l'endoderme le long de l'axe dorso-ventral (c). Tous les dessins représentent la carte des territoires présomptifs d'un embryon en fin de stade blastula en vue latérale, côté dorsal à droite.

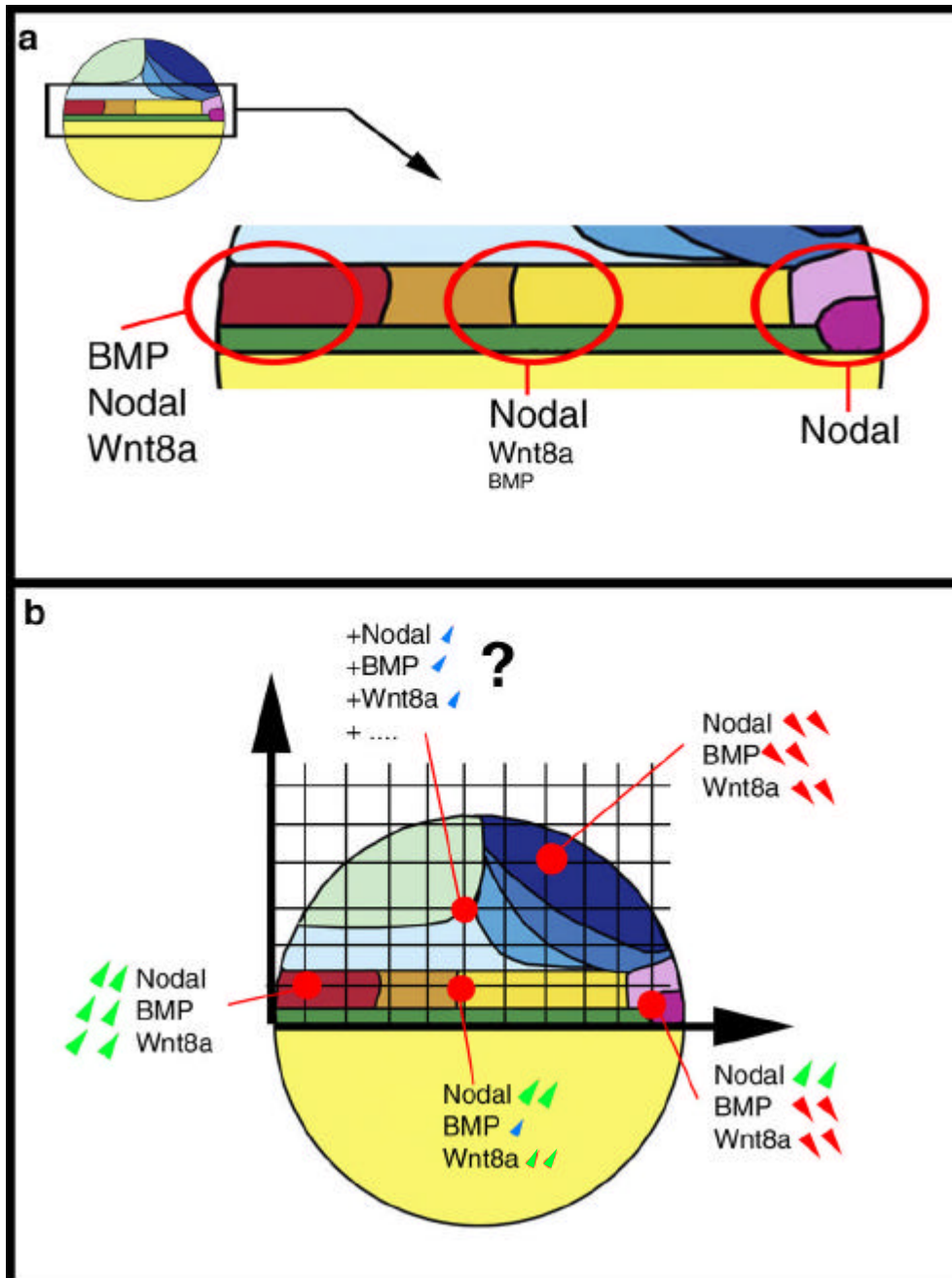
## **I.2 Les cellules les plus végétales ont un niveau de signalisation Nodal élevé**

Il a été démontré que les feuilletts embryonnaires étaient déterminés le long de l'axe animal-végétal par la signalisation Nodal selon un gradient d'activité dirigé vers le pôle animal (Thisse *et al*, 2000 ; Dougan *et al*, 2003), les cellules situées les plus à la marge de l'embryon requérant la plus forte stimulation Nodal (Fig.2a). Cette propriété des facteurs Nodal est explicable en partie par l'aptitude de Squint/ZNR2 à diffuser et à induire différents destins cellulaires à différentes concentrations (Chen et Schier, 2001).

Par l'étude du facteur de transcription Casanova, j'ai observé quel mécanisme moléculaire était mis en jeu pour assurer un haut niveau de signalisation Nodal dans les cellules l'endoderme. En effet, j'ai montré que Casanova régule de manière positive l'expression des gènes Nodal (essentiellement celle de *squint*). De plus, j'ai observé que la sur-expression de Casanova dans des embryons déficients pour la voie Nodal ne permet pas le maintien du programme de différenciation de l'endoderme, suggérant que l'activité des Nodal est absolument requise en aval de Casanova pour assurer la boucle de rétroaction et maintenir la différenciation de l'endoderme.

*Par conséquent, la voie Nodal active un ensemble de gènes cibles dans les cellules de la marge. Seules les plus marginales expriment le gène casanova (certainement par un système d'inhibition latérale faisant intervenir la voie Notch-Delta) ce qui permet de maintenir un niveau de signalisation Nodal élevé dans ces cellules (Fig.2b).*

De plus, en sur-exprimant Casanova à diverses positions autour de la marge, j'ai observé que la différenciation d'une cellule en endoderme n'affecte pas la régionalisation des cellules le long de l'axe D/V. En effet, même si les cellules de la marge sur-exprimant Casanova adoptent une identité endodermale, elles se comportent de la même manière que les cellules de l'endoderme endogène. Par conséquent ces observations indiquent que l'identité des cellules le long de l'axe dorso-ventral n'est pas modifiée si l'on perturbe les destins cellulaires le long de l'axe animal-végétal (ex : transformation des cellules du mésoderme en endoderme). Or comme l'activation de *casanova* est sous la dépendance des Nodal et la régionalisation de l'endoderme le long de l'axe D/V sous la contrôle de la signalisation BMP (Tiso *et al*, 2002), ces données montrent une nouvelle fois que les signalisations BMP et Nodal fonctionnent de manière indépendante (Fig.2c).



### Discussion - Figure 3: Modèle de coordonnées de position

A: Une forte stimulation de Nodal, BMP et Wnt8a reproduit l'identité de la marge ventrale. Une stimulation forte de Nodal et Wnt8a et faible de BMP détermine les cellules de la marge latérale. La seule stimulation des cellules par Nodal détermine une identité de marge dorsale. B: Le modèle des coordonnées de position est vérifié pour les cellules de la marge ainsi que pour les cellules du pôle animal dorsal. Pour le reste de l'ectoderme, cela reste à démontrer.

### **I.3 Détermination des cellules de la marge par intégration des voies de signalisation BMP, Nodal et Wnt8**

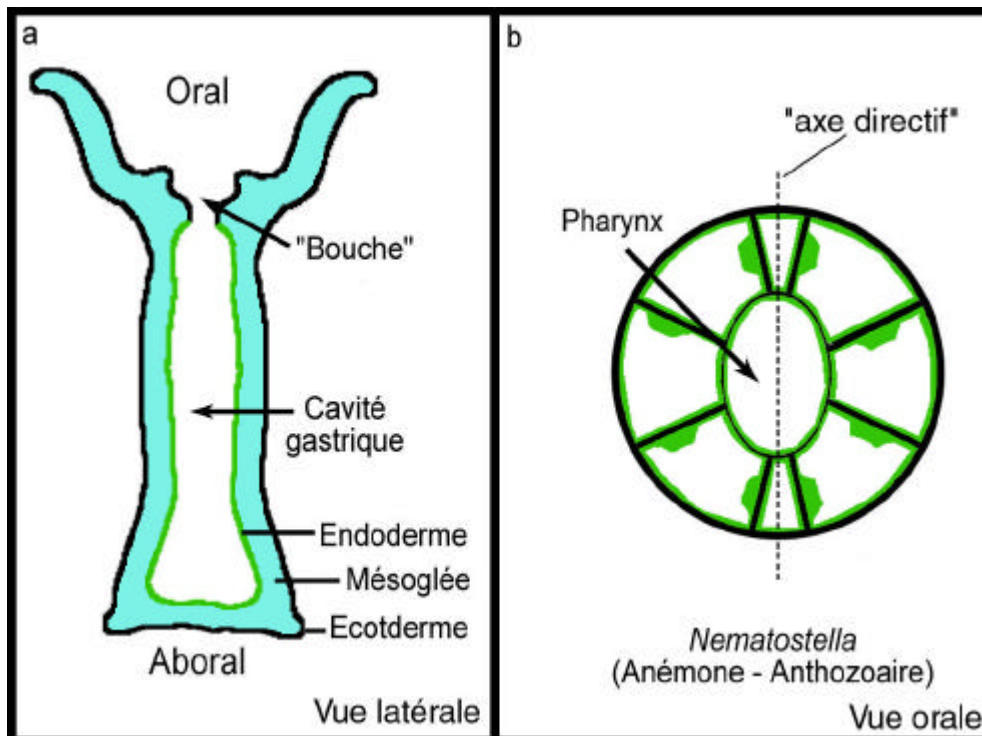
Dans la dernière partie de ce manuscrit, j'ai observé que les cellules de la marge ventrale possèdent une activité de centre organisateur de la queue qui fonctionne de manière indépendante du centre organisateur dorsal de Spemann. J'ai montré que l'activité de ces cellules est déterminée par un haut niveau de signalisation BMP, Nodal et Wnt8a.

Par des expériences de sur-expression et de greffes, j'ai aussi montré que la sur-expression d'une forte dose de Nodal mimait l'activité des cellules de la marge dorsale. De même, les résultats préliminaires que j'ai obtenus suggèrent fortement que l'activité des cellules de la marge latérale soit mimée par la sur-expression de Wnt8 et de Cyclops avec des doses de BMP plus faible qu'en marge ventrale (Fig.3a). Par conséquent avec des combinaisons de ces trois facteurs de croissance, il est possible de recréer artificiellement des propriétés détenues par les cellules de la marge.

Ces résultats sont particulièrement importants car ils suggèrent que sur la base du modèle des coordonnées spatiales, il est possible de définir les niveaux de signalisation Nodal, BMP et Wnt8a requis pour une identité cellulaire bien précise. Pour l'exemple des cellules de la marge ventrale, le modèle des coordonnées spatiales aurait proposé que les cellules étaient soumises à une forte signalisation Nodal (puisqu'elles se trouvent à la marge) et une forte signalisation BMP (puisqu'elles sont situées ventralement) (Fig.3b). Par l'expérience, nous avons montré que la sur-expression de Nodal et de BMP à forte dose reproduit en effet l'identité des cellules de la marge ventrale de manière ectopique.

*Par conséquent ces résultats indiquent que le modèle des coordonnées spatiales est correct au moins pour les cellules de la marge (Fig.3b).*

Nous pouvons nous demander si ce modèle est valable aussi pour les cellules de l'ectoderme. Serait-il possible de reproduire de manière artificielle le destin d'une population cellulaire de l'ectoderme par la combinaison des différents facteurs que nous avons utilisés (Fig.3b) ? Certains résultats suggèrent que ce soit le cas. En effet, il a été établi que les cellules du pôle animal étaient dépourvues de toute activité BMP, Nodal et Wnt (Piccolo *et al*, 1999). De plus, par sur-expression de Nodal et de Wnt8a, nous avons observé fréquemment l'induction de vésicules otiques ectopiques. Ces inductions sont-elles le fruit d'une transformation du système nerveux antérieur ou résultent-elles d'une induction spécifique des cellules de la placode otique présomptive? Pour obtenir plus d'informations sur cette question, il faudrait



**Discussion - Figure 4: Existence d'axes de symétrie supplémentaires chez les cnidaires**

a: De manière schématique, la plan d'organisation des cnidaire est organisé selon l'axe oral-aboral et l'animal possède une symétrie radiale autour de cette axe. La parois de l'animal est composé d'un ectoderme et d'un endoderme séparé par la mésoglée, matrice extracellulaire dans laquelle existe quelques cellules. b: L'observation attentive de certaines espèces de cnidaires montre qu'il peut exister d'autres axes de symétries chez ces animaux. Par exemple, chez l'anémone *Nematostella vectensis*, en vue orale on peut remarquer qu'il existe des cordons mésentériques organisés autour de la bouche. Cependant cette organisation n'est pas symétrique autour d'un axe, mais selon un plan, appelé axe directif, perpendiculaire à l'axe oral-aboral.

réaliser des expériences complémentaires. Il faudrait, par exemple, tester s'il est possible d'induire du rhombencéphale (avec des vésicules otiques) de manière ectopique dans un territoire non-neural.

Par ailleurs, notre modèle des coordonnées spatiales de départ était très simpliste car il n'intégrait que les signalisations BMP et Nodal. Nous avons observé avec l'exemple des cellules de la marge ventrale que l'activité de Wnt8a est absolument requise pour déterminer ce territoire. Par conséquent, l'un des objectifs futurs est d'arriver à intégrer différentes voies de signalisation, comme la voie FGF, Hedgehog ou de l'Acide Rétinoïque, pour essayer d'affiner le contrôle de la détermination des cellules.

## **II. L'apparition des *Bilateria*: développement de nouvelles interactions?**

Comment les processus moléculaires que nous étudions dans des organismes triblastiques peuvent-ils nous renseigner sur les mécanismes qui ont permis la radiation des *Bilateria* ? Pour permettre de proposer des hypothèses sur ces processus, il est nécessaire d'analyser les mécanismes qui gouvernent le développement des organismes diblastiques.

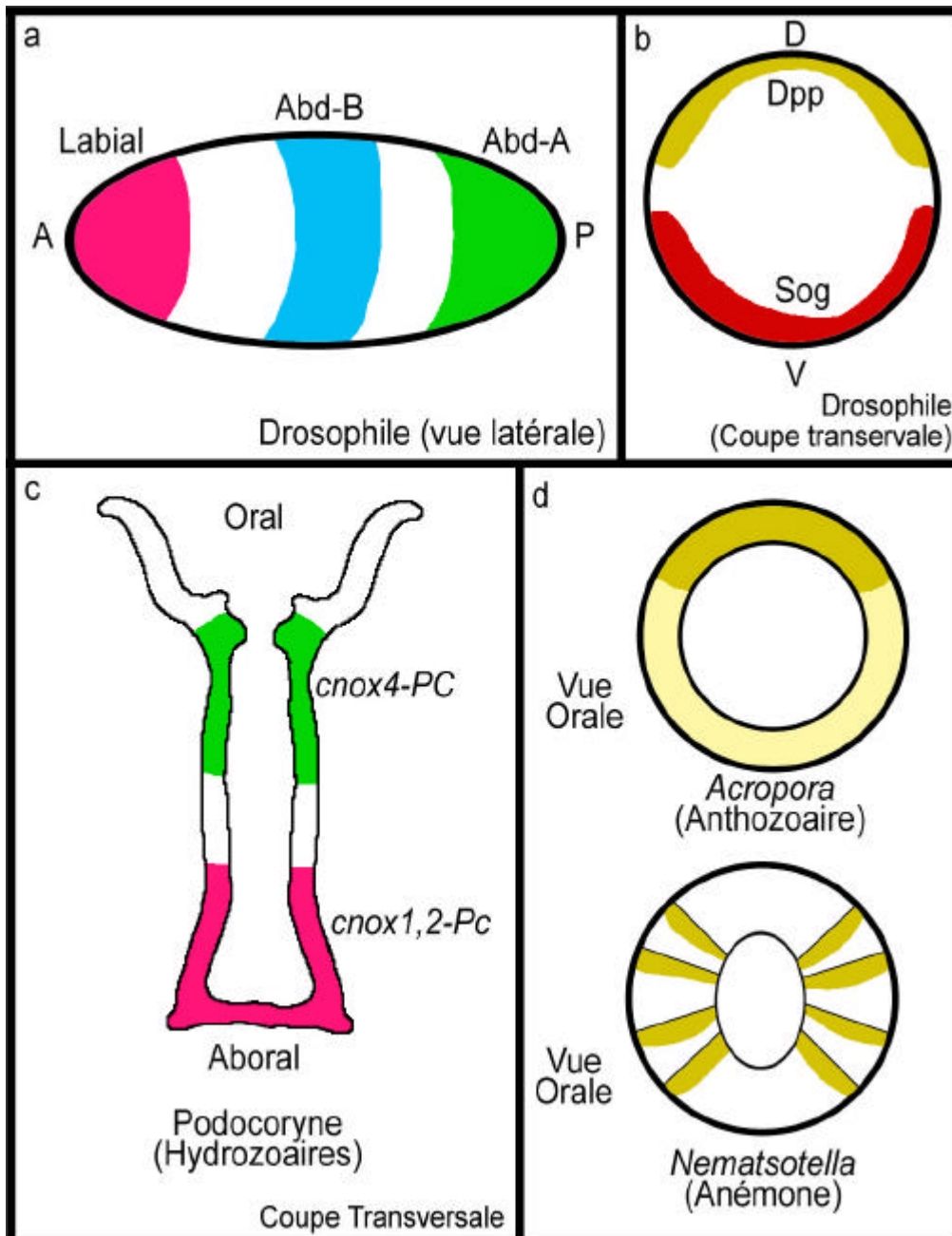
### **II.1 Les cnidaires, "des *Bilateria* en attente"?**

Récemment les études moléculaires sur des espèces de diblastiques ont permis d'envisager d'une manière différente l'apparition du mésoderme

#### **II.1.a Observations morphologiques**

Comme nous l'avons évoqué en introduction, les Cnidaires sont classiquement considérés comme diblastiques avec un axe de symétrie radiale le long de l'axe oral - aboral (Fig.4a). Ils constituent un embranchement du règne animal dit « primitif » dépourvus des caractéristiques des triblastiques. Cependant, l'observation attentive de l'organisation interne de certains Cnidaires souligne que cette vision est peut-être trop réductrice.

En effet, certaines espèces, comme l'anémone de mer *Nematostella vectensis*, possèdent un ou plusieurs plans de symétrie perpendiculaires à l'axe oral - aboral (Fig.4b). Ce nouvel axe,



### **Discussion - Figure 5: Existence de régionalisation chez les cnidaires**

Chez les triblastiques, les gènes *hox* sont impliqués dans la régionalisation le long de l'axe A/P. Chez la drosophile par exemple, les gènes *hox* s'expriment dans différents domaines spécifiques le long de l'axe A/P (a). C'est le cas, par exemple, des gènes *labial*, *abdominal-B* et *abdominal-A* qui s'expriment respectivement dans les cellules antérieures, médianes et postérieures (a). Chez la drosophile, le côté dorsal est mis en place par des ligands TGF $\beta$ , comme *dpp*, dont l'activité est contrée par des antagonistes secrété comme *sog* (b). Chez certains cnidaires, les gènes *hox* sont exprimés dans des domaines spécifiques le long de l'axe oral - aboral. Par exemple, chez le corail *Podocoryne*, alors que les gènes *cnox1,2-Pc* s'expriment dans la région aborale, le gène *cnox4-Pc* s'exprime dans la région orale (c). Chez certains cnidaires, l'expression de l'homologue de *dpp* est asymétrique autour de la région orale (d). Chez *Acropora*, *dpp* s'exprime tout autour de la bouche mais plus fortement d'un côté (d en haut). Chez *Nematostella*, *dpp* s'exprime dans des structures mésentériques tout autour de la bouche (d en bas). Cette expression est symétrique selon un plan et pas selon un axe.

appelé axe directif, est organisé perpendiculairement à l'axe oral-aboral, comme l'axe dorso-ventral par rapport à l'axe antéro-postérieur des triblastiques.

En plus de ces asymétries, de nombreux spécimens de Cnidaires possèdent des cellules à caractère mésodermique comme des cellules musculaires (Martindale *et al*, 2002; Finnerty, 2003).

Ainsi la présence de plusieurs axes de symétrie et de cellules du mésoderme ne sont plus l'apanage des *Bilateria*. Cependant, on peut toujours se demander si ces caractères résultent d'une convergence (acquisitions indépendantes après la séparation Cnidaire - *Bilateria*) ou s'ils sont réellement homologues.

### **II.1.b Données moléculaires**

Des réponses plus précises ont été apportées par le clonage des homologues Cnidaires de différents gènes jouant un rôle au cours du développement des *Bilateria* (Technau, 2003; Finnerty, 2003; Martindale *et al*, 2004).

Il est apparu que les Cnidaires disposent d'une grande partie des gènes utilisés par les *Bilateria* au cours de la différenciation du mésoderme ainsi que pour la mise en place des axes antéro-postérieur et dorso-ventral.

#### **II.1.b.1 Détermination des axes embryonnaires**

Chez les *Bilateria*, la régionalisation selon les axes A/P et D/V est sous le contrôle des gènes *hox* et *dpp/bmp* (Fig.5a,b). Plusieurs homologues de ces gènes ont été clonés chez les Cnidaires. Ainsi ces gènes sont apparus au cours de l'évolution avant la séparation Cnidaires-triblastiques. Cependant possédaient-ils la même fonction chez l'ancêtre commun ?

L'observation du patron d'expression de certains gènes suggère qu'en plus d'une conservation de séquence, leur rôle est le même chez les Cnidaires. En particulier, chez certaines espèces, les gènes *hox* possèdent aussi un patron d'expression régionalisé le long de l'axe oral - aboral (Fig.5c; Masuda-Nakagawa *et al*, 2000; Yanze *et al*, 2001; Finnerty *et al*, 2003), indiquant une possible homologie entre l'axe antéro-postérieur des *Bilateria* et l'axe oral-aboral des Cnidaires.

De manière très intéressante, l'homologue de *dpp* s'exprime de manière asymétrique autour de région orale selon un patron d'expression étroitement lié à l'axe directif (Fig.5d; Hayward *et al*, 2002; Finnerty *et al*, 2003).



Ces observations montrent que les molécules jouant un rôle pour la détermination des axes embryonnaires chez les *Bilateria* étaient déjà présents dans le génome chez l'ancêtre commun avec les Cnidaires. De plus, puisque la régulation spatiale de leur expression est en partie conservée chez les cnidaires, il est possible qu'ils jouaient un rôle équivalent chez cet ancêtre commun. On peut imaginer que les gènes *hox* déterminaient la régionalisation des cellules le long de l'axe oral-aboral et les gènes *dpp* définissaient l'axe directif.

*Par conséquent, on ne peut pas expliquer la radiation des Bilateria par l'apparition des gènes impliqués dans la détermination des axes embryonnaires.*

### **II.1.b.2 Les gènes spécifiques du mésoderme**

En plus de ces observations fascinantes, plusieurs études ont montré que certains gènes impliqués dans la détermination du mésoderme chez les triblastiques étaient conservés chez les Cnidaires. Pour la majorité d'entre eux, ils sont exprimés dans les cellules de l'endoderme présomptif (Technau, 2003; Martindale *et al*, 2004). C'est le cas notamment les homologues des gènes de type Gata, Twist, Snail, Bra/T, ou Forkhead, dont l'activité est requise chez les triblastiques pour la formation de dérivés mésodermiques.

*Par conséquent l'ancêtre commun aux Bilateria et aux cnidaires possédait de nombreux « gènes du mésoderme » qui étaient probablement exprimés dans les cellules de l'endoderme. Ces observations renforcent l'hypothèse de l'origine du mésoderme à partir de l'endoderme (Stainier, 2002). Par conséquent, l'apparition des « gènes du mésoderme » n'explique pas la radiation des Bilateria au cambrien.*

### **II.1.b.3 Les grandes familles des gènes**

Ainsi, la radiation des *Bilateria* ne peut s'expliquer par l'apparition des « gènes du mésoderme » ou des gènes impliqués dans la mise en place des axes embryonnaires. On peut alors se demander si ce processus ne s'est pas déroulé grâce à l'apparition de nouveaux facteurs de croissance ou de nouvelles familles de molécules.

Cependant, l'analyse phylogénétique de différentes familles de gènes codant pour des facteurs de croissance ou des protéines impliquées dans la transduction du signal montre que leur apparition s'est faite bien avant la séparation entre les diblastiques et les triblastiques. C'est le cas des gènes codant pour des TGF $\beta$ , des Wnt, des récepteurs à activité Kinase (Ser/Thr ou Tyr) ou pour les enzymes Protéine Kinase C et Phospholipase C (Miyata et Suga, 2001).

### **II.1.c Implications évolutives**

*De l'ensemble de ces observations, nous pouvons conclure que:*

*(1) la diversification des gènes n'explique pas la diversification des plans d'organisation observée au Cambrien*

*(2) l'ancêtre commun aux Bilateria et aux Cnidaires possédait la majorité des voies de signalisation et gènes impliqués dans la mise en place des axes et du mésoderme.*

Pour qualifier les Cnidaires, S. Conway-Morris a proposé la formule de "*Bilateria en attente*". Ils semblent que ces organismes possèdent tous les « outils » mais ne disposent pas du « manuel » pour les utiliser (Conway-Morris, 2003).

La même comparaison a été faite pour l'*Amphioxus* (« vertébré en attente ») qui possède de nombreuses caractéristiques moléculaires de Vertébrés mais qui n'en est pas un (Conway-Morris, 2000).

*Ces observations montrent que la présence d'un gène ne suffit pas pour la réalisation d'une fonction. Alors, pourquoi un gène impliqué dans la différenciation du mésoderme chez les Bilateria ne fonctionne pas de la même manière chez les Diblastiques?*

## **II.2 Quels mécanismes pour la radiation des *Bilateria*?**

Voici quelques-uns des mécanismes génétiques et moléculaires qui auraient pu jouer un rôle pour la radiation de *Bilateria* au Cambrien.

### **II.2.a Duplication de gènes**

Même s'il semble que la duplication de génome et l'apparition de nouvelles familles de gènes ne soient pas les causes de la radiation des *Bilateria* (Miyata et Suga, 2001), il est probable que certaines familles de gènes aient vu le nombre de leurs membres augmenter au départ de l'embranchement des *Bilateria*. C'est par exemple le cas des gènes de la famille des Collagène, des Hox ou des Récepteurs Nucléaires (Lundin, 1999).

Pour les gènes Hox en particulier, alors que tous les *Bilateria* en possède trois classes (Classe Antérieure - médiane - Postérieure), seulement deux classes (Antérieur et Postérieure) ont été retrouvées dans toutes les espèces de Cnidaires analysées, suggérant que la classe intermédiaire soit une innovation des *Bilateria* (Finnerty, 2003). Même si ce scénario est le

plus probable, il n'est cependant pas exclu que cette absence résulte d'une perte de cette classe de *hox* après la séparation Cnidaires - Triblastiques.

Par ailleurs, il est envisageable que la duplication de gènes au sein d'une famille diminue la pression de sélection sur ces gènes et autorise l'apparition de nouvelles fonctions. Cela semble avoir été le cas avec les gènes *dlx* (homologues de *distal-less*) pour l'apparition des crêtes neurales au moment de la séparation entre l'Amphioxus et les Vertébrés (Holland *et al*, 1996).

## **II.2.b Apparition/Disparition d'interaction**

Puisque la majorité des familles de gènes impliquées au cours du développement sont conservées et semblent jouer un rôle au cours de l'embryogenèse des Cnidaires, on peut se demander comment à partir d'une même matrice, des formes différentes ont pu apparaître.

L'une des hypothèses proposées à l'heure actuelle postule que les systèmes de signalisation moléculaires ont développé des interactions les uns avec les autres (Lundin, 1999) créant ainsi de nouvelles fonctions.

Cela semble notamment être le cas pour les gènes *hox*. En effet, en partie N-terminale, les protéines Hox de *Bilateria* possèdent un hexa-peptide requis pour l'interaction avec des co-facteurs tels que Exd et Pbx (Mann et Chan, 1996). Cependant, ce peptide n'est retrouvé dans aucune des protéines Hox de Cnidaires examinées jusqu'ici (Lundin, 1999).

Le même type d'exemple existe pour les protéines Bra/T dont la présence d'un peptide C-terminal détermine la capacité d'activation de gènes cibles, probablement par recrutement de co-facteurs (Marcellini *et al*, 2003).

Au cours de ma thèse, j'ai pu analyser l'importance d'un tel réseau d'interaction entre plusieurs voies de signalisation distinctes qui coopèrent pour déterminer différents territoires. A partir d'un système ternaire Nodal – BMP – Wnt8, j'ai observé qu'il était possible de déterminer une multitude de destins cellulaires.

Il semble donc que l'un des objectifs cruciaux pour comprendre la radiation des triblastiques soit l'analyse des interactions entre les différentes voies de signalisation impliquées au cours du développement tout en comparant avec les Cnidaires.

**Au 15 Août**  
(Les Jambons)

*Au 15 Août viens nous rejoindre au cas où  
tu n'aurais pas décidé où  
tu vas passer les vacances  
Viens, on va faire du saut à l'élastique,  
du canyoning, du bateau en plastique,  
des sensations intenses  
Faire des plongeurs dans les gorges du  
Verdon  
une course, et si nous la perdons,  
l'apéritif sera gage  
En forêt on va faire du cheval  
Jolly Jumper, cow-bow et cavales  
en poney si ça t'effraie  
Tu sais pas t'amuser  
on est vraiment déçus  
tu sais pas rigoler  
tes vacances sont foutues  
Viens à Cassis jouer à la pétanque  
au scotter des mers dans les calanques  
l'été tu verras du monde  
viens faire des mots fléchés sur le sable  
faire couiner des cannards-bouées  
gonflables  
en écoutant la radio  
Viens tartiner ta peau d'ambre solaire  
de pétrole et de déchets divers  
viens bronzer ta peau d'hiver  
Viens au tabac souvenir des Sables  
d'Olonne  
prendre une carte postale pour les copains  
où la fille à les gros seins  
(refrain)  
Viens visiter le Mont Saint-Michel  
sur le sable les chevaux ont des ailes  
te glisser parmi la foule  
visiter le cirque de Gavarnie  
à dos d'âne que l'on peut louer  
ou en bus climatiser  
te faufiler dans les ruelles magiques  
d'une vieille ville aux accents rustiques  
comme dit le guide touristique  
Découvrir monts et merveilles en vacances  
petits sentiers, paysages épiques  
en petit train électrique  
(refrain)*

## Matériel et Méthodes

### Souches de poissons utilisées

Les embryons sauvages utilisés ont été obtenus à partir de poissons issus d'un croisement des souches AB et Tü. Les poissons sont maintenus à une température de 28,5°C. Les conditions d'élevage des poissons sont détaillées sur [http://www-igbmc.u-strasbg.fr/zf\\_info/zfbook/zfbk.html](http://www-igbmc.u-strasbg.fr/zf_info/zfbook/zfbk.html).

Les embryons homozygotes mutants ont été obtenus par simple croisement d'adultes hétérozygote des souches mutantes *notail*<sup>b195</sup> (Schulte-Merker et al, 1994), *oep*<sup>tz257</sup> (Hammerschmidt et al, 1996; Schier et al, 1996) et *Mini fin*<sup>ty130a</sup> (Conors et al, 1999).

### Déchorionage et survie des embryons

Au moment de la ponte, les embryons sont protégés par un chorion qui est enlevé par digestion enzymatique avec un mélange de protéases (10 mg/ml - Pronase A SIGMA - P-6911). Une fois hors de leur chorion, les embryons sont transférés dans des boîtes de Petri recouvertes d'une couche d'agarose (2%) remplie par une solution de Danieau 0,3x - pH7,6 - 2% Pénicilline/Streptomycine (GIBCO - 15140-122). Il est nécessaire de faire grandir les embryons sur un support de type agarose car l'embryon adhère au plastique ce qui fait éclater le vitellus.

Pendant l'injection les embryons sont maintenus à 25°C (ce qui ralentit légèrement les divisions cellulaires) puis remis à 28,5°C en fin de manipulation.

#### **Solution de Danieau 1x**

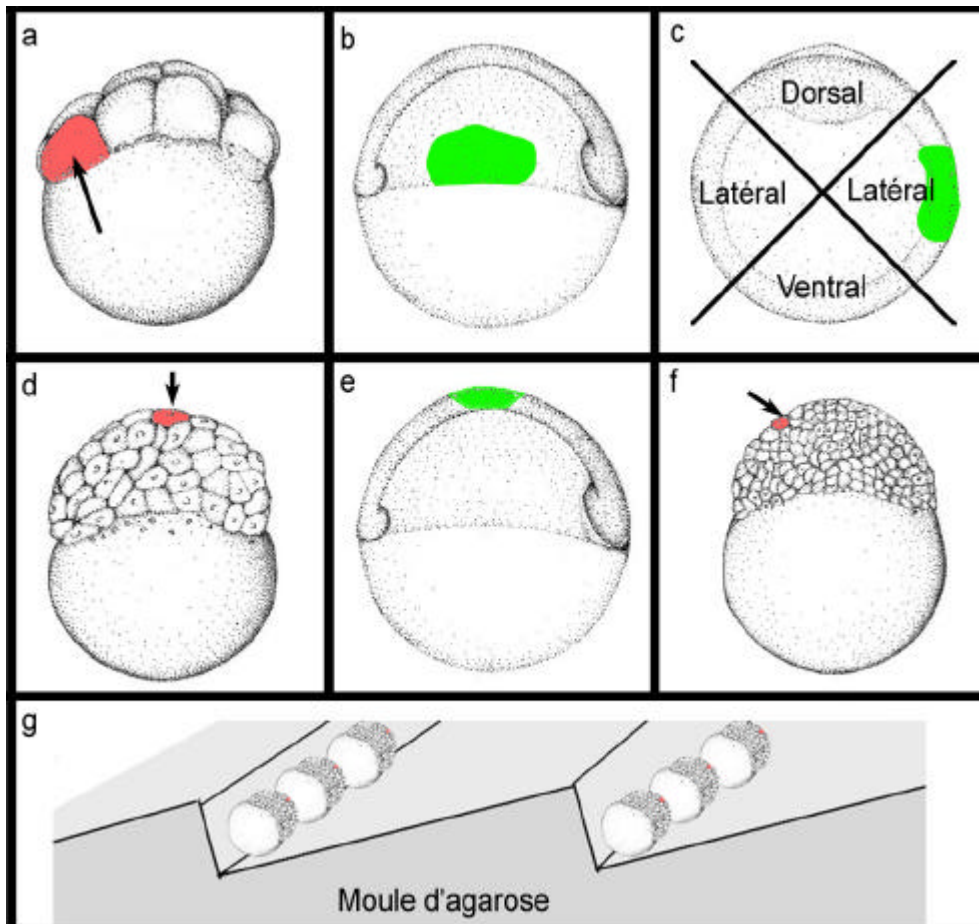
58mM NaCl

0,7mM KCl

0,4mM MgSO<sub>4</sub>

0,6mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

5mM HEPES pH7,6



### **Mat&Méth. - Figure 1: Réalisations d'injections localisées**

Pour les expériences de sur-expression marginale, les injections se font au stade 16cellules dans un blastomère périphérique (a), avec de l'ARNm codant pour la GFP (100pg). En début de gastrulation, les cellules dérivant du blastomère injecté sont positives pour la GFP et sont localisées à la marge de l'embryon (b). La position du clone est déterminé en fonction de la marge dorsale, en vue animale (c). L'embryon est virtuellement divisé en quatre quadrants symétriques: un dorsal, un ventral et deux latéraux (c). Pour les expériences de sur-expression au pôle animal, les embryons ont été injectés au stade 128 cellules dans un blastomère du pôle animal (d) avec l'ARNm codant pour la GFP. En début de gastrulation, les cellules dérivant du blastomère injecté sont localisées au pôle animal et expriment la GFP (e). Les injections à 45° ont été réalisées au stade 256cellules dans un blastomère un peu décalé par rapport au pôle animal (f). Toutes les injections localisées au pôle animal ont été réalisées dans un moule d'agarose composé de différents plans inclinés dans lesquels les embryons sont tous orientés dans le même sens. Stades et orientations: a:16cellules, vue latérale; b,e:6hpf, vue latérale, côté dorsal à droite; c:6hpf, vue animale, côté dorsal vers le haut; d:128cellules, vue latérale; f: 256cellules, vue latérale.

## Injections dans les embryons de poisson zèbre

- **Préparation de la solution d'injection**

Les molécules à injecter (ARN, ADN ou morpholino) sont diluées dans un mélange d'eau, de rouge de phénol et de KCl stérile. La solution finale d'injection est de 0,2% phénol rouge (ACS Reagent Grade - ICN Biochemicals), 100mM KCl. Le rouge de phénol permet de visualiser le produit injecté et les ions K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> reproduisent les conditions osmotiques des cellules embryonnaires.

- **Injections généralisées**

Les injections généralisées se font directement dans la partie centrale du vitellus, où le flux vitellin qui remonte vers les blastomères est le plus fort (ce qui entraîne de façon homogène les produits injectés dans les blastomères) aux stades 1 et 2 cellules. A partir du stade 4 cellules, la répartition des produits injectés est moins homogène.

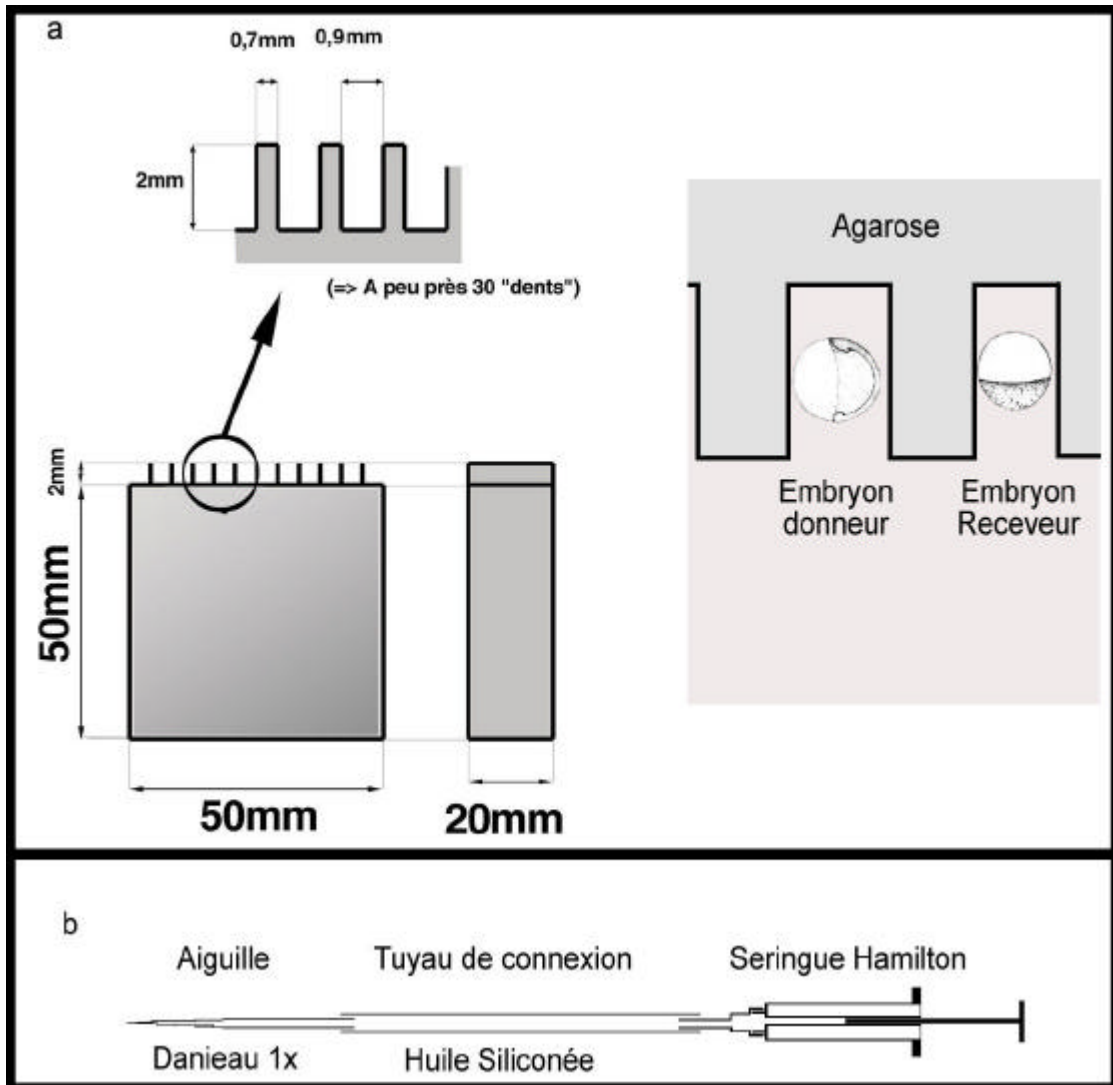
- **Injections localisées au stade 16 cellules et tri des clones selon leur position le long de l'axe D/V**

Au stade 16-cellules, le blastoderme est plan et présente une organisation en carré de 4x4 cellules (Fig.1a). Les blastomères situés les plus en périphérie vont se différencier préférentiellement en cellules marginales (Strehlow *et al*, 1994) en début de gastrulation (Fig.1b). Les injections se font à main levée dans un blastomère avec la solution contenant les molécules à tester ainsi que l'ARN codant pour la GFP (100pg).

Puisqu'il n'est pas possible de visualiser l'axe dorso-ventral avant le début de la gastrulation, il est nécessaire de trier à ce stade les embryons injectés à 16 cellules par visualisation sous un éclairage épifluorescent. Les embryons sont observés en vue animale et les clones fluorescent triés en fonction de leur localisation dorsale, ventrale ou latérale (Fig.1c).

- **Injections localisées au pôle animal**

A partir du stade 64-cellules le blastoderme possède en son centre 4 couches de cellules le long de l'axe animal-végétal (Fig.1d). Les cellules les plus animales vont se différencier préférentiellement en ectoderme (Fig.1e; Kimmel *et al*, 1990).



**Mat&Méth.-Figure 2: Dispositif utilisé pour la transplantation de cellules**

Les embryons donneurs et receveurs ont été disposés dans un moule d'agarose composé de petites logettes (a, à droite). Le moule d'agarose a été réalisé avec un support plastique autour duquel de l'agarose liquide a été coulé (a, à gauche). b: L'aiguille de transplantation est remplie de Danieau 1x et relié par l'intermédiaire d'un tuyau souple rempli d'huile siliconée à une seringue Hamilton. Le dispositif ne doit pas contenir de bulles d'air.



Les expériences visant à sur-exprimer une molécule au pôle animal se font par injection à du stade 64-cellules au stade 512-cellules, le clone étant de plus en plus petit, plus l'injection se fait tardivement. Pour comparer l'effet de la sur-expression de différentes molécules au pôle animal, il est nécessaire de réaliser les injections à des stades équivalents: 64/128-cellules et 256/512-cellules.

L'injection se fait avec un micromanipulateur et les embryons sont disposés dans un moule d'agarose 2% rempli de Danieau 0,3x - 2% Pénicilline/Streptomycine. Le moule sert à caler les embryons pour qu'ils soient disposés tous dans le même sens (Fig.1g).

Les embryons sont triés sous épifluorescence en début de gastrulation afin de vérifier que le clone issu du blastomère injecté a bien conservé une position animale.

Les sur-expression à 45° se font dans un blastomère un peu décalé par rapport au pôle animal au stade 256cellules (Fig.1f). Les embryons sont triés en début de gastrulation et seuls ceux qui possèdent des clones ayant une position à 45° entre la marge et le pôle animal sont conservés.

- **Préparation des aiguilles**

Les aiguilles utilisées pour les injections sont étirées à partir de capillaires en verre comprenant un filament interne (borosilicate glass capillaries - 1.2mm O.D. x 0.69mm I.D. - HARVARD Apparatus - GC120F-15).

## **Transplantation de cellules**

- **Préparation du matériel**

### Moules d'agarose

Pour réaliser un grand nombre de transplantations, il est nécessaire d'utiliser un moule en agarose dans lesquels les embryons donneurs et receveurs sont disposés les uns à côté des autres. Ce moule est réalisé avec de l'agarose 2% en utilisant des supports en verre ou en plastique (Fig.2a).

### Aiguilles

Les aiguilles de transplantation sont étirées à partir de capillaires en verre sans filament interne. Deux types de capillaires sont utilisés: ils possèdent le même diamètre extérieur (O.D.=1mm) mais des diamètres intérieurs différents (I.D.=0.78 ou 0.58) ce qui détermine la taille du transplant.

## Milieux

Les transplantations sont réalisées en Danieau 1x–2%PenStrep, puis transférés en Danieau0,3x - 2% PenStrep.

## Mise au point du système

### *Principe*

La technique de transplantation consiste en l'aspiration d'un groupe de cellule par une aiguille. Le système d'aspiration repose sur une colonne de liquide continue (huile + eau) entre l'aiguille de transplantation et une seringue Hamilton reliée à une micro-vis (Fig.2b). Pour que le système soit efficace, il est essentiel qu'aucune bulle d'air ne s'introduise dans cette colonne, ce qui nécessite d'établir des connexions très étanches entre les différents éléments.

### *Préparation seringue Hamilton*

Remplir une boîte de Pétri avec un fond d'huile siliconée. Remplir la seringue Hamilton au maximum en la plongeant dans le fond d'huile sans introduire de bulle d'air.

### *Connexion Seringue Hamilton - Aiguille de transplantation*

L'aiguille de transplantation et la seringue Hamilton sont reliées par un tuyau en plastique d'un diamètre interne de 0,90mm rempli d'huile siliconée.

Le tuyau est rempli d'huile à l'aide d'une seringue de 5mL connectée à une aiguille (0.9mm de diamètre). Une fois le tuyau rempli, l'aiguille est ensuite retirée de la seringue de 5ml et disposée sur l'embout de la seringue Hamilton, en prenant garde à ne pas introduire de bulle d'air.

Parallèlement l'aiguille de transplantation est cassée à son extrémité soit à la pince, soit directement avec des ciseaux de manière à obtenir un embout relativement plat. Ensuite, l'aiguille est remplie avec du Danieau 1x à l'aide d'une autre seringue.

L'aiguille de transplantation est ensuite introduite dans un porte-aiguille et connectée avec le tuyau de connexion. Pour que des bulles d'air ne s'introduisent pas dans le système, des joints réalisés avec du Parafilm sont disposés aux différentes connexions (seringue Hamilton - tuyau et tuyau - aiguille).

- Préparation des embryon

#### Marquage des embryons

Les embryons donneurs sont injectés avec un marqueur fluorescent de faible poids moléculaire afin de bien marquer toutes les cellules. Les molécules utilisées sont la fluorescéine-dextran et la rhodamine-dextran (40kDa - Molecular Probe).

#### Transplantations homo/hétéro-chroniques

Pour réaliser des transplantation homochroniques, les embryons grandissent dans la même pièce, à la même température.

Pour réaliser des transplantations hétérochrnoniques, il est nécessaire de placer les boites d'embryons dans des salles de températures différentes afin de jouer sur la vitesse de leur développement. Le tableau ci-dessous présente un exemple des différentes températures utilisées pour réaliser des transplantations hétérochroniques. Dans ce cas, les donneurs se développeront plus rapidement que les receveurs.

	(30°)	(28°)	(26°)
<b>Donneur 1</b>	A partir 10h00	/	/
<b>Donneur 2</b>	Jusqu'à 13h00	A partir de 13h00	/
<b>Donneur 3</b>	/	A partir de 10h00	
<b>Receveur 1</b>	Jusqu'à 11h00	A partir de 11h	/
<b>Receveur 2</b>	/	Jusqu'à 13h00	A partir de 13h
<b>Receveur 3</b>	/	/	A partir de 10h

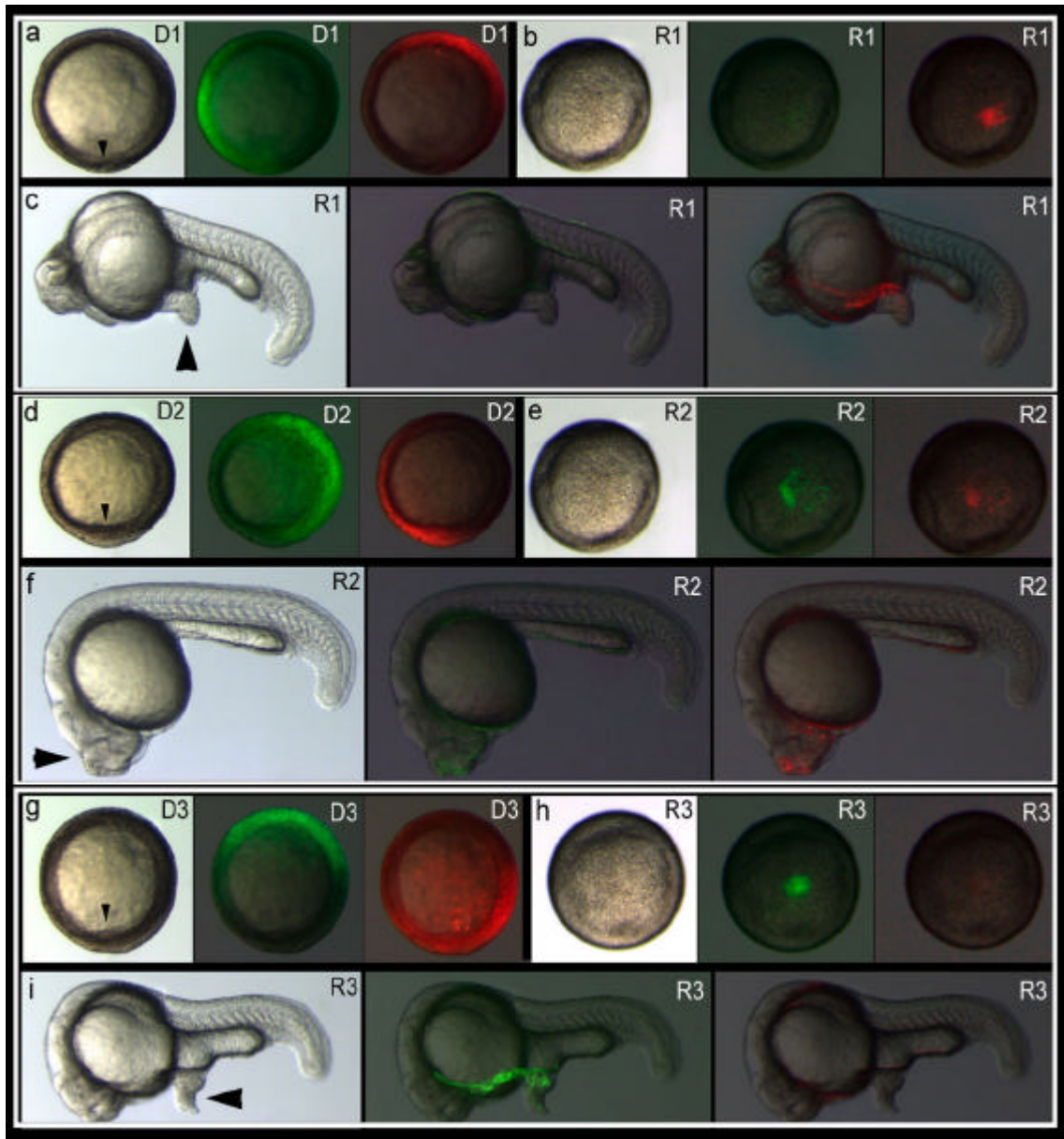
- Transplantation

Dans le moule d'agarose, les embryons donneurs et receveurs sont disposés de manière alternée et orientés manuellement en fonction de la localisation des sites de prélèvement et de greffe.

Toutes les transplantations sont réalisées au micromanipulateur.

- Détermination de l'axe D/V au stade blastula

Avant le début de gastrulation, le polarité D/V des embryons n'est pas visible. Pour déterminer le site de prélèvement des greffons, les embryons donneurs ont été injectés avec deux molécules fluorescente et triés en cours de gastrulation.



### Mat&Méth - Figure 3: Détermination de la polarité dorso-ventrale avant la gastrulation

Cette figure présente trois cas de couple donneur - receveur. En début de gastrulation, les cellules de la marge des embryons sont de deux couleurs différentes (a,c,g). La fluorescence du greffon dans l'embryon donneur est comparée à celle des cellules de la marge ventrale des embryons donneurs. L'embryon receveur R1 possède un greffon négatif pour la fluorescéine et positif pour la rhodamine (b). La marge ventrale de l'embryon donneur est exclusivement rouge (a). Le greffon provient donc de la marge ventrale de l'embryon donneur. A 24h, l'embryon receveur développe une queue ectopique composée de cellules positives pour la rhodamine mais pas pour la fluorescéine (c). L'embryon receveur R2 possède un greffon positif pour la fluorescéine et pour la rhodamine (e). La provenance du clone est donc ambiguë et donc retiré des statistiques. A 24h, l'embryon receveur développe une excroissance avec des cellules positives pour la rhodamine et des cellules positives pour la fluorescéine (f). L'embryon receveur R3 possède un greffon négatif pour la rhodamine et positif pour la fluorescéine (h). La marge ventrale de l'embryon donneur est exclusivement verte (g). Le greffon provient donc de la marge ventrale de l'embryon donneur. A 24h, l'embryon receveur développe une queue ectopique composée de cellules positives pour la fluorescéine mais pas pour la rhodamine (i). Analyse de la fluorescence: Tous les embryons donneurs (D) et receveurs (R) ont été pris en photo en illumination normale, en fluorescence verte et en fluorescence rouge, toujours dans le même ordre. Stades et orientations: a,d,g=début de gastrulation (6hpf); vue animale, côté dorsal vers le bas (triangle noir); b,e,h=début de gastrulation (6hpf), vue animale; c,f,i=24hpf, vues latérales, côté antérieur à gauche.

Au stade 2 cellules, les embryons donneurs ont été injectés avec de la fluorescéine dans un blastomère et de la rhodamine dans l'autre. Les transplantations ont été ensuite réalisées selon le protocole décrit précédemment et les couple donneur - receveur conservés ensemble.

Pour les expériences de greffes de marge ventrale, seuls les embryons donneurs possédant un marquage ventral à la fluorescéine ou à la rhodamine en début de gastrulation sont conservés. Les embryons dont la marge ventrale possède un mélange de cellules vertes et rouges sont retirés de l'expérience. Pour chaque couple, la couleur du transplant est ensuite analysée et comparée à celles de cellules marginales du donneur. Seuls les transplants possédant des cellules de couleur homogène sont conservés. Cela indique la provenance dorsale ou ventrale du clone (Fig.3).

### **Culture d'explant d'ectoderme**

Les explant d'ectoderme ont été prélevés au stade Sphere (4hpf). Les cellules du pôle animal ont été séparées du reste de l'embryon à l'aide d'une aiguille en métal. Les explants ont été cultivés dans une solution de Ringer 1x- pH7,6 - 2% Pénicilline/Streptomycine dans une boîte de Petri recouverte d'agarose 2%.

#### **Ringer 1x**

116mM NaCl

2,9mM KCl

5mM HEPES

1,8mM CaCl<sub>2</sub>

pH=7,2

### **Hybridations *in situ***

Les embryons sont fixés durant 12 à 24h au stade voulu dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4%, PBS 1x (PBS 10x: 8% NaCl ; 0.2% KCl ; 0.2M tampon phosphate; pH 7.3) à 4°C, puis déshydratés dans du méthanol 100% et conservés à -20°C. Toutes les hybridations *in situ* ont été réalisées selon le protocole décrit dans Thisse *et al*, 2004.

Les sondes ARN utilisées anti-sens ont été synthétisées à partir d'un vecteur pBIISK+ linéarisé. Le détail des sondes utilisées et les références sont reportées en Annexe 1. Approximativement 50pg d'ARN sont utilisés par réaction.

## Synthèse d'ARN sens

Toutes les gènes qui ont été utilisés pour des expériences de sur-expression sont clonés dans un vecteur *pCS2+*. Les ARN sens ont été synthétisés à partir du promoteur SP6 avec le kit AMBION (AMBION SP6 mMessage mMachine kit) après digestion du vecteur par l'enzyme de restriction *NotI*.

Après précipitation, la concentration en ARN de la solution est calculée à partir de la densité optique d'un échantillon et la "qualité" de l'ARN synthétisé visualisé sur gel d'agarose.

## Utilisation des Morpholinos

- Séquences des morpholinos utilisés

Tous les morpholinos ont été commandés et synthétisés par GeneTools.

Le morpholino est re-suspendu dans une solution de Danieau 1x, conformément à ce qui a été décrit (REF), pour réaliser une solution stock de 4mM (75µL pour 300nmol).

Séquence des morpholinos utilisés:

MoAtv1 : 5' GAAGTCATCTTTTCAAGGTGCAGGA 3'

MoAtv2 : 5' AGCTGGATGAACAGAGCCAT 3'

MoWnt8 : 5' ACGCAAAAATCTGGCAAGGGTTCAT 3'

MoEveI : 5' GATCCACTTCCGCAATCCAAATAT 3'

MoCad : 5' TTTAAGGCAACATGCCAGCCATGCA 3'

**Ginette**  
*(Les Têtes Raides)*

*La mer ça n's'invente pas  
et nous on crève à rester là  
et le funambule beau qu'il est  
marchant sur son fil  
Charles il disait l'albatros  
il en est mort  
à marcher sur la terre  
mais c'est pas fini  
on va continuer  
à marcher dans les airs  
et les supermarchés  
pour nous donner l'air  
de ne pas rien faire  
et pour manger  
on va s'aimer encore et encore  
pendant des années  
j'étais là moi monsieur  
sinon on sait pas trop c'qu'il faut faire  
et là y a la Ginette qui valse en guinguette  
qu'a toujours un verre d'avance  
des fois qu'on ferme la dernière porte  
faut s'enivrer quoi qu'il arrive  
et puis rêver et faire la fête  
c'est des musiciens sur des tréteaux  
tôt ou tard ça va s'écrouler  
mais leur histoire on s'en fout  
Ginette continue à tourner  
sur cet air de ferraille et de verres cassés  
allez Ginette!...*

*La mer ça n's'invente pas  
et nous on crève à rester là  
et c'est tout.*

## Bibliographie

- Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N. and de Rosa, R.** (1999). Animal evolution. The end of the intermediate taxa? *Trends Genet* **15**, 104-8.
- Alexander, J. and Stainier, D. Y.** (1999). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. *Curr Biol* **9**, 1147-57.
- Alexander, J., Rothenberg, M., Henry, G. L. and Stainier, D. Y.** (1999). casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish. *Dev Biol* **215**, 343-57.
- Alexander, J., Stainier, D. Y. and Yelon, D.** (1998). Screening mosaic F1 females for mutations affecting zebrafish heart induction and patterning. *Dev Genet* **22**, 288-99.
- Alvarez, I. S., Araujo, M. and Nieto, M. A.** (1998). Neural induction in whole chick embryo cultures by FGF. *Dev Biol* **199**, 42-54.
- Amaya, E., Stein, P. A., Musci, T. J. and Kirschner, M. W.** (1993). FGF signalling in the early specification of mesoderm in *Xenopus*. *Development* **118**, 477-87.
- Ang, S. L. and Rossant, J.** (1994). HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* **78**, 561-74.
- Angerer, L. M. and Angerer, R. C.** (2000). Animal-vegetal axis patterning mechanisms in the early sea urchin embryo. *Dev Biol* **218**, 1-12.
- Angerer, L. M., Oleksyn, D. W., Logan, C. Y., McClay, D. R., Dale, L. and Angerer, R. C.** (2000). A BMP pathway regulates cell fate allocation along the sea urchin animal-vegetal embryonic axis. *Development* **127**, 1105-14.
- Aoki, T. O., David, N. B., Minchiotti, G., Saint-Etienne, L., Dickmeis, T., Persico, G. M., Strahle, U., Mourrain, P. and Rosa, F. M.** (2002). Molecular integration of casanova in the Nodal signalling pathway controlling endoderm formation. *Development* **129**, 275-86.
- Appel, B.** (2000). Zebrafish neural induction and patterning. *Dev Dyn* **219**, 155-68.
- Appel, B., Fritz, A., Westerfield, M., Grunwald, D. J., Eisen, J. S. and Riley, B. B.** (1999). Delta-mediated specification of midline cell fates in zebrafish embryos. *Curr Biol* **9**, 247-56.
- Arendt, D., Technau, U. and Wittbrodt, J.** (2001). Evolution of the bilaterian larval foregut. *Nature* **409**, 81-5.
- Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A. and Aaronson, S. A.** (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* **3**, 683-6.
- Bally-Cuif, L., Goutel, C., Wassef, M., Wurst, W. and Rosa, F.** (2000). Coregulation of anterior and posterior mesendodermal development by a hairy-related transcriptional repressor. *Genes Dev* **14**, 1664-77.
- Bang, A. G., Papalopulu, N., Kintner, C. and Goulding, M. D.** (1997). Expression of Pax-3 is initiated in the early neural plate by posteriorizing signals produced by the organizer and by posterior non-axial mesoderm. *Development* **124**, 2075-85.
- Bauer, H., Meier, A., Hild, M., Stachel, S., Economides, A., Hazelett, D., Harland, R. M. and Hammerschmidt, M.** (1998). Follistatin and noggin are excluded from the zebrafish organizer. *Dev Biol* **204**, 488-507.
- Beck, C. W. and Slack, J. M.** (1998). Analysis of the developing *Xenopus* tail bud reveals separate phases of gene expression during determination and outgrowth. *Mech Dev* **72**, 41-52.



- Beck, C. W. and Slack, J. M.** (1999). A developmental pathway controlling outgrowth of the *Xenopus* tail bud. *Development* **126**, 1611-20.
- Beck, C. W. and Slack, J. M.** (2002). Notch is required for outgrowth of the *Xenopus* tail bud. *Int J Dev Biol* **46**, 255-8.
- Beck, C. W., Whitman, M. and Slack, J. M.** (2001). The role of BMP signaling in outgrowth and patterning of the *Xenopus* tail bud. *Dev Biol* **238**, 303-14.
- Begemann, G., Schilling, T. F., Rauch, G. J., Geisler, R. and Ingham, P. W.** (2001). The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for *raldh2* in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development* **128**, 3081-94.
- Belting, H. G., Hauptmann, G., Meyer, D., Abdelilah-Seyfried, S., Chitnis, A., Eschbach, C., Soll, I., Thisse, C., Thisse, B., Artinger, K. B. et al.** (2001). *spiel ohne grenzen/pou2* is required during establishment of the zebrafish midbrain-hindbrain boundary organizer. *Development* **128**, 4165-76.
- Bertocchini, F. and Stern, C. D.** (2002). The hypoblast of the chick embryo positions the primitive streak by antagonizing nodal signaling. *Dev Cell* **3**, 735-44.
- Bigrove, B. W., Essner, J. J. and Yost, H. J.** (1999). Regulation of midline development by antagonism of *lefty* and nodal signaling. *Development* **126**, 3253-62.
- Bruce, A. E., Howley, C., Zhou, Y., Vickers, S. L., Silver, L. M., King, M. L. and Ho, R. K.** (2003). The maternally expressed zebrafish T-box gene *comesodermin* regulates organizer formation. *Development* **130**, 5503-17.
- Burgess, S., Reim, G., Chen, W., Hopkins, N. and Brand, M.** (2002). The zebrafish *spiel-ohne-grenzen* (*spg*) gene encodes the POU domain protein *Pou2* related to mammalian *Oct4* and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis. *Development* **129**, 905-16.
- Cadigan KM.** (2002) Regulating morphogen gradients in the *Drosophila* wing. *Semin Cell Dev Biol.* **13**, 83-90
- Cambray, N. and Wilson, V.** (2002). Axial progenitors with extensive potency are localised to the mouse chordoneural hinge. *Development* **129**, 4855-66.
- Candia, A. F., Watabe, T., Hawley, S. H., Onichtchouk, D., Zhang, Y., Derynck, R., Niehrs, C. and Cho, K. W.** (1997). Cellular interpretation of multiple TGF-beta signals: intracellular antagonism between *activin/BVg1* and *BMP-2/4* signaling mediated by *Smads*. *Development* **124**, 4467-80.
- Carmany-Rampey, A. and Schier, A. F.** (2001). Single-cell internalization during zebrafish gastrulation. *Curr Biol* **11**, 1261-5.
- Catala, M., Teillet, M. A. and Le Douarin, N. M.** (1995). Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimaera system. *Mech Dev* **51**, 51-65.
- Chalmers, A. D. and Slack, J. M.** (1998). Development of the gut in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* **212**, 509-21.
- Chen, J. N., Haffter, P., Odenthal, J., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C. P. et al.** (1996). Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. *Development* **123**, 293-302.
- Chen, J. Y., Huang, D. Y., Peng, Q. Q., Chi, H. M., Wang, X. Q. and Feng, M.** (2003). The first tunicate from the Early Cambrian of South China. *Proc Natl Acad Sci US A* **100**, 8314-8.
- Chen, S. and Kimelman, D.** (2000). The role of the yolk syncytial layer in germ layer patterning in zebrafish. *Development* **127**, 4681-9.

- Chen, X., Rubock, M. J. and Whitman, M.** (1996). A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature* **383**, 691-6.
- Chen, Y. and Schier, A. F.** (2001). The zebrafish Nodal signal Squint functions as a morphogen. *Nature* **411**, 607-10.
- Chen, Y. and Schier, A. F.** (2002). Lefty proteins are long-range inhibitors of squint-mediated nodal signaling. *Curr Biol* **12**, 2124-8.
- Chen C, Shen MM.** (2004). Two modes by which Lefty proteins inhibit nodal signaling. *Curr Biol*.**14**, 618-24.
- Cheng, A. M., Thisse, B., Thisse, C. and Wright, C. V.** (2000). The lefty-related factor Xatv acts as a feedback inhibitor of nodal signaling in mesoderm induction and L-R axis development in xenopus. *Development* **127**, 1049-61.
- Cheng, S. K., Olale, F., Brivanlou, A. H. and Schier, A. F.** (2004). Lefty Blocks a Subset of TGFbeta Signals by Antagonizing EGF-CFC Coreceptors. *PLoS Biol* **2**, E30.
- Conlon, F. L., Lyons, K. M., Takaesu, N., Barth, K. S., Kispert, A., Herrmann, B. and Robertson, E. J.** (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* **120**, 1919-28.
- Connors, S. A., Trout, J., Ekker, M. and Mullins, M. C.** (1999). The role of tolloid/mini fin in dorsoventral pattern formation of the zebrafish embryo. *Development* **126**, 3119-30.
- Conway Morris, S.** (2000). The Cambrian "explosion": slow-fuse or megatonnage? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4426-9.
- Conway-Morris, S.** (2003). The Cambrian "explosion" of metazoans and molecular biology: would Darwin be satisfied? *Int J Dev Biol* **47**, 505-15.
- Cooper, M. S. and D'Amico, L. A.** (1996). A cluster of noninvoluting endocytic cells at the margin of the zebrafish blastoderm marks the site of embryonic shield formation. *Dev Biol* **180**, 184-98.
- Dale, L.** (1999). Vertebrate development: Multiple phases to endoderm formation. *Curr Biol* **9**, R812-5.
- Dale, L. and Slack, J. M.** (1987). Fate map for the 32-cell stage of *Xenopus laevis*. *Development* **99**, 527-51.
- Dale, L. and Wardle, F. C.** (1999). A gradient of BMP activity specifies dorsal-ventral fates in early *Xenopus* embryos. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 319-26.
- David, N. B. and Rosa, F. M.** (2001). Cell autonomous commitment to an endodermal fate and behaviour by activation of Nodal signalling. *Development* **128**, 3937-47.
- Davidson G, Mao B, del Barco Barrantes I, Niehrs C** (2002) Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning. *Development*. **129**, 5587-96.
- De Robertis, E. M. and Sasai, Y.** (1996). A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* **380**, 37-40.
- De Robertis, E. M., Wessely, O., Oelgeschlager, M., Brizuela, B., Pera, E., Larrain, J., Abreu, J. and Bachiller, D.** (2001). Molecular mechanisms of cell-cell signaling by the Spemann-Mangold organizer. *Int J Dev Biol* **45**, 189-97.
- de Winter, J. P., ten Dijke, P., de Vries, C. J., van Achterberg, T. A., Sugino, H., de Waele, P., Huylebroeck, D., Verschuere, K. and van den Eijnden-van Raaij, A. J.** (1996). Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol* **116**, 105-14.

- del Barco Barrantes, I., Davidson, G., Grone, H. J., Westphal, H. and Niehrs, C.** (2003). Dkk1 and noggin cooperate in mammalian head induction. *Genes Dev* **17**, 2239-44.
- Deng, C. X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M. M., Daugherty, C., Ornitz, D. M. and Leder, P.** (1994). Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev* **8**, 3045-57.
- Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P. B., Hagan, M. P. and Grant, S.** (2003). MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* **22**, 5885-96.
- Dick, A., Hild, M., Bauer, H., Imai, Y., Maifeld, H., Schier, A. F., Talbot, W. S., Bouwmeester, T. and Hammerschmidt, M.** (2000a). Essential role of Bmp7 (snailhouse) and its prodomain in dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* **127**, 343-54.
- Dick, A., Mayr, T., Bauer, H., Meier, A. and Hammerschmidt, M.** (2000b). Cloning and characterization of zebrafish smad2, smad3 and smad4. *Gene* **246**, 69-80.
- Dickmeis, T., Mourrain, P., Saint-Etienne, L., Fischer, N., Aanstad, P., Clark, M., Strahle, U. and Rosa, F.** (2001). A crucial component of the endoderm formation pathway, CASANOVA, is encoded by a novel sox-related gene. *Genes Dev* **15**, 1487-92.
- Dirksen, M. L. and Jamrich, M.** (1995). Differential expression of fork head genes during early Xenopus and zebrafish development. *Dev Genet* **17**, 107-16.
- Dobbs-McAuliffe, B., Zhao, Q. and Linney, E.** (2004). Feedback mechanisms regulate retinoic acid production and degradation in the zebrafish embryo. *Mech Dev* **121**, 339-50.
- Dosch, R. and Niehrs, C.** (2000). Requirement for anti-dorsalizing morphogenetic protein in organizer patterning. *Mech Dev* **90**, 195-203.
- Dougan, S. T., Warga, R. M., Kane, D. A., Schier, A. F. and Talbot, W. S.** (2003). The role of the zebrafish nodal-related genes squint and cyclops in patterning of mesendoderm. *Development* **130**, 1837-51.
- Draper, B. W., Stock, D. W. and Kimmel, C. B.** (2003). Zebrafish fgf24 functions with fgf8 to promote posterior mesodermal development. *Development* **130**, 4639-54.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z. et al.** (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* **123**, 37-46.
- Duboc, V., Rottinger, E., Besnardeau, L. and Lepage, T.** (2004). Nodal and BMP2/4 signaling organizes the oral-aboral axis of the sea urchin embryo. *Dev Cell* **6**, 397-410.
- Ekker, M., Wegner, J., Akimenko, M. A. and Westerfield, M.** (1992). Coordinate embryonic expression of three zebrafish engrailed genes. *Development* **116**, 1001-10.
- Ekker, S. C., Ungar, A. R., Greenstein, P., von Kessler, D. P., Porter, J. A., Moon, R. T. and Beachy, P. A.** (1995). Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr Biol* **5**, 944-55.
- Episkopou, V., Arkell, R., Timmons, P. M., Walsh, J. J., Andrew, R. L. and Swan, D.** (2001). Induction of the mammalian node requires Arkadia function in the extraembryonic lineages. *Nature* **410**, 825-30.
- Erter, C. E., Solnica-Krezel, L. and Wright, C. V.** (1998). Zebrafish nodal-related 2 encodes an early mesendodermal inducer signaling from the extraembryonic yolk syncytial layer. *Dev Biol* **204**, 361-72.
- Erter, C. E., Wilm, T. P., Basler, N., Wright, C. V. and Solnica-Krezel, L.** (2001). Wnt8 is required in lateral mesendodermal precursors for neural posteriorization in vivo. *Development* **128**, 3571-83.

- Erwin, D. H. and Davidson, E. H.** (2002). The last common bilaterian ancestor. *Development* **129**, 3021-32.
- Faure, S., Lee, M. A., Keller, T., ten Dijke, P. & Whitman, M.** (2000). Endogenous patterns of TGF $\beta$  superfamily signaling during early *Xenopus* development. *Development* **127**, 2917–2931.
- Fekany, K., Yamanaka, Y., Leung, T., Sirotkin, H. I., Topczewski, J., Gates, M. A., Hibi, M., Renucci, A., Stemple, D., Rادbill, A. et al.** (1999). The zebrafish bozozok locus encodes Dharma, a homeodomain protein essential for induction of gastrula organizer and dorsoanterior embryonic structures. *Development* **126**, 1427-38.
- Fekany-Lee, K., Gonzalez, E., Miller-Bertoglio, V. and Solnica-Krezel, L.** (2000). The homeobox gene bozozok promotes anterior neuroectoderm formation in zebrafish through negative regulation of BMP2/4 and Wnt pathways. *Development* **127**, 2333-45.
- Feldman, B., Concha, M. L., Saude, L., Parsons, M. J., Adams, R. J., Wilson, S. W. and Stemple, D. L.** (2002). Lefty antagonism of Squint is essential for normal gastrulation. *Curr Biol* **12**, 2129-35.
- Feldman, B., Gates, M. A., Egan, E. S., Dougan, S. T., Rennebeck, G., Sirotkin, H. I., Schier, A. F. and Talbot, W. S.** (1998). Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* **395**, 181-5.
- Finnerty, J. R.** (2003). The origins of axial patterning in the metazoa: how old is bilateral symmetry? *Int J Dev Biol* **47**, 523-9.
- Finnerty, J. R. and Martindale, M. Q.** (1997). Homeoboxes in sea anemones (Cnidaria:Anthozoa): a PCR-based survey of *Nematostella vectensis* and *Metridium senile*. *Biol Bull* **193**, 62-76.
- Finnerty, J. R., Pang, K., Burton, P., Paulson, D. and Martindale, M. Q.** (2004). Origins of Bilateral Symmetry: Hox and Dpp Expression in a Sea Anemone. *Science*.
- Fischer, S., Draper, B. W. and Neumann, C. J.** (2003). The zebrafish fgf24 mutant identifies an additional level of Fgf signaling involved in vertebrate forelimb initiation. *Development* **130**, 3515-24.
- Fjose, A., Njolstad, P. R., Nornes, S., Molven, A. and Krauss, S.** (1992). Structure and early embryonic expression of the zebrafish engrailed-2 gene. *Mech Dev* **39**, 51-62.
- Frischer, L. E., Hagen, F. S. and Garber, R. L.** (1986). An inversion that disrupts the Antennapedia gene causes abnormal structure and localization of RNAs. *Cell* **47**, 1017-23.
- Fujii, H., Nagai, T., Shirasawa, H., Doi, J. Y., Yasui, K., Nishimatsu, S., Takeda, H. and Sakai, M.** (2002). Anteroposterior patterning in *Xenopus* embryos: egg fragment assay system reveals a synergy of dorsalizing and posteriorizing embryonic domains. *Dev Biol* **252**, 15-30.
- Furthauer, M., Lin, W., Ang, S. L., Thisse, B. and Thisse, C.** (2002). Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol* **4**, 170-4.
- Furthauer, M., Reifers, F., Brand, M., Thisse, B. and Thisse, C.** (2001). sprouty4 acts in vivo as a feedback-induced antagonist of FGF signaling in zebrafish. *Development* **128**, 2175-86.
- Furthauer, M., Thisse, B. and Thisse, C.** (1999). Three different noggin genes antagonize the activity of bone morphogenetic proteins in the zebrafish embryo. *Dev Biol* **214**, 181-96.
- Furthauer, M., Thisse, C. and Thisse, B.** (1997). A role for FGF-8 in the dorsoventral patterning of the zebrafish gastrula. *Development* **124**, 4253-64.
- Furthauer, M., Van Celst, J., Thisse, C. and Thisse, B.** (2004). Fgf signalling controls the dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development*.
- Gerhart, J.** (2001). Evolution of the organizer and the chordate body plan. *Int J Dev Biol* **45**, 133-53.

- Gerhart, J., Danilchik, M., Doniach, T., Roberts, S., Rowing, B. and Stewart, R.** (1989). Cortical rotation of the *Xenopus* egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. *Development* **107 Suppl**, 37-51.
- Germain, S., Howell, M., Esslemont, G. M. and Hill, C. S.** (2000). Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes Dev* **14**, 435-51.
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C. and Niehrs, C.** (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**, 357-62.
- Glinka, A., Wu, W., Onichtchouk, D., Blumenstock, C. and Niehrs, C.** (1997). Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus*. *Nature* **389**, 517-9.
- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S. et al.** (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet* **31**, 135-40.
- Gont, L. K., Steinbeisser, H., Blumberg, B. and de Robertis, E. M.** (1993). Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development* **119**, 991-1004.
- Grandel, H., Lun, K., Rauch, G. J., Rhinn, M., Piotrowski, T., Houart, C., Sordino, P., Kuchler, A. M., Schulte-Merker, S., Geisler, R. et al.** (2002). Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development* **129**, 2851-65.
- Grapin-Botton, A. and Melton, D. A.** (2000). Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet* **16**, 124-30.
- Greco, T. L., Takada, S., Newhouse, M. M., McMahon, J. A., McMahon, A. P. and Camper, S. A.** (1996). Analysis of the vestigial tail mutation demonstrates that Wnt-3a gene dosage regulates mouse axial development. *Genes Dev* **10**, 313-24.
- Green, J. B., New, H. V. and Smith, J. C.** (1992). Responses of embryonic *Xenopus* cells to activin and FGF are separated by multiple dose thresholds and correspond to distinct axes of the mesoderm. *Cell* **71**, 731-9.
- Griffin, K. J. and Kimelman, D.** (2003). Interplay between FGF, one-eyed pinhead, and T-box transcription factors during zebrafish posterior development. *Dev Biol* **264**, 456-66.
- Griffin, K. J., Amacher, S. L., Kimmel, C. B. and Kimelman, D.** (1998). Molecular identification of spadetail: regulation of zebrafish trunk and tail mesoderm formation by T-box genes. *Development* **125**, 3379-88.
- Griffin, K., Patient, R. and Holder, N.** (1995). Analysis of FGF function in normal and no tail zebrafish embryos reveals separate mechanisms for formation of the trunk and the tail. *Development* **121**, 2983-94.
- Griffith, C. M., Wiley, M. J. and Sanders, E. J.** (1992). The vertebrate tail bud: three germ layers from one tissue. *Anat Embryol (Berl)* **185**, 101-13.
- Gritsman, K., Talbot, W. S. and Schier, A. F.** (2000). Nodal signaling patterns the organizer. *Development* **127**, 921-32.
- Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W. S. and Schier, A. F.** (1999). The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* **97**, 121-32.

- Gurdon, J. B., Harger, P., Mitchell, A. and Lemaire, P.** (1994). Activin signalling and response to a morphogen gradient. *Nature* **371**, 487-92.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y. and Krasnow, M. A.** (1998). sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways. *Cell* **92**, 253-63.
- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nusslein-Volhard C.** (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 1-36.
- Halpern, M. E., Thisse, C., Ho, R. K., Thisse, B., Riggelman, B., Trevarrow, B., Weinberg, E. S., Postlethwait, J. H. and Kimmel, C. B.** (1995). Cell-autonomous shift from axial to paraxial mesodermal development in zebrafish floating head mutants. *Development* **121**, 4257-64.
- Hammerschmidt, M., Pelegri, F., Mullins, M. C., Kane, D. A., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Heisenberg, C. P. et al.** (1996). Mutations affecting morphogenesis during gastrulation and tail formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 143-51.
- Hashimoto, H., Itoh, M., Yamanaka, Y., Yamashita, S., Shimizu, T., Solnica-Krezel, L., Hibi, M. and Hirano, T.** (2000). Zebrafish Dkk1 functions in forebrain specification and axial mesendoderm formation. *Dev Biol* **217**, 138-52.
- Hashimoto, H., Itoh, M., Yamanaka, Y., Yamashita, S., Shimizu, T., Solnica-Krezel, L., Hibi, M. and Hirano, T.** (2000). Zebrafish Dkk1 functions in forebrain specification and axial mesendoderm formation. *Dev Biol* **217**, 138-52.
- Hata, A., Seoane, J., Lagna, G., Montalvo, E., Hemmati-Brivanlou, A. and Massague, J.** (2000). OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell* **100**, 229-40.
- Hayward, D. C., Samuel, G., Pontynen, P. C., Catmull, J., Saint, R., Miller, D. J. and Ball, E. E.** (2002). Localized expression of a dpp/BMP2/4 ortholog in a coral embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8106-11.
- Heasman, J., Wylie, C. C., Hausen, P. and Smith, J. C.** (1984). Fates and states of determination of single vegetal pole blastomeres of *X. laevis*. *Cell* **37**, 185-94.
- Heisenberg, C. P., Houart, C., Take-Uchi, M., Rauch, G. J., Young, N., Coutinho, P., Masai, I., Caneparo, L., Concha, M. L., Geisler, R. et al.** (2001). A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon. *Genes Dev* **15**, 1427-34.
- Hino, J., Nishimatsu, S., Nagai, T., Matsuo, H., Kangawa, K. and Nohno, T.** (2003). Coordination of BMP-3b and cerberus is required for head formation of *Xenopus* embryos. *Dev Biol* **260**, 138-57.
- Ho CY, Houart C, Wilson SW, Stainier DY.** (1999) A role for the extraembryonic yolk syncytial layer in patterning the zebrafish embryo suggested by properties of the hex gene. *Curr Biol*. **9**, 1131-4.
- Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C. M., von Laue, C. C., Snyder, P., Rothbacher, U. and Holstein, T. W.** (2000). WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* **407**, 186-9.

- Holland, L. Z.** (2002). Heads or tails? Amphioxus and the evolution of anterior-posterior patterning in deuterostomes. *Dev Biol* **241**, 209-28.
- Holmdahl, D. E.** (1925). Experimentelle Untersuchungen über die Lage der Grenze primärer und sekundärer Körperentwicklung beim Huhn. *Anat. Anz.* **59**, 393-396.
- Hoppler, S., Brown, J. D. and Moon, R. T.** (1996). Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in *Xenopus* embryos. *Genes Dev* **10**, 2805-17.
- Horb, M. E.** (2000). Patterning the endoderm: the importance of neighbours. *Bioessays* **22**, 599-602.
- Horb, M. E. and Slack, J. M.** (2001). Endoderm specification and differentiation in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* **236**, 330-43.
- Horb, M. E. and Thomsen, G. H.** (1997). A vegetally localized T-box transcription factor in *Xenopus* eggs specifies mesoderm and endoderm and is essential for embryonic mesoderm formation. *Development* **124**, 1689-98.
- Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M. and Wilson, S.** (2002). Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* **35**, 255-65.
- Houart, C., Westerfield, M. and Wilson, S. W.** (1998). A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature* **391**, 788-92.
- Hudson, C., Clements, D., Friday, R. V., Stott, D. and Woodland, H. R.** (1997). Xsox17alpha and -beta mediate endoderm formation in *Xenopus*. *Cell* **91**, 397-405.
- Huelsken, J. and Birchmeier, W.** (2001). New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 547-53.
- Iemura, S., Yamamoto, T. S., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., Sugino, H. and Ueno, N.** (1998). Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9337-42.
- Imai, K. S.** (2003). Isolation and characterization of beta-catenin downstream genes in early embryos of the ascidian *Ciona savignyi*. *Differentiation* **71**, 346-60.
- Imai, Y., Gates, M. A., Melby, A. E., Kimelman, D., Schier, A. F. and Talbot, W. S.** (2001). The homeobox genes *vox* and *vent* are redundant repressors of dorsal fates in zebrafish. *Development* **128**, 2407-20.
- Inoue, A., Takahashi, M., Hatta, K., Hotta, Y. and Okamoto, H.** (1994). Developmental regulation of *islet-1* mRNA expression during neuronal differentiation in embryonic zebrafish. *Dev Dyn* **199**, 1-11.
- Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Tao, H., Thisse, B., Thisse, C., C, V. E. W., Hamada, H., Ohuchi, H. and Noji, S.** (2000). Asymmetric expression of *antivin/lefty1* in the early chick embryo. *Mech Dev* **90**, 115-8.
- Itoh, K. and Sokol, S. Y.** (1997). Graded amounts of *Xenopus* *dishevelled* specify discrete anteroposterior cell fates in prospective ectoderm. *Mech Dev* **61**, 113-25.
- Itoh, K. and Sokol, S. Y.** (1999). Axis determination by inhibition of Wnt signaling in *Xenopus*. *Genes Dev* **13**, 2328-36.
- Jesuthasan, S. and Stahle, U.** (1997). Dynamic microtubules and specification of the zebrafish embryonic axis. *Curr Biol* **7**, 31-42.
- Joly, J. S., Joly, C., Schulte-Merker, S., Boulekbache, H. and Condamine, H.** (1993). The ventral and posterior expression of the zebrafish homeobox gene *eve1* is perturbed in dorsalized and mutant embryos. *Development* **119**, 1261-75.

- Joly, J. S., Maury, M., Joly, C., Duprey, P., Boulekbache, H. and Condamine, H.** (1992). Expression of a zebrafish caudal homeobox gene correlates with the establishment of posterior cell lineages at gastrulation. *Differentiation* **50**, 75-87.
- Jones, C. M., Lyons, K. M., Lapan, P. M., Wright, C. V. and Hogan, B. L.** (1992). DVR-4 (bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. *Development* **115**, 639-47.
- Joubin, K. and Stern, C. D.** (1999). Molecular interactions continuously define the organizer during the cell movements of gastrulation. *Cell* **98**, 559-71.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M. and Kondoh, H.** (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* **16**, 182-7.
- Kanki, J. P. and Ho, R. K.** (1997). The development of the posterior body in zebrafish. *Development* **124**, 881-93.
- Kelly, C., Chin, A. J., Leatherman, J. L., Kozlowski, D. J. and Weinberg, E. S.** (2000). Maternally controlled (beta)-catenin-mediated signaling is required for organizer formation in the zebrafish. *Development* **127**, 3899-911.
- Kelly, G. M., Greenstein, P., Erezyilmaz, D. F. and Moon, R. T.** (1995). Zebrafish *wnt8* and *wnt8b* share a common activity but are involved in distinct developmental pathways. *Development* **121**, 1787-99.
- Kiecker, C. and Niehrs, C.** (2001). A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* **128**, 4189-201.
- Kiefer, P., Strahle, U. and Dickson, C.** (1996). The zebrafish *Fgf-3* gene: cDNA sequence, transcript structure and genomic organization. *Gene* **168**, 211-5.
- Kikuchi, Y., Agathon, A., Alexander, J., Thisse, C., Waldron, S., Yelon, D., Thisse, B. and Stainier, D. Y.** (2001). *casanova* encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish. *Genes Dev* **15**, 1493-505.
- Kikuchi, Y., Trinh, L. A., Reiter, J. F., Alexander, J., Yelon, D. and Stainier, D. Y.** (2000). The zebrafish *bonnie and clyde* gene encodes a Mix family homeodomain protein that regulates the generation of endodermal precursors. *Genes Dev* **14**, 1279-89.
- Kikuchi, Y., Verkade, H., Reiter, J. F., Kim, C. H., Chitnis, A. B., Kuroiwa, A. and Stainier, D. Y.** (2004). Notch signaling can regulate endoderm formation in zebrafish. *Dev Dyn* **229**, 756-62.
- Kim, C. H., Oda, T., Itoh, M., Jiang, D., Artinger, K. B., Chandrasekharappa, S. C., Driever, W. and Chitnis, A. B.** (2000). Repressor activity of *Headless/Tcf3* is essential for vertebrate head formation. *Nature* **407**, 913-6.
- Knezevic V, D. S. R., Mackem S.** (1998). Continuing organizer function during chick tail development. *Acta Biotheor* **125**, 1791-801.
- Knoll, A. H. and Carroll, S. B.** (1999). Early animal evolution: emerging views from comparative biology and geology. *Science* **284**, 2129-37.
- Kramer, C., Mayr, T., Nowak, M., Schumacher, J., Runke, G., Bauer, H., Wagner, D. S., Schmid, B., Imai, Y., Talbot, W. S. et al.** (2002). Maternally supplied *Smad5* is required for ventral specification in zebrafish embryos prior to zygotic *Bmp* signaling. *Dev Biol* **250**, 263-79.



- Krauss, S., Concordet, J. P. and Ingham, P. W.** (1993). A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* **75**, 1431-44.
- Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V. and Fjose, A.** (1991). Expression of the zebrafish paired box gene *pax[zb]* during early neurogenesis. *Development* **113**, 1193-206.
- Kudoh, T., Wilson, S. W. and Dawid, I. B.** (2002). Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development* **129**, 4335-46.
- Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R. and Moon, R. T.** (2000). The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* **16**, 279-83.
- Kunwar, P. S., Zimmerman, S., Bennett, J. T., Chen, Y., Whitman, M. and Schier, A. F.** (2003). Mixer/Bon and FoxH1/Sur have overlapping and divergent roles in Nodal signaling and mesendoderm induction. *Development* **130**, 5589-99.
- Le Douarin, N. M., Teillet, M. A. and Catala, M.** (1998). Neurulation in amniote vertebrates: a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras. *Int J Dev Biol* **42**, 909-16.
- Lee MA, Heasman J, Whitman M.** (2001). Timing of endogenous activin-like signals and regional specification of the *Xenopus* embryo. *Development* **128**, 2939-52.
- Lee, K. H., Xu, Q. and Breitbart, R. E.** (1996). A new tinman-related gene, *nkx2.7*, anticipates the expression of *nkx2.5* and *nkx2.3* in zebrafish heart and pharyngeal endoderm. *Dev Biol* **180**, 722-31.
- Lekven, A. C., Thorpe, C. J., Waxman, J. S. and Moon, R. T.** (2001). Zebrafish *wnt8* encodes two *wnt8* proteins on a bicistronic transcript and is required for mesoderm and neurectoderm patterning. *Dev Cell* **1**, 103-14.
- Leung, T., Bischof, J., Soll, I., Niessing, D., Zhang, D., Ma, J., Jackle, H. and Driever, W.** (2003a). *bozozok* directly represses *bmp2b* transcription and mediates the earliest dorsoventral asymmetry of *bmp2b* expression in zebrafish. *Development* **130**, 3639-49.
- Leung, T., Soll, I., Arnold, S. J., Kemler, R. and Driever, W.** (2003b). Direct binding of *Lef1* to sites in the *boz* promoter may mediate pre-midblastula-transition activation of *boz* expression. *Dev Dyn* **228**, 424-32.
- Levy, V., Marom, K., Zins, S., Koutsia, N., Yelin, R. and Fainsod, A.** (2002). The competence of marginal zone cells to become Spemann's organizer is controlled by *Xcad2*. *Dev Biol* **248**, 40-51.
- Lewis, E.B.** (1978) A Gene Complex Controlling Segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-570.
- Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S. H., Piccolo, S. and De Robertis, E. M.** (1997). *Frzb-1* is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* **88**, 747-56.
- Long, S., Ahmad, N., and Rebagliati, M.** (2003) The zebrafish nodal-related gene *southpaw* is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. *Development* **130**, 2303-2316.
- Lowe, L. A., Yamada, S. and Kuehn, M. R.** (2001). Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development* **128**, 1831-43.
- Lu, C. C., Brennan, J. and Robertson, E. J.** (2001). From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 384-92.
- Lunde, K., Belting, H. G. and Driever, W.** (2004). Zebrafish *pou5f1/pou2*, homolog of mammalian *Oct4*, functions in the endoderm specification cascade. *Curr Biol* **14**, 48-55.
- Lundin, L. G.** (1999). Gene duplications in early metazoan evolution. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 523-30.

- Mangold, O.** (1933). Über die Induktionsfähigkeit der verschiedenen Bezirke der Neurula von Urodelen. *Naturwissenschaften* **21**, 761-766
- Mann, R. S. and Chan, S. K.** (1996). Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet* **12**, 258-62.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B. M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C. et al.** (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* **417**, 664-7.
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. and Niehrs, C.** (2001). LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **411**, 321-5.
- Marcellini, S., Technau, U., Smith, J. C. and Lemaire, P.** (2003). Evolution of Brachyury proteins: identification of a novel regulatory domain conserved within Bilateria. *Dev Biol* **260**, 352-61.
- Marlow, F., Gonzalez, E. M., Yin, C., Rojo, C. and Solnica-Krezel, L.** (2004). No tail co-operates with non-canonical Wnt signaling to regulate posterior body morphogenesis in zebrafish. *Development* **131**, 203-16.
- Marlow, F., Zwartkruis, F., Malicki, J., Neuhauss, S. C., Abbas, L., Weaver, M., Driever, W. and Solnica-Krezel, L.** (1998). Functional interactions of genes mediating convergent extension, knypek and trilobite, during the partitioning of the eye primordium in zebrafish. *Dev Biol* **203**, 382-99.
- Martindale, M. Q., Finnerty, J. R. and Henry, J. Q.** (2002). The Radiata and the evolutionary origins of the bilaterian body plan. *Mol Phylogenet Evol* **24**, 358-65.
- Martindale, M. Q., Pang, K. and Finnerty, J. R.** (2004). Investigating the origins of triploblasty: 'mesodermal' gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone *Nematostella vectensis* (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa). *Development* **131**, 2463-74.
- Martinez-Barbera, J. P., Toresson, H., Da Rocha, S. and Krauss, S.** (1997). Cloning and expression of three members of the zebrafish Bmp family: Bmp2a, Bmp2b and Bmp4. *Gene* **198**, 53-9.
- Massague, J. and Chen, Y. G.** (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* **14**, 627-44.
- Masuda-Nakagawa, L. M., Groer, H., Aerne, B. L. and Schmid, V.** (2000). The HOX-like gene Cnox2-Pc is expressed at the anterior region in all life cycle stages of the jellyfish *Podocoryne carnea*. *Dev Genes Evol* **210**, 151-6.
- McGrew, L. L., Lai, C. J. and Moon, R. T.** (1995). Specification of the anteroposterior neural axis through synergistic interaction of the Wnt signaling cascade with noggin and follistatin. *Dev Biol* **172**, 337-42. *Mech Dev.* **91**, 293-303.
- Melby AE, Warga RM, Kimmel CB.** (1996). Specification of cell fates at the dorsal margin of the zebrafish gastrula. *Development.* **122**, 2225-37.
- Meno, C., Gritsman, K., Ohishi, S., Ohfuji, Y., Heckscher, E., Mochida, K., Shimono, A., Kondoh, H., Talbot, W. S., Robertson, E. J. et al.** (1999). Mouse Lefty2 and zebrafish antivin are feedback inhibitors of nodal signaling during vertebrate gastrulation. *Mol Cell* **4**, 287-98.
- Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K., Kuhara, S. and Hamada, H.** (1997). Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, lefty-1 and lefty-2: their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. *Genes Cells* **2**, 513-24.

- Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y. and Hamada, H.** (1996). Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member *lefty* in mouse embryos. *Nature* **381**, 151-5.
- Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H. and Hamada, H.** (1998). *lefty-1* is required for left-right determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal*. *Cell* **94**, 287-97.
- Meno, C., Takeuchi, J., Sakuma, R., Koshiba-Takeuchi, K., Ohishi, S., Saijoh, Y., Miyazaki, J., ten Dijke, P., Ogura, T. and Hamada, H.** (2001). Diffusion of *nodal* signaling activity in the absence of the feedback inhibitor *Lefty2*. *Dev Cell* **1**, 127-38.
- Minchiotti, G., Manco, G., Parisi, S., Lago, C. T., Rosa, F. and Persico, M. G.** (2001). Structure-function analysis of the EGF-CFC family member *Cripto* identifies residues essential for *nodal* signalling. *Development* **128**, 4501-10.
- Miyata, T. and Suga, H.** (2001). Divergence pattern of animal gene families and relationship with the Cambrian explosion. *Bioessays* **23**, 1018-27.
- Mizuno, T., Yamaha, E., Wakahara, M., Kuroiwa, M. and Takeda, H.** (1996). Mesoderm induction in zebrafish. *Nature* **383**, 131-132.
- Muhr, J., Jessell, T. M. and Edlund, T.** (1997). Assignment of early caudal identity to neural plate cells by a signal from caudal paraxial mesoderm. *Neuron* **19**, 487-502.
- Munoz-Sanjuan, I. and A, H. B.** (2001). Early posterior/ventral fate specification in the vertebrate embryo. *Dev Biol* **237**, 1-17.
- Myers, D. C., Sepich, D. S. and Solnica-Krezel, L.** (2002a). Bmp activity gradient regulates convergent extension during zebrafish gastrulation. *Dev Biol* **243**, 81-98.
- Myers, D. C., Sepich, D. S. and Solnica-Krezel, L.** (2002b). Convergence and extension in vertebrate gastrulae: cell movements according to or in search of identity? *Trends Genet* **18**, 447-55.
- Nasevicius, A. and Ekker, S. C.** (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* **26**, 216-20.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K.** (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-68.
- Nemer, G. and Nemer, M.** (2002). Cooperative interaction between GATA5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development* **129**, 4045-55.
- Neyt, C., Jagla, K., Thisse, C., Thisse, B., Haines, L., Currie, P.D.** (2000) Evolutionary origins of vertebrate appendicular muscle. *Nature* **408**, 82-6.
- Niederlander, C., Walsh, J. J., Episkopou, V. and Jones, C. M.** (2001). *Arkadia* enhances *nodal*-related signalling to induce mesendoderm. *Nature* **410**, 830-4.
- Niehrs, C.** (1999). Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends Genet* **15**, 314-9.
- Niehrs, C.** (2004). Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer. *Nat. Rev. Genet.* **5**:425-434.
- Nieuwkoop, P. D.** (1952). Activation and organisation of the central nervous system in amphibian. III. Synthesis of a new working hypothesis. *J. Exp. Zool.* **120**, 83-108.

- Nieuwkoop, P. D.** (1969). The formation of the mesoderm in urodele amphibians. I. Induction by the endoderm. *Wihlelm Roux Arch Entwicklungsmech. Org.* **162**, 341-373.
- Nieuwkoop, P. D.** (1973). The organization center of the amphibian embryo: its origin, spatial organization, and morphogenetic action. *Adv Morphog* **10**, 1-39.
- Nieuwkoop, P. D.** (1977). Origin and establishment of embryonic polar axes in amphibian development. *Curr Top Dev Biol* **11**, 115-32.
- Nordstrom, U., Jessell, T. M. and Edlund, T.** (2002). Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nat Neurosci* **5**, 525-32.
- Nusslein-Volhard, C., Wieschaus, E.** (1980). Mutations Affecting Segment Number and Polarity in Drosophila. *Nature* **287**, 795-801.
- Ober, E. A. and Schulte-Merker, S.** (1999). Signals from the yolk cell induce mesoderm, neuroectoderm, the trunk organizer, and the notochord in zebrafish. *Dev Biol* **215**, 167-81.
- Odenthal, J. and Nusslein-Volhard, C.** (1998). fork head domain genes in zebrafish. *Dev Genes Evol* **208**, 245-58.
- Oppenheimer, J. M.** (1936). Transplantation experiments on developing teleosts (Fundulus and Perca). *J.Exp. Zool.* **72**, 409-437.
- Osada, S. I., Saijoh, Y., Frisch, A., Yeo, C. Y., Adachi, H., Watanabe, M., Whitman, M., Hamada, H. and Wright, C. V.** (2000). Activin/nodal responsiveness and asymmetric expression of a Xenopus nodal-related gene converge on a FAST-regulated module in intron 1. *Development* **127**, 2503-14.
- Oxtoby, E. and Jowett, T.** (1993). Cloning of the zebrafish krox-20 gene (krx-20) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res* **21**, 1087-95.
- Pasteels, J.** (1943). Proliferations et croissance dans la gastrulation et la formation de la queue des Vertebres. **54**, 1-51.
- Pera EM, Ikeda A, Eivers E, De Robertis EM.** (2003). Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev.* **17**, 3023-8.
- Pera, E. M., Wessely, O., Li, S. Y. and De Robertis, E. M.** (2001). Neural and head induction by insulin-like growth factor signals. *Dev Cell* **1**, 655-65.
- Perea-Gomez, A., Vella, F. D., Shawlot, W., Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Meno, C., Pfister, V., Chen, L., Robertson, E., Hamada, H. et al.** (2002). Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Dev Cell* **3**, 745-56.
- Peyrieras, N., Strahle, U. and Rosa, F.** (1998). Conversion of zebrafish blastomeres to an endodermal fate by TGF-beta-related signaling. *Curr Biol* **8**, 783-6.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T. and De Robertis, E. M.** (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**, 707-10.
- Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J. and Skarnes, W. C.** (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**, 535-8.
- Pogoda, H. M., Solnica-Krezel, L., Driever, W. and Meyer, D.** (2000). The zebrafish forkhead transcription factor FoxH1/Fast1 is a modulator of nodal signaling required for organizer formation. *Curr Biol* **10**, 1041-9.

- Poulain, M. and Lepage, T.** (2002). Mezzo, a paired-like homeobox protein is an immediate target of Nodal signalling and regulates endoderm specification in zebrafish. *Development* **129**, 4901-14.
- Raftery, L. A. and Sutherland, D. J.** (1999). TGF-beta family signal transduction in Drosophila development: from Mad to Smads. *Dev Biol* **210**, 251-68.
- Randall, R. A., Germain, S., Inman, G. J., Bates, P. A. and Hill, C. S.** (2002). Different Smad2 partners bind a common hydrophobic pocket in Smad2 via a defined proline-rich motif. *Embo J* **21**, 145-56.
- Rebagliati, M. R., Toyama, R., Fricke, C., Haffter, P. and Dawid, I. B.** (1998a). Zebrafish nodal-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Dev Biol* **199**, 261-72.
- Rebagliati, M. R., Toyama, R., Haffter, P. and Dawid, I. B.** (1998b). cyclops encodes a nodal-related factor involved in midline signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9932-7.
- Reim, G. and Brand, M.** (2002). Spiel-ohne-grenzen/pou2 mediates regional competence to respond to Fgf8 during zebrafish early neural development. *Development* **129**, 917-33.
- Reim, G., Mizoguchi, T., Stainier, D. Y., Kikuchi, Y. and Brand, M.** (2004). The POU domain protein spg (pou2/Oct4) is essential for endoderm formation in cooperation with the HMG domain protein casanova. *Dev Cell* **6**, 91-101.
- Reiter, J. F., Alexander, J., Rodaway, A., Yelon, D., Patient, R., Holder, N. and Stainier, D. Y.** (1999). Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev* **13**, 2983-95.
- Richardson, M. K., Allen, S. P., Wright, G. M., Raynaud, A. and Hanken, J.** (1998). Somite number and vertebrate evolution. *Development* **125**, 151-60.
- Rodaway, A., Takeda, H., Koshida, S., Broadbent, J., Price, B., Smith, J. C., Patient, R. and Holder, N.** (1999). Induction of the mesendoderm in the zebrafish germ ring by yolk cell-derived TGF-beta family signals and discrimination of mesoderm and endoderm by FGF. *Development* **126**, 3067-78.
- Ruiz i Altaba, A. and Melton, D. A.** (1989). Interaction between peptide growth factors and homoeobox genes in the establishment of antero-posterior polarity in frog embryos. *Nature* **341**, 33-8.
- Sakaguchi, T., Kuroiwa, A. and Takeda, H.** (2001). A novel sox gene, 226D7, acts downstream of Nodal signaling to specify endoderm precursors in zebrafish. *Mech Dev* **107**, 25-38.
- Sakuma, R., Ohnishi Yi, Y., Meno, C., Fujii, H., Juan, H., Takeuchi, J., Ogura, T., Li, E., Miyazono, K. and Hamada, H.** (2002). Inhibition of Nodal signalling by Lefty mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion. *Genes Cells* **7**, 401-12.
- Sampath, K., Rubinstein, A. L., Cheng, A. M., Liang, J. O., Fekany, K., Solnica-Krezel, L., Korzh, V., Halpern, M. E. and Wright, C. V.** (1998). Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signalling. *Nature* **395**, 185-9.
- Sander, K. and Faessler, P. E.** (2001). Introducing the Spemann-Mangold organizer: experiments and insights that generated a key concept in developmental biology. *Int J Dev Biol* **45**, 1-11.
- Saneyoshi, T., Kume, S., Amasaki, Y. and Mikoshiba, K.** (2002). The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos. *Nature* **417**, 295-9.
- Saneyoshi, T., Kume, S., Amasaki, Y. and Mikoshiba, K.** (2002). The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos. *Nature* **417**, 295-9.
- Sasai, Y. and De Robertis, E. M.** (1997). Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev Biol* **182**, 5-20.

- Sasai, Y., Lu, B., Piccolo, S. and De Robertis, E. M.** (1996). Endoderm induction by the organizer-secreted factors chordin and noggin in *Xenopus* animal caps. *Embo J* **15**, 4547-55.
- Saude, L., Woolley, K., Martin, P., Driever, W. and Stemple, D. L.** (2000). Axis-inducing activities and cell fates of the zebrafish organizer. *Development* **127**, 3407-17.
- Schier, A. F.** (2001). Axis formation and patterning in zebrafish. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 393-404.
- Schier, A. F.** (2001). Axis formation and patterning in zebrafish. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 393-404.
- Schier, A. F. and Shen, M. M.** (2000). Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* **403**, 385-9.
- Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Harvey, M., Malicki, J., Solnica-Krezel, L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Stemple, D. L., Rangini, Z. et al.** (1996). Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development* **123**, 165-78.
- Schneider, S., Steinbeisser, H., Warga, R. M. and Hausen, P.** (1996). Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech Dev* **57**, 191-8.
- Schneuwly, S., Kuroiwa, A., Baumgartner, P. and Gehring, W. J.** (1986). Structural organization and sequence of the homeotic gene *Antennapedia* of *Drosophila melanogaster*. *Embo J* **5**, 733-9.
- Schulte-Merker, S., Hammerschmidt, M., Beuchle, D., Cho, K. W., De Robertis, E. M. and Nusslein-Volhard, C.** (1994). Expression of zebrafish goosecoid and no tail gene products in wild-type and mutant no tail embryos. *Development* **120**, 843-52.
- Schulte-Merker, S., Lee, K. J., McMahon, A. P. and Hammerschmidt, M.** (1997). The zebrafish organizer requires chordin. *Nature* **387**, 862-3.
- Schulte-Merker, S., van Eeden, F. J., Halpern, M. E., Kimmel, C. B. and Nusslein-Volhard, C.** (1994). no tail (*ntl*) is the zebrafish homologue of the mouse *T* (*Brachyury*) gene. *Development* **120**, 1009-15.
- Semenov, M. V., Tamai, K., Brott, B. K., Kuhl, M., Sokol, S. and He, X.** (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* **11**, 951-61.
- Seo, H. C., Drivenes, Ellingsen, S. and Fjose, A.** (1998). Expression of two zebrafish homologues of the murine *Six3* gene demarcates the initial eye primordia. *Mech Dev* **73**, 45-57.
- Sepich, D. S., Myers, D. C., Short, R., Topczewski, J., Marlow, F. and Solnica-Krezel, L.** (2000). Role of the zebrafish trilobite locus in gastrulation movements of convergence and extension. *Genesis* **27**, 159-73.
- Shawlot, W., Min Deng, J., Wakamiya, M. and Behringer, R. R.** (2000). The cerberus-related gene, *Cerr1*, is not essential for mouse head formation. *Genesis* **26**, 253-8.
- Shi, Y.** (2001). Structural insights on Smad function in TGFbeta signaling. *Bioessays* **23**, 223-32.
- Shi, Y. and Massague, J.** (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700.
- Shih, J. and Fraser, S. E.** (1996). Characterizing the zebrafish organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage. *Development* **122**, 1313-22.
- Shimamura, K. and Rubenstein, J. L.** (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* **124**, 2709-18.
- Shimizu T, Yamanaka Y, Ryu SL, Hashimoto H, Yabe T, Hirata T, Bae YK, Hibi M, Hirano T.** (2000 ) Cooperative roles of Bozozok/Dharma and Nodal-related proteins in the formation of the dorsal organizer in zebrafish.

- Shimizu, T., Yamanaka, Y., Nojima, H., Yabe, T., Hibi, M. and Hirano, T.** (2002). A novel repressor-type homeobox gene, *ved*, is involved in dharma/bozozok-mediated dorsal organizer formation in zebrafish. *Mech Dev* **118**, 125-38.
- Shinya, M., Eschbach, C., Clark, M., Lehrach, H. and Furutani-Seiki, M.** (2000). Zebrafish *Dkk1*, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate. *Mech Dev* **98**, 3-17.
- Shivdasani, R. A.** (2002). Molecular regulation of vertebrate early endoderm development. *Dev Biol* **249**, 191-203.
- Shu, D. G., Morris, S. C., Han, J., Zhang, Z. F., Yasui, K., Janvier, P., Chen, L., Zhang, X. L., Liu, J. N., Li, Y. et al.** (2003). Head and backbone of the Early Cambrian vertebrate Haikouichthys. *Nature* **421**, 526-9.
- Sidi, S., Goutel, C., Peyrieras, N. and Rosa, F. M.** (2003). Maternal induction of ventral fate by zebrafish *radar*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 3315-20.
- Sirotkin, H. I., Dougan, S. T., Schier, A. F. and Talbot, W. S.** (2000). *bozozok* and *squint* act in parallel to specify dorsal mesoderm and anterior neuroectoderm in zebrafish. *Development* **127**, 2583-92.
- Sirotkin, H. I., Gates, M. A., Kelly, P. D., Schier, A. F. and Talbot, W. S.** (2000). *Fast1* is required for the development of dorsal axial structures in zebrafish. *Curr Biol* **10**, 1051-4.
- Slack, J.M.W. and Isaacs, H.V.** (1994) The Einsteck-Method: Position and structure of projections formed by implants of a ventral character. *Dev. Biol.* **161**, 313-317.
- Solnica-Krezel, L., Stemple, D. L., Mountcastle-Shah, E., Rangini, Z., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Schier, A. F., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S. et al.** (1996). Mutations affecting cell fates and cellular rearrangements during gastrulation in zebrafish. *Development* **123**, 67-80.
- Spemann, H. and Mangold, H.** (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *WilhemRouxArch.Entw.Mech.Org* **100**, 599-638.
- Spemann, H. and Mangold, H.** (2001). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *Int J Dev Biol* **45**, 13-38.
- Stainier, D. Y.** (2002). A glimpse into the molecular entrails of endoderm formation. *Genes Dev* **16**, 893-907.
- Stickney, H. L., Barresi, M. J. and Devoto, S. H.** (2000). Somite development in zebrafish. *Dev Dyn* **219**, 287-303.
- Storey, K. G., Crossley, J. M., De Robertis, E. M., Norris, W. E. and Stern, C. D.** (1992). Neural induction and regionalisation in the chick embryo. *Development* **114**, 729-41.
- Storey, K. G., Goriely, A., Sargent, C. M., Brown, J. M., Burns, H. D., Abud, H. M. and Heath, J. K.** (1998). Early posterior neural tissue is induced by FGF in the chick embryo. *Development* **125**, 473-84.
- Strahle, U., Blader, P., Henrique, D. and Ingham, P. W.** (1993). *Axial*, a zebrafish gene expressed along the developing body axis, shows altered expression in cyclops mutant embryos. *Genes Dev* **7**, 1436-46.
- Strehlow, D., Heinrich, G. and Gilbert, W.** (1994). The fates of the blastomeres of the 16-cell zebrafish embryo. *Development* **120**, 1791-8.
- Struhl, G.** (1981). A homoeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature* **292**, 635-8.
- Tam, P. P., Meier, S. and Jacobson, A. G.** (1982). Differentiation of the metameric pattern in the embryonic axis of the mouse. II. Somitomic organization of the presomitic mesoderm. *Differentiation* **21**, 109-22.

- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P. and He, X.** (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**, 530-5.
- Tanegashima, K., Yokota, C., Takahashi, S. and Asashima, M.** (2000). Expression cloning of Xantivin, a Xenopus lefty/antivin-related gene, involved in the regulation of activin signaling during mesoderm induction. *Mech Dev* **99**, 3-14.
- Technau, U.** (2001). Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm. *Bioessays* **23**, 788-94.
- Technau, U. and Scholz, C. B.** (2003). Origin and evolution of endoderm and mesoderm. *Int J Dev Biol* **47**, 531-9.
- Teillet, M. A., Lapointe, F. and Le Douarin, N. M.** (1998). The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11733-8.
- Teillet, M. A., Lapointe, F. and Le Douarin, N. M.** (1998). The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11733-8.
- Thisse, B., Pflumio, S., Fürthauer, M., Loppin, B., Heyer, V., Degrave, A., Woehl, R., Lux, A., Steffan, T., Charbonnier, X.Q. and Thisse, C.** (2001). Expression of the zebrafish genome during embryogenesis (NIH R01 RR15402). *ZFIN Direct Data Submission.*, <http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?Mival=aa-pubview2.apg&OID=ZDB-PUB-010810-1>.
- Thisse, B., Wright, C. V. and Thisse, C.** (2000). Activin- and Nodal-related factors control antero-posterior patterning of the zebrafish embryo. *Nature* **403**, 425-8.
- Thisse, C. and Thisse, B.** (1999). Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development* **126**, 229-40.
- Thisse, B., Heyer, V., Lux, A., Alunni, V., Degrave, A., Seiliez, I., Kirchner, J., Parkhill, J.P. and Thisse, C.** (2004) Spatial and Temporal Expression of the Zebrafish Genome by Large-Scale In Situ Hybridization Screening *Meth. Cell. Biol.* in the press
- Tiso, N., Filippi, A., Pauls, S., Bortolussi, M. and Argenton, F.** (2002). BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish. *Mech Dev* **118**, 29-37.
- Toivonen, S. and Saxen, L.** (1955). The simultaneous inducing action of liver and bone-marrow of the guinea-pig in implantation and explantation experiments with embryos of Triturus. *Exp Cell Res*, 346-57.
- Tucker, A. S. and Slack, J. M.** (1995). Tail bud determination in the vertebrate embryo. *Curr Biol* **5**, 807-13.
- Valentine, J. W., Jablonski, D. and Erwin, D. H.** (1999). Fossils, molecules and embryos: new perspectives on the Cambrian explosion. *Development* **126**, 851-9.
- Urtishak KA, Choob M, Tian X, Sternheim N, Talbot WS, Wickstrom E, Farber SA.** (2003) Targeted gene knockdown in zebrafish using negatively charged peptide nucleic acid mimics. *Dev Dyn*. **228**, 405-13.
- van de Water, S., van de Wetering, M., Joore, J., Esseling, J., Bink, R., Clevers, H. and Zivkovic, D.** (2001). Ectopic Wnt signal determines the eyeless phenotype of zebrafish masterblind mutant. *Development* **128**, 3877-88.
- Vincent, S. D., Dunn, N. R., Hayashi, S., Norris, D. P. and Robertson, E. J.** (2003). Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals. *Genes Dev* **17**, 1646-62.
- Vogel, A. M. and Gerster, T.** (1999). Promoter activity of the zebrafish bhikhari retroelement requires an intact activin signaling pathway. *Mech Dev* **85**, 133-46.



- Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F. P. and Moos, M., Jr.** (1997). Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* **88**, 757-66.
- Warga, R. M. and Kimmel, C. B.** (1990). Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development* **108**, 569-80.
- Warga, R. M. and Nusslein-Volhard, C.** (1999). Origin and development of the zebrafish endoderm. *Development* **126**, 827-38.
- Watanabe, M. and Whitman, M.** (1999). FAST-1 is a key maternal effector of mesoderm inducers in the early *Xenopus* embryo. *Development* **126**, 5621-34.
- Wehrli, M., Dougan, S. T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A. and DiNardo, S.** (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* **407**, 527-30.
- Weinberg, E. S., Allende, M. L., Kelly, C. S., Abdelhamid, A., Murakami, T., Andermann, P., Doerre, O. G., Grunwald, D. J. and Riggleman, B.** (1996). Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no tail and spadetail embryos. *Development* **122**, 271-80.
- Werner, M. H., Huth, J. R., Gronenborn, A. M. and Clore, G. M.** (1995). Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. *Cell* **81**, 705-14.
- Wessely, O., Agius, E., Oelgeschlager, M., Pera, E. M. and De Robertis, E. M.** (2001). Neural induction in the absence of mesoderm: beta-catenin-dependent expression of secreted BMP antagonists at the blastula stage in *Xenopus*. *Dev Biol* **234**, 161-73.
- Westfall, T. A., Hjertos, B. and Slusarski, D. C.** (2003). Requirement for intracellular calcium modulation in zebrafish dorsal-ventral patterning. *Dev Biol* **259**, 380-91.
- White, J. A., Guo, Y. D., Baetz, K., Beckett-Jones, B., Bonasoro, J., Hsu, K. E., Dilworth, F. J., Jones, G. and Petkovich, M.** (1996). Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *J Biol Chem* **271**, 29922-7.
- Whitman, M.** (2001). Nodal signaling in early vertebrate embryos: themes and variations. *Dev Cell* **1**, 605-17.
- Wienholds E, van Eeden F, Kosters M, Mudde J, Plasterk RH, Cuppen E.** (2003). Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res.* **13**, 2700-7.
- Wilson, V. and Beddington, R. S.** (1996). Cell fate and morphogenetic movement in the late mouse primitive streak. *Mech Dev* **55**, 79-89.
- Wittbrodt, J. and Rosa, F. M.** (1994). Disruption of mesoderm and axis formation in fish by ectopic expression of activin variants: the role of maternal activin. *Genes Dev* **8**, 1448-62.
- Woo, K. and Fraser, S. E.** (1995). Order and coherence in the fate map of the zebrafish nervous system. *Development* **121**, 2595-609.
- Woo, K. and Fraser, S. E.** (1997). Specification of the zebrafish nervous system by nonaxial signals. *Science* **277**, 254-7.
- Wu, L. H. and Lengyel, J. A.** (1998). Role of caudal in hindgut specification and gastrulation suggests homology between *Drosophila* amnioproctodeal invagination and vertebrate blastopore. *Development* **125**, 2433-42.

- Wylie, C. C., Snape, A., Heasman, J. and Smith, J. C.** (1987). Vegetal pole cells and commitment to form endoderm in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **119**, 496-502.
- Yamaguchi, T. P.** (2001). Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol* **11**, R713-24.
- Yamaguchi, T. P.** (2001). Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol* **11**, R713-24.
- Yamaguchi, T. P., Harpal, K., Henkemeyer, M. and Rossant, J.** (1994). *fgfr-1* is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev* **8**, 3032-44.
- Yamamoto, M., Saijoh, Y., Perea-Gomez, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Ang, S. L., Hamada, H. and Meno, C.** (2004). Nodal antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo. *Nature* **428**, 387-92.
- Yanze, N., Spring, J., Schmidli, C. and Schmid, V.** (2001). Conservation of Hox/ParaHox-related genes in the early development of a cnidarian. *Dev Biol* **236**, 89-98.
- Yashiro, K., Saijoh, Y., Sakuma, R., Tada, M., Tomita, N., Amano, K., Matsuda, Y., Monden, M., Okada, S. and Hamada, H.** (2000). Distinct transcriptional regulation and phylogenetic divergence of human LEFTY genes. *Genes Cells* **5**, 343-57.
- Yasuo, H. and Lemaire, P.** (1999). A two-step model for the fate determination of presumptive endodermal blastomeres in *Xenopus* embryos. *Curr Biol* **9**, 869-79.
- Yeo, C. and Whitman, M.** (2001). Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. *Mol Cell* **7**, 949-57.
- Zhang, J., Houston, D. W., King, M. L., Payne, C., Wylie, C. and Heasman, J.** (1998). The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell* **94**, 515-24.
- Zhang, J., Talbot, W. S. and Schier, A. F.** (1998). Positional cloning identifies zebrafish one-eyed pinhead as a permissive EGF-related ligand required during gastrulation. *Cell* **92**, 241-51.
- Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B. L. and Kuehn, M. R.** (1993). Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* **361**, 543-7.

## Si tu te fais - (Fabulous Trobadors)

1. Je vais me faire troubadour  
Pour aller troubler ta nana  
Je lui chanterai l'amour  
et toi tu déchanteras  
*Si tu te fais troubadour  
Moi je me fais compositeur  
Quand tu chanteras l'amour  
Je toucherais les droits d'auteur*

2. Si tu te fais compositeur  
Je me fais la fée Clochette  
Et d'un coup de ma baguette  
Je te change en sol majeur  
*Si tu te fais sol majeur  
je ne sais pas ce que je ferais  
Mais si tu te la fais mineure  
Alors je te détournerai*

3. Si tu te fais détournéur  
De non-majeures ou de minets  
Moi je me fais Jean Mineur  
T'auras de la publicité  
*Si tu te fais cette major  
Je me ferai Séguéla  
Moi je me ferai des couilles en or  
Même en plantant mon candidat*

4. Si tu te fais ce zozo  
Moi je me ferai Zizou  
C'est mon zizi le plus jojo  
Demande a Lizarzou  
*Si toi tu te fais Zidane  
Moi je me ferai Chichi  
Je l'ai grosse comme un âne  
Demande à Tibéri*

5. Si toi tu te fais Chichi  
Moi je me ferai Jospin  
Je reviendrai te faire ièchi  
Quand tu t'y attendras le moins  
*Si toi tu te fais Jospin  
Moi je me ferai Fabuis  
Par devant je ferai copain  
Dans ton dos j'en dis pas plus.*

6. Si toi tu te fais Fabuis  
Je me fais antisémite  
D'un ragot je te discrédite  
Comme j'ai fait pour Dreyfus  
*Si tu te fais cet oiseau-là  
Plein de haine et de jalousie  
Moi je me ferai Zola  
Je te noie dans mon jacuzzi*

7. Si toi tu te fais Zola  
Moi je me fais les Gorgones  
Dès que tu m'as vu au visiophone  
Je te change en gorgonzola  
*Si tu te fais les Gorgones  
Que personnes sait plus qui c'est  
Moi je ma ferai Cambronne  
Ce que je te dis, tout le monde le sait*

8. Si toi tu te fais Cambronne  
Moi je le fais Napoléon  
T'attendras que je l'ordonne  
Pour dire merde, bite ou con  
*Si tu te fais Napoléon  
Moi je me fais Waterloo  
Tu seras là comme un étron  
Je tirerai la chasse d'eau*

9. Si tu te fais Waterloo  
Je me fais François de Closets  
Pour bien fini le jeu de mot  
Que t'as très mal commencé  
*Si tu te fais ce François  
Et son petit humour français  
Pour t'opposer l'humour en soi  
Je me fais François Rabelais*

10. Si tu te fais arabe lais  
Je me fais rebelle berbère  
Et ma guerre nous libère  
Des barbus et des barbelés  
*Si tu te fais belle berbère  
Moi je me fais tyran  
Je te nique avec ta mère  
Et je te voile, à contre-Corân*

11. Si toi tu te fais tyran  
Moi je me fais démocratie  
Ton peuple me trouve attirant  
Demain il te démolit  
*Si tu te fais démocratie  
Moi je me fais terroriste  
Mes attaques à l'improviste  
Désoleront ton pays*

12. Si tu t'en prends au innocents  
Moi je me fais l'armée U.S.  
Je te fous mes boys aux fesses  
T'en sortiras pas vivant  
*Si tu te fais l'armée U.S.  
Illico je me fais coco  
Et je soulève la jeunesse  
Contre tes plans mégalo*

13. Si toi tu te fais coco  
Moi je me ferai coca  
Et malgré tes cocoricos  
Tes enfants boiront que ça.  
*Soi toi tu te fais coca  
Moi je me fais papa bobo  
Les bébés des bons babas  
Ont pour bibi le jaja bio*

14. Si tu te fais ce papa  
Moi je me ferai Mac-Do  
Tu comprendras que t'es gaga  
Quand t'y verras tous tes ados  
*Si toi tu te fais Mac-Do  
Moi je me fais José Bové  
Je monterai un commando  
Et je te démonterais*

15. Si tu te fais José Bové  
Moi je me fais télévision  
Et même si ça sent mauvais  
Tu me lécheras le fion  
*Si tu te fais télévision  
je me fais repas de quartier  
Des millions de conversations  
Naitront loin de tes clichés*

16. Si tu te fais repas de rue  
Moi je me fais casse-pieds  
Vous ne vous entendrez plus  
Quand on sortira les djembés  
*Si toi tu te fais casse-pieds  
Moi je me fais casse-couilles  
Tu l'auras comme une nouille  
Quand je te l'aurais coincée*

17. Si tu te fais casse-couilles  
Tu vas en tripoter un tas  
Moi je me ferai la chtouille  
Et toi tu te la choperas  
*Si toi tu te fais la chtouille  
Moi je me fais SIDA  
Les antibiotiques te zigouillent  
Avec moi on guérit pas*

18. Si toi tu te fais SIDA  
Moi je me fais chaste vierge  
Même en achetant le concierge  
Tu n'enteras pas chez moi  
*Si tu te fais chaste vierge  
Je me fais bâton de berger  
Tu le prendras pour un cierge  
Jusqu'à ce qu'il soit dans ton verger*

19. Si toi tu te fais berger  
Je te réponds en bergère  
Ta verge tu te la gères  
Je ne veux pas l'héberger  
*Si tu te fais cette mégère  
Mal-apprise et embourgeoisée  
Moi je me ferai Shakespeare  
Et je t'apprivoiserais*

20. Si toi tu te fais Shakespeare  
En songe d'une nuit d'été  
Moi je me fais Britney-Spears  
Tu rêveras de mes tétés  
*Si tu te fais Britney Spears  
Moi je me fais les sept nains  
Et tu connaîtras le pire  
Demande à Roger Hanin*

21. Si tu te fais les sept nains  
Moi je me fais Blanche Neige  
Vous me ferez le petit-déje  
Avant de partir au turbin  
*Si tu te fais Blanche-Neige  
Je me fais soleil de plomb  
Mes rayons te poutounèjent  
Tu fondras sous mes suçons*

22. Si toi tu te fais soleil  
Je me fais humble flaque d'eau  
Je refléterai le ciel  
Tu seras pris dans le tableau  
*Si toi tu te fais flaque d'eau  
Moi je me fais incontinent  
Je troublerai ton tableau  
En pissant sans cesse dedans*


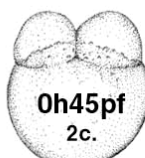
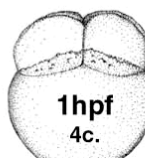
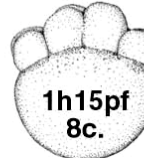

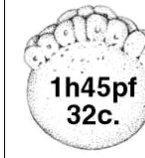

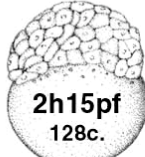


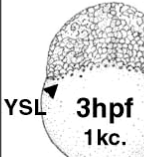
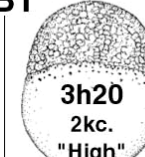











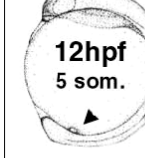



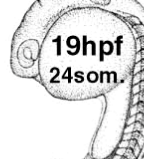

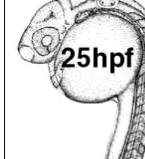
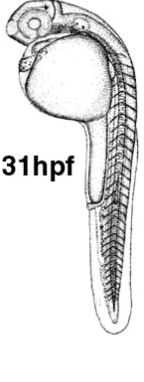
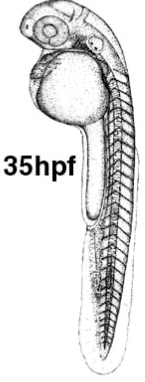
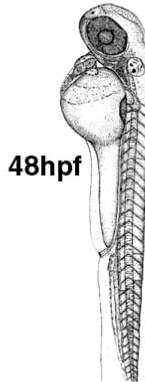
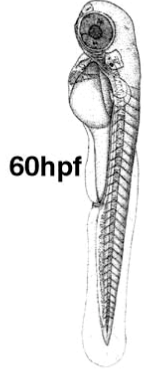
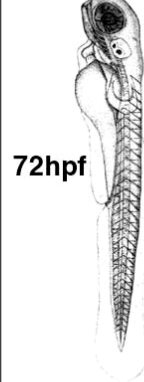
23. Si tu te fais incontinent  
Moi je me ferai la Corse  
Je t'enverrai poisser de force  
Au loin sur le continent  
*Si toi tu te fais la Corse  
Je me fais Chevènement  
Pas question que l'on divorce  
On vivra maritalement*

24. Si tu te fais Chevènement  
J'attendrai sans rien me faire  
Que s'évanouissent les chimères  
Dont tu rêves vainement  
*Si toi tu ne fais rien  
Moi je me fais la France  
Je t'apprendrai avec patience  
Ce que c'est qu'un citoyen*

25. Si toi tu te fais le France  
Moi je me ferai Paris  
Car c'est ici que tout commence  
Et finit à mon profit  
*Si toi tu te fais Paris  
Moi je me fais Toulouse  
T'as le pouvoir t'as le flouze  
Moi c'est moi qui ai le génie*

26. Si toi tu te fais Toulouse  
Moi je me fais Douste-Blazy  
J'ai le pouvoir, j'ai le flouze  
Je te tiens à ma merci  
*Si tu te fais Douste-Blazy  
Moi je reste Claude Sicre  
Et j'arrête tout ton cirque  
Rien qu'avec ma poésie.*

**Annexe 1** : Les principaux stades de développement de l'embryon de poisson zèbre

 0h12pf 1c.	 0h45pf 2c.	 1hpf 4c.	 1h15pf 8c.	 1h30pf 16c.	 1h45pf 32c.
 2hpf 64c.	 2h15pf 128c.	 2h30pf 256c.	 2h45pf 512c.	 3hpf 1kc. YSL MBT	 3h20 2kc. "High"
 3h40pf "Oblong"	 4hpf "Sphère"	 4h20pf "Dome"	 4h40pf 30% ep.	 5h20pf 50% ep.	 5h40pf "Germ Ring"
 6hpf "Shield" V D	 8hpf 75% ep.	 9hpf 90% ep.	 10hpf 100% ep.	 11hpf "Bud"	 12hpf 5 som.
 14hpf. 12 som.	 16hpf 16 som.	 18 hpf 20som.	 19hpf 24som.	 22hpf	 25hpf
 31hpf	 35hpf	 48hpf	 60hpf	 72hpf	

**Repères:** 3hpf: apparition de la YSL; 3h20pf: début de l'expression du génome zygotique; 6hpf: visualisation du côté dorsal (écusson embryonnaire). Début de la gastrulation; 11hpf: formation du bourgeon caudal; 12hpf: Apparition de la vésicule de Kuppfer;

**Abréviations:** hpf <=> heure post fertilisation ; c. <=> cellule; ep.<=> épibolie;  
som. <=> somite; MBT <=> Transition Mid Blastulénne;  
YSL <=> Couche Vitelline Syncytiale

## Annexe 2: Gènes utilisés: abréviations, mutants et références

Nom du gène	Abréviation	Mutant	Nature Moléculaire	Référence
<i>activin8B</i>	<i>act8B</i>		Facteur de croissance	Wittbrodt et Rosa, 1994
<i>anhydrase carbonique</i>	<i>anh.carb.</i>		Enzyme	Thisse et al, 2001
<i>antivin1/lefty1</i>	<i>atv1</i>		Antagoniste de Activin/Nodal	Thisse et Thisse, 1999
<i>antivin2/lefty2</i>	<i>atv2</i>		Antagoniste de Activin/Nodal	Bisgrove et al, 1999
<i>ap2</i>			Facteur de transcription	Thisse et al, 2001
<i>bone morphogenetic protein 2b</i>	<i>bmp2b</i>	<i>swirl (swr)</i>	Facteur de croissance	Martinez-Barbera et al, 1997
<i>bone morphogenetic protein 4</i>	<i>bmp4</i>		Facteur de croissance	Martinez-Barbera et al, 1997
<i>bone morphogenetic protein 7</i>	<i>bmp7</i>	<i>snailhouse (snh)</i>	Facteur de croissance	Dick et al, 2000
<i>chondroïtin sulfate</i>	<i>br146</i>		Enzyme	Thisse et al, 2001
<i>casanova/sox32</i>	<i>cas</i>	<i>casanova (cas)</i>	Facteur de transcription	Kikuchi et al, 2001
<i>caudal/cdx1</i>	<i>cad</i>	<i>cad</i>	Facteur de transcription	Joly et al, 1992
<i>cb5</i>	<i>cb5</i>		?	Thisse et al, 2001
<i>cb611</i>	<i>cb611</i>		?	Thisse et al, 2001
<i>cg3024</i>	<i>cg3024</i>		?	Thisse et al, 2001
<i>cg608</i>	<i>cb568</i>		?	Thisse et al, 2001
<i>chordin</i>	<i>chd</i>	<i>dino (din)</i>	Antagoniste de BMP	Schulte-Merker et al, 1997
<i>collagen a2 type IX</i>	<i>cb343</i>		Protéine de matrice extracellulaire	Thisse et al, 2001
<i>cripto</i>	<i>cripto</i>	<i>one-eye pinhead (oep)</i>	Co-récepteur de Nodal	Zhang et al, 1998
<i>cyp26a</i>	<i>cyp26a</i>		Enzyme	White et al, 1996
<i>dickkopf1</i>	<i>dkk1</i>		Antagoniste de Wnt	Hashimoto et al, 2000
<i>draculin</i>	<i>drac</i>		Protéine à doigt de zinc	Thisse et al, 2001
<i>engrailed 2</i>	<i>en2</i>		Facteur de transcription	Fjose et al, 1992
<i>engrailed 3</i>	<i>en3</i>		Facteur de transcription	Ekker et al, 1992
<i>even-skipped1</i>	<i>evel</i>		Facteur de transcription	Joly et al, 1993
<i>fibroblast growth factor 3</i>	<i>fgf3</i>		Facteur de croissance	Kiefer et al, 1996
<i>fibroblast growth factor 8</i>	<i>fgf8</i>	<i>acerebellar (ace)</i>	Facteur de croissance	Fürthauer et al, 1997
<i>fibroblast growth factor 24</i>	<i>fgf24</i>		Facteur de croissance	Fischer et al, 2003
<i>folliculin 1</i>	<i>fol1</i>		Antagoniste Act/BMP	Bauer et al, 1998
<i>foxA2/hnf3B/axial</i>	<i>foxA2</i>		Facteur de transcription	Strähle et al, 1993
<i>foxA3/hnf3g</i>	<i>foxA3</i>		Facteur de transcription	Dirksen et al, 1995
<i>frizzled related protein b1</i>	<i>frzb1</i>		Antagoniste de Wnt	Thisse et al, 2001
<i>fructose 1,6 biphosphatase</i>	<i>cb598</i>		Enzyme	Thisse et al, 2001
<i>ga716</i>	<i>GA716</i>		Protéine G	Thisse et al, 2001
<i>gata5</i>	<i>gata5</i>	<i>faust (fau)</i>	Facteur de transcription	Rodaway et al, 1999
<i>goosecoid</i>	<i>gsc</i>		Facteur de transcription	Schulte-Merker et al, 1994
<i>hatching gland gene 1</i>	<i>hggl</i>		Enzyme	Thisse et al, 2001
<i>hemoglobine</i>	<i>hb</i>		Chélateur du Fer	Thisse et al, 2001
<i>islet1</i>	<i>Isl1</i>		Facteur de transcription	Inoue et al, 1994
<i>krox20</i>	<i>krox20</i>		Facteur de transcription	Oxtoby et al, 1993
<i>ladybird related 1</i>	<i>lbx1</i>		Facteur de transcription	Neyt et al, 2000
<i>mixer</i>	<i>mix</i>	<i>bonnie and clyde (bon)</i>	Facteur de transcription	Alexander et Stainier, 1999
<i>myoD</i>	<i>myoD</i>		Facteur de transcription	Weinberg et al, 1996
<i>nkx2.3</i>			Facteur de transcription	Lee et al, 1996
<i>noggin1</i>	<i>nog1</i>		Antagoniste de BMP	Fürthauer et al, 1999
<i>notail/brachyury</i>	<i>ntl</i>	<i>notail (ntl)</i>	Facteur de transcription	Schulte-Merker et al, 1994
<i>pax2.1/pax.b</i>	<i>pax2.1</i>	<i>no isthmus (noi)</i>	Facteur de transcription	Krauss et al, 1991
<i>secreted frizzled related protein1</i>	<i>sfrp1</i>		Antagoniste de Wnt	Thisse et al, 2001
<i>six3a</i>	<i>six3a</i>		Facteur de transcription	Seo et al, 1998
<i>smad2</i>	<i>smad2</i>		R-Smad	Dick et al, 2000
<i>sonic-hedgehog</i>	<i>shh</i>	<i>sonic-you (syu)</i>	Facteur de croissance	Krauss et al, 1993
<i>sox17</i>	<i>sox17</i>		Facteur de transcription	Alexander et Stainier, 1999
<i>sox19</i>	<i>sox19</i>		Facteur de transcription	Thisse et al, 2001
<i>sox2</i>	<i>sox2</i>		Facteur de transcription	Thisse et al, 2001
<i>taramA</i>	<i>tarA</i>		Récepteur de l'Activin de type I	Peyriéras et al, 1996
<i>tbx16/vegT/spt</i>	<i>spt</i>	<i>spadetail (spt)</i>	Facteur de transcription	Griffin et al, 1998
<i>tiggy winkle hedgehog</i>	<i>twhh</i>		Facteur de croissance	Ekker et al, 1995
<i>wnt8a</i>	<i>wnt8a</i>	<i>Df(Wnt8)</i>	Facteur de croissance	Kelly et al, 1995
<i>zebrafish nodal related 1</i>	<i>znr1</i>	<i>cyclops (cyc)</i>	Facteur de croissance	Rebagliati et al, 1998
<i>zebrafish nodal related 2</i>	<i>znr2</i>	<i>squint (sqt)</i>	Facteur de croissance	Rebagliati et al, 1998

### **Annexe 3: Abréviations**

A/P	Antéro - Postérieur
A/V	Animal - Végétal
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CNH	Charnière Chordo-Neurale
D/G	Droite - Gauche
D/V	Dorso - Ventral
FGF	Fibroblast Growth Factor
MBT	Transition Mid Blastulénne
Mo	Morpholino
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor
YSL	Couche Vitelline Syncytiale
ZNR	Zebrafish Nodal Related gene



Morpholino Knock-Down of Antivin1 and Antivin2 Upregulates Nodal Signaling

**Antoine Agathon**, Bernard Thisse, Christine Thisse  
Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, CU de Strasbourg,  
France

**Genesis, 2001, vol. 30, n°3, pages 178-182**

Pages 178 à 182 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/85006217/PDFSTART>

- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

Casanova encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish

Yutaka Kikuchi, **Antoine Agathon**, Jonathan Alexander, Christine Thisse, Steven Waldron, Deborah Yelon, Bernard Thisse, and Didier Y.R. Stainier

**Genes & Dev., Jun 2001; 15: 1493 - 1505 ; 10.1101/gad.892301**

Pages 1493 à 1505 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://www.genesdev.org/cgi/content/full/15/12/1493>

- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr)

The molecular nature of the zebrafish tail organizer

**ANTOINE AGATHON, CHRISTINE THISSE & BERNARD THISSE**

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7104, CNRS/INSERM/ULP, 1 rue  
Laurent Fries, BP10142, CU de Strasbourg, 67404 Illkirch Cedex, France

**Nature, 24 July 2003, vol. 424, n° 448 - 452**

Pages 1493 à 1505 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

[http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/nature/journal/v424/n6947/full/nature01822\\_fs.html](http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/nature/journal/v424/n6947/full/nature01822_fs.html)

- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).



**Résumé** □ Contrôle de la détermination des territoires embryonnaires le long de l'axe animal-végétal par les voies de signalisation Nodal, BMP et Wnt chez l'embryon de poisson zèbre (*Danio rerio*).

Les axes embryonnaires des vertébrés sont déterminés très précocement au cours du développement et font intervenir en particulier des facteurs de croissance de la famille des TGF $\beta$ . Alors que l'axe dorso-ventral est mis en place par la signalisation BMP, les feuilletts embryonnaires sont déterminés le long de l'axe animal-végétal par les facteurs Activin/Nodal. J'ai tiré profit des avantages du modèle du poisson zèbre pour étudier l'implication de différents facteurs de croissance pour la mise en place des territoires le long de l'axe animal-végétal.

Je montre ici que les antagonistes sécrétés Antivin1 et Antivin2 sont requis pour contrôler la signalisation Nodal au cours de la formation du mésoderme et de l'endoderme le long de l'axe animal-végétal. La perte de fonction de ces gènes augmente le niveau de stimulation des cellules par la voie Nodal et élargit les territoires de l'endoderme et du mésoderme aux dépens de l'ectoderme.

L'étude de l'activité des TGF $\beta$  le long de l'axe animal-végétal a été poursuivie via l'étude de l'intégration de la signalisation Nodal au sein des cellules de l'endoderme. En collaboration avec l'équipe du Pr. D. Stainier, j'ai identifié un nouveau facteur de transcription appartenant à la famille SoxF qui est muté dans la souche *casanova*, déficiente pour la formation précoce de l'endoderme. Le gène *casanova* est régulé par les facteurs Nodal et contrôle leur expression en retour, assurant ainsi un haut niveau de signalisation Nodal dans les cellules de l'endoderme.

Enfin, j'ai identifié une nouvelle activité organisatrice détenue par les cellules de la marge ventrale qui sont responsables de la formation des tissus non-axiaux de la queue du poisson zèbre. Ce centre organisateur, qui est indépendant du centre organisateur de Spemann, est actif dès le début de l'expression des gènes zygotique et pendant toute la gastrulation. Cette activité dépend d'une triple stimulation des voies de signalisation BMP, Nodal et Wnt8.

Puisqu'il a été démontré que la tête, qui se forme à partir des cellules du pôle animal, est dépourvue de toute activité Nodal, BMP et Wnt, nous proposons qu'au sein de l'embryon en début de gastrulation, il existe un gradient de signalisation BMP, Nodal et Wnt dirigé depuis la marge ventrale vers le pôle animal et qui contrôle la régionalisation le long de l'axe antéro-postérieur.