

**Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)
CNRS – INSERM – Université Louis Pasteur – Strasbourg I
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**

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

par

Sophie DAL-PRA

**soutenue publiquement
le 26 Octobre 2007**

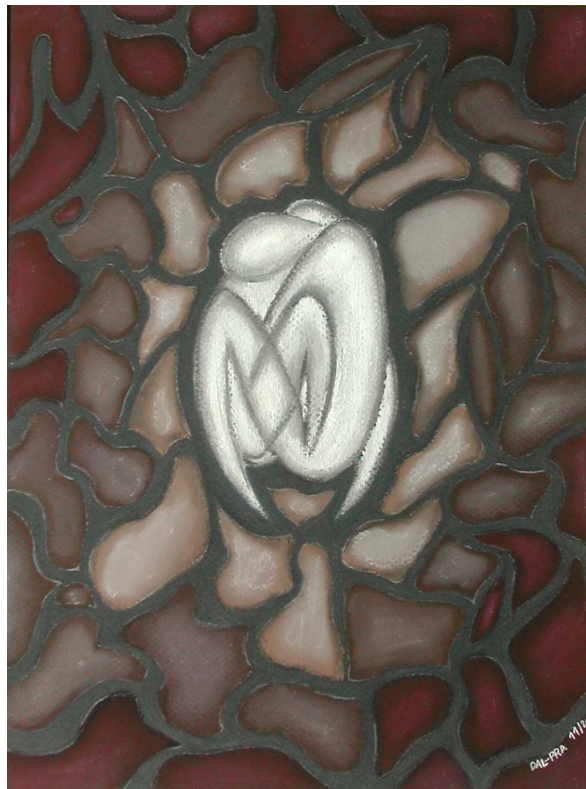
**Etude des mécanismes contrôlant la formation de l'axe
dorso-ventral et analyse de l'établissement et du
maintien des structures axiales au cours de
l'embryogenèse précoce du poisson zèbre (*Danio rerio*).**

Membres du jury

**Pr. Claude KEDINGER
Pr. Danielle DHOUAILLY
Dr. Thierry LEPAGE
Dr. Michel LABOUESSE
Dr. Christine THISSE
Dr. Bernard THISSE**

**Président du jury
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Directrice de Thèse
Co-Directeur de Thèse**

A ma Mère et à Gilles,



Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Christine et Bernard pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire, pour leur encadrement, leur disponibilité, leur conseil et leur soutien tout au long de ma thèse (particulièrement dans cette dernière étape de rédaction...).

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

Un grand merci à tous les membres du laboratoire : pour leurs conseils, leur soutien et surtout pour la bonne humeur qu'ils m'ont témoignée tout au long de ma thèse (quelques soient mes coups de blues ou mon état de stress)

Un grand merci à Jean Daniel (JD pour les intimes !) dont les conseils techniques et les discussions scientifiques ont contribué à l'avancée de mon travail de thèse. Sa disponibilité pour répondre à tous mes questionnements (nombreux !) et mes prises de tête (bien au-delà du boulot...) a été précieuse. Bon vent à toi (et à tes « OK, Robert ! ») !

Merci à Yonghua et FU-I pour leurs conseils techniques (particulièrement pour la biologie moléculaire) et pour m'avoir fait découvrir les plaisirs des biscuits et autres sucreries chinoises et taïwanaises. Bonne route à eux.

Merci à Aline, Marie et Régis : toujours disponibles pour rendre service et aider dans la réalisation des manips (en particulier pour les « fameuses » hybridations in situ). Merci beaucoup.

Un merci sincère et chaleureux à Sandrine qui a pris soin de mon premier outil de travail : mes chers poissons zèbre !! Un grand Merci à eux !!

Merci à l'équipe de W. Driever qui m'a accueillie pendant deux semaines et en particulier à Alida Fillippi qui m'a appris la technique de la double FISH (Un duo Franco-Italien qui a bien fonctionné en pleine coupe du monde de football !) et qui m'a fait découvrir avec Isabelle la jolie ville de Freiburg.

Une pensée pour tous ceux avec qui j'ai partagé quelques mois ou quelques années dans le laboratoire : Vincent (et ses conseils avisés qui m'ont permis de me familiariser avec les techniques du laboratoire quand j'ai débuté ce travail), Iban (son enthousiasme inconditionné et ses réflexions scientifiques...un vrai plaisir !), Marzanna (la gentillesse même !) Aline2, Amira (et sa musique indienne), JP et Johanne (la première à m'avoir enseigné l'art de l'hybridation in situ !).

Un grand merci à tous ceux qui m'ont aidé directement ou indirectement à réaliser ce travail de thèse: le service Imagerie (la patience, les conseils et les explications de Jean Luc, Didier, Pascal et Marc) le service Séquençage, le service Oligos, le service Info (en particulier Antoine pour ses conseils avisés), le service Achat (et la bonne humeur de Peggy et Dominique avec qui je partage le même Monoprix), Evelyne (rien de plus agréable qu'un

grand sourire le matin accompagné d'un « Bonjour Sophie », Maïté (pour son aide précieuse lors de l'impression de ce manuscrit et ses sourires).

Merci à tous ceux que j'ai rencontré ces quatre dernières années dans les couloirs de l'IGBMC ou à la Fac et avec qui j'ai partagé des cafés, des conversations, des fous rires : Marilyne (ma dentiste préférée), Matthew (mon anglais préféré! ;)), Serena (mon italienne préférée), Manu (vive le monitorat et ses formations !), Muriel, Christelle, Sophie, Wassim, Chris, Pierre (« éta » et sa musique), Nada, Alexandre et tous ceux que je n'ai pas cité personnellement...

Enfin, un immense Merci à toute ma famille (Maman, Gilles et Emilie...je vous aime) et mes ami(e)s (Dany, « la vraie rousse » folle de droit ; Nico, ton Vercors me manque ; Aline & Seb, toujours prêts à rendre service ; Emma, ta précieuse expérience scientifique et « lindy hoppeuse » ...) qui m'ont soutenue, aidée et encouragée. Tout ce travail n'aurait jamais été possible sans vous.



“ Si chaque seconde de notre vie doit se répéter un nombre infini de fois, nous sommes cloués à l'éternité comme Jésus-Christ à la croix. Cette idée est atroce. Dans le monde de l'éternel retour, chaque geste porte le poids d'une insoutenable responsabilité. C'est ce qui faisait dire à Nietzsche que l'idée de l'éternel retour est le plus lourd fardeau (das schwerste Gewicht).

Si l'éternel retour est le plus lourd fardeau, nos vies, sur cette toile de fond, peuvent apparaître dans toute leur splendide légèreté.

Mais la pesanteur est-elle vraiment atroce et belle la légèreté ?

Le plus lourd fardeau nous écrase, nous fait ployer sous lui, nous presse contre le sol. (...) Plus lourd est le fardeau, plus notre vie est proche de la terre, et plus elle est réelle et vraie.

En revanche, l'absence totale de fardeau fait que l'être humain devient plus léger que l'air, qu'il s'envole, qu'il s'éloigne de la terre, de l'être terrestre, qu'il n'est plus qu'à demi réel et que ses mouvements sont aussi libres qu'insignifiants.

Alors, que choisir ? La pesanteur ou la légèreté ?

C'est la question que c'est posée Parménide au VI^e siècle avant Jésus-Christ. Selon lui, l'univers est divisé en couples de contraires : La lumière-l'obscurité ; l'épais-le fin ; le chaud-le froid ; l'être-le non-être. Il considérait qu'un des pôles de la contradiction est positif (le clair, le chaud, le fin l'être), l'autre négatif. Cette division en pôles positif et négatif peut nous paraître d'une puérile facilité. Sauf dans un cas : qu'est ce qui est positif, la pesanteur ou la légèreté ?

Parménide répondait : le léger est positif, le lourd est négatif. Avait-il ou non raison ? C'est la question. Une seule chose est certaine. La contradiction lourd-léger est la plus mystérieuse et la plus ambiguë de toutes les contradictions.”

Milan Kundera

L'insoutenable légèreté de l'être

Introduction 9

- I. De la cellule œuf à un organisme pluricellulaire complexe : 10
 - I.1. Une question en amène une autre... 10
 - I.2. Les étapes de l'embryogenèse : 10
- II. Le poisson zèbre : un modèle de choix pour l'étude du développement embryonnaire 12
- III. Les principales étapes de l'embryogenèse du poisson zèbre 13
 - III.1. La segmentation (0h - 2 ¼ h) 13
 - III.2. La Blastulation (2 ¼ h - 5 ¼ h) 13
 - III.3. La gastrulation (5 ¼ h – 10h) 14
 - III.4. La somitogenèse (10 h – 24 h) 15
 - III.5. Après 24 hpf... 15
- IV. La carte des territoires présomptifs 16
- V. Propriétés de l'écusson embryonnaire : le centre organisateur de Spemann 16
 - V.1. La découverte du centre organisateur de Spemann 17
 - V.2. L'activité du centre organisateur de Spemann 17
 - V.3. L'identité moléculaire du centre organisateur de Spemann 18
 - V.4. La structure analogue au centre organisateur de Spemann chez le poisson zèbre : l'écusson embryonnaire 18
 - V.5. La découverte du champ organisateur chez le poisson zèbre 19
- VI. But de mon travail 21

Partie I : Etude des mécanismes contrôlant la mise en place de l'axe Dorso-Ventral..... 23

Partie I : Introduction 24

- I. La voie de signalisation des Bone Morphogenetic Protein (BMP) : 24
 - I.1. Activation de la voie de signalisation des TGFβ : 24
 - I.2. Transduction du signal TGFβ : 25
 - I.3. Modulation de l'activité de la voie des TGFβ : 25
- II. L'activité morphogénétique des BMP dans la mise en place de l'axe Dorso-Ventral : 26
- III. L'établissement d'un gradient Dorso-Ventral d'activité des BMP : 28
 - III.1. La régulation transcriptionnelle des bmp : 28
 - III.2. La régulation post-traductionnelle des bmp : 29
 - III.2.a. Les antagonistes Chordin, Noggin et Follistatin : 30
 - III.2.b. Les autres modulateurs : Tolloïd et Sizzled 34
 - III.2.c. De nouveaux antagonistes : Gremlin et Tsukushi 34
- IV. But de mon travail : 38

Partie I : Publication..... 39

Partie I : Résultats Complémentaires 40

- I. Contribution de l'antagoniste Gremlin à l'établissement de l'axe DV du poisson zèbre : 40
 - I.1. La sur-expression de gremlin dorsalise les embryons : 41
 - I.2. La simple perte de fonction de Gremlin a peu d'effet sur le développement de l'axe DV : 42
- II. Contribution de l'antagoniste Tsukushi à l'établissement de l'axe DV du poisson zèbre : 43

Partie I : Discussion et Perspectives 45

- I. Nog1 est-il impliqué dans le développement du telencéphale ? 45
- II. Fstl2 n'est pas capable, à lui seul, d'inhiber l'activité des BMP. 47
- III. Fonction redondante des antagonistes Chd, Nog1 et Fstl2 dans la spécification de l'axe DV 48
- IV. D'autres facteurs sécrétés participent à l'antagonisme des BMP lors de la spécification de l'axe DV. 49
- V. L'activité redondante de multiples antagonistes des BMP, pendant la régionalisation DV de l'embryon, est conservée chez le xénope 51

VI. Conclusion	52
Partie II : Etude du développement des structures axiales	53
Partie II : Introduction	54
I. Le développement des structures axiales	54
I.1. Qu'est ce que les structures axiales ?	54
I.2. Origine des structures axiales : la Charnière Chordo-Neurale (CNH):	55
I.3. Induction et régionalisation animal-marginal du mésendoderme par la voie Activine/Nodal: ..	57
I.4. Régionalisation antéro-postérieure du mésoderme axial par la voie Nodal:	58
I.5. Détermination des différentes structures de l'axe : le rôle des gènes cibles de la voie Nodal ...	59
I.5.a. La plaque préchordale : Goosecoid	59
I.5.b. Le chordamésoderme : Floating head et Notail	60
I.6. Détermination de l'identité des précurseurs de l'axe : la voie de signalisation Notch	62
I.6.a. La voie de signalisation Notch :	62
I.6.b. Rôle dans le développement de l'hypochorde :	63
I.6.c. Rôle dans le développement de la plaque du plancher :	63
I.7. La morphogenèse et la différenciation des structures axiales	64
I.7.a. De la plaque préchordale à la glande d'éclosion:	64
I.7.b. Du chordamésoderme à la notochorde :	66
I.7.c. Différenciation de la plaque du plancher :	68
I.7.d. Différenciation de l'hypochorde :	69
II. La famille de facteurs de transcription Fox	70
II.1. Identification de la famille de facteurs de transcription à domaine fork head :	70
II.2. Classification et nomenclature des membres de la famille Fox :	70
II.3. Le domaine Fork head :	70
II.4. Les autres domaines protéiques conservés au sein de la famille FoxA :	71
II.5. Activité des Facteurs de Transcription du sous-groupe FoxA :	71
II.6. Conservation des domaines d'expression des gènes de la famille FoxA chez les vertébrés :	72
II.7. Régulation de l'expression des gènes de la famille FoxA chez les vertébrés :	73
II.8. Fonctions connues des membres de la famille FoxA chez les vertébrés :	74
II.9. La famille FoxA chez le poisson zèbre:	75
II.9.a. Notions générales :	75
II.9.b. Expression des gènes de la famille <i>foxA</i> au cours du développement embryonnaire :	75
II.9.c. Fonctions connues des gènes de la famille <i>foxA</i> au cours du développement de l'embryon de poisson zèbre :	76
III. But de mon étude	78
Partie II : Résultats	79
I. Le facteur FoxA3 est indispensable à la différenciation de la plaque préchordale :	79
I.1. L'inactivation de FoxA3 abolit le développement de la glande d'éclosion.	79
I.2. FoxA3 est indispensable à la différenciation de la plaque préchordale mais pas à son induction. 80	
I.3. L'expression de marqueurs spécifiques de la plaque préchordale est perturbée chez les morphants FoxA3.	80
I.4. L'inactivation de FoxA3 perturbe le développement de l'endoderme adjacent à la plaque préchordale.	81
I.5. L'expression du gène <i>ntl</i> est maintenue dans la plaque préchordale des morphants FoxA3 : ...	82
I.6. Le maintien de l'expression du gène <i>ntl</i> n'est pas responsable de l'absence de glande d'éclosion chez les morphants FoxA3	82
I.7. Conclusions :	83
II. Les facteurs FoxA2 et FoxA3 fonctionnent de façon redondante dans le développement des structures axiales	84

II.1.	L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 abolit le développement de l'ensemble des structures axiales à 30 hpf :	84
II.1.a.	Analyse morphologique à 30 hpf :	84
II.1.b.	Analyse moléculaire à 30 hpf :	85
II.1.c.	Analyse de l'apoptose et de la prolifération cellulaire :	90
II.2.	L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 affecte le développement des structures voisines de l'axe :	92
II.3.	Les précurseurs de l'axe sont correctement induits mais pas maintenus pendant la gastrulation en absence de FoxA2 et FoxA3. :	92
II.3.a.	L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 n'affecte pas l'induction des précurseurs de l'axe au début de la gastrulation. :	93
II.3.b.	Le territoire notochordal présomptif n'est pas maintenu au cours de la gastrulation en absence de FoxA2 et FoxA3. :	94
II.4.	Le mésoderme paraxial est étendu dorsalement et fusionne le long de la ligne médiane en absence de FoxA2 et FoxA3. :	94
II.5.	L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 n'affecte pas le développement de l'endoderme. :	95
II.6.	Les expressions de FoxA2 et FoxA3 sont indépendantes l'une de l'autre. :	96
II.7.	L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 affecte de façon importante la voie de signalisation Hedgehog pendant la gastrulation. :	96
II.8.	L'activité de la voie Nodal est affectée dans la partie postérieure de l'axe des doubles morphants FoxA2-FoxA3 pendant la gastrulation. :	97
II.9.	Conclusions :	97
III.	Détermination de l'activité des facteurs FoxA2 et FoxA3 par des sur-expressions généralisées ou localisées. :	99
III.1.	Caractérisation du phénotype résultant de la surexpression généralisée de foxA2 et/ou foxA3 :	99
III.1.a.	La sur-expression de foxA2 ou foxA3 entraîne une duplication partielle de l'axe dorsal des embryons à 30 hpf. :	99
III.1.b.	La sur-expression de foxA2 ou foxA3 perturbe le développement de la glande d'éclosion à 30 hpf. :	100
III.1.c.	La duplication partielle de l'axe des embryons sur-exprimant foxA2 ou foxA3 ne résulte pas de l'induction d'un nouveau centre organisateur de Spemann. :	100
III.1.d.	La sur-expression de foxA2 ou foxA3 induit un élargissement du mésoderme axial pendant la gastrulation. :	101
III.1.e.	La sur-expression de foxA2 est capable d'induire la formation d'axes secondaires partiels avec une faible fréquence à 30 hpf. :	102
III.2.	L'expression ectopique des facteurs FoxA2 et FoxA3 au pôle animal n'induit pas la formation de notochorde ectopique :	103
III.2.a.	Les facteurs foxA2 et/ou foxA3 ne sont pas capables d'induire de la formation de notochorde quand ils sont exprimés au pôle animal. :	103
III.2.b.	L'expression ectopique de foxA2 et foxA3 en combinaison avec nodal et bmp n'induit pas la formation de queues ectopiques contenant de la notochorde. :	104
III.3.	Conclusions :	105
IV.	Les facteurs FoxA2 et FoxA3 fonctionnent de façon redondante à Flh dans la mise en place des structures axiales :	106
IV.1.	Phénotype de la perte de fonction du gène floating head (flh) :	106
IV.2.	L'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 n'abolit pas l'expression de flh, et inversement :	107
IV.3.	FoxA2, FoxA3 et Flh ont des activités redondantes dans la mise en place des structures axiales :	108
IV.3.a.	La triple inactivation partielle de FoxA2, FoxA3 et Flh abolit le développement des structures axiales à 30 hpf. :	109
IV.3.b.	FoxA2 FoxA3 et Flh fonctionnent de façon redondante pendant la gastrulation :	110
IV.4.	L'activité du facteur Flh est responsable du maintien des structures axiales antérieures en absence de FoxA2 et FoxA3. :	111
IV.5.	Conclusions :	111
V.	FoxA1 contribue avec FoxA2 et FoxA3 à la mise place des structures axiales. :	113
V.1.	La simple inactivation de FoxA1 n'affecte pas le développement des structures axiales. :	113

V.2.	FoxA1 fonctionne de façon redondante à FoxA2 et FoxA3 dans le développement des structures de la ligne médiane.....	114
V.3.	L'activité de FoxA1 est requise dès le début de la somitogenèse pour maintenir, avec FoxA2 et FoxA3, le développement des structures axiales.	115
V.4.	Conclusions :	115
Partie II : Discussion et Perspectives.....		116
I.	Le facteur FoxA3 est indispensable à la différenciation de la glande d'éclosion :	116
II.	Les facteurs de la famille FoxA sont nécessaires au développement des structures axiales.	119
II.1.	Les facteurs de la famille FoxA ont des activités redondantes.	119
II.2.	Les facteurs de la famille FoxA sont requis pour le développement de la Charnière Chordo-Neurale.....	120
II.3.	Que deviennent les précurseurs des structures axiales en absence des facteurs de la famille FoxA ?	121
II.4.	Les facteurs de la famille FoxA sont requis à la fois pour le maintien de l'identité des précurseurs de l'axe et pour leur différenciation ultérieure.	123
II.5.	Les activités redondantes des membres de la famille FoxA sont-elles conservées chez les vertébrés ?	124
II.6.	Activité des facteurs FoxA2 et FoxA3.....	124
II.7.	Qu'y a-t-il en amont des facteurs de la famille FoxA ?.....	125
II.8.	Qu'y a-t-il en aval des facteurs de la famille FoxA ?.....	126
III.	Les facteurs de la famille FoxA sont partiellement redondant à Flh :	127
III.1.	L'absence de structures axiales chez les morphants FoxA2-FoxA3 ne résulte pas de la simple absence de Flh :	127
III.2.	Les facteurs FoxA2, FoxA3 et Flh ont des activités partiellement redondantes :	127
III.3.	Modèle :	128
IV.	Conclusions	130
Conclusion.....		131
Annexes		135
Matériel et Méthodes		136
I.	Souches de poisson utilisées :	136
II.	Déchorionnage et maintien des embryons :.....	136
III.	Injections dans les embryons de poisson zèbre.....	137
III.1.	Préparation de la solution d'injection.....	137
III.2.	Injection généralisée	137
III.3.	Injection localisée et tri des embryons selon la répartition DV des clones injectés.....	137
III.4.	Injection au pôle animal.....	137
III.5.	Préparation des aiguilles	138
IV.	Synthèse des ARN sens	138
V.	Utilisation des Morpholinos	138
VI.	Simple Hybridations <i>in situ</i>	139
VII.	Double Hybridations <i>in situ</i> Fluorescentes (FISH):	139
VIII.	Détection des cellules en apoptose sur des embryons entiers : méthode du TUNEL (Terminal transferase dUTP Nick End Labeling).....	141
IX.	Détection des cellules prolifératives sur des embryons entiers : immunohistochimie utilisant l'anticorps anti-phosphohistone H3	142
Abréviations.....		144
Bibliographie		147
Résumé		167

Introduction



Introduction

I. De la cellule œuf à un organisme pluricellulaire complexe :

1.1. Une question en amène une autre...

Le but fondamental de la biologie du développement est de comprendre comment une simple cellule œuf, le zygote, est capable de donner un organisme multicellulaire complexe.

Cette simple question soulève, à elle seule, de nombreuses autres interrogations.

En effet, comment la cellule œuf acquiert-elle sa pluricellularité ? En d'autres termes quels sont les mécanismes qui lui permettent de se diviser et comment ces divisions cellulaires sont-elles contrôlées ?

De plus, le zygote unicellulaire est à l'origine de plusieurs centaines de types cellulaires différents. Comment une telle diversité est-elle générée ? Et quels sont les mécanismes moléculaires qui sont responsables de la spécification de l'identité d'une cellule et de sa différenciation ultérieure ?

Enfin, les cellules qui composent l'organisme ne se développent pas n'importe comment. Elles s'organisent les unes par rapport aux autres afin de former des tissus puis des organes fonctionnels qui s'organiseront à leur tour, pour former un organisme complexe et polarisé. Quels sont les événements moléculaires et cellulaires qui gouvernent cette organisation au sein de l'embryon ?

Au cours de ma thèse je me suis consacrée à la compréhension de quelques uns des aspects que je viens d'évoquer. En particulier, j'ai étudié les mécanismes moléculaires responsables de la mise en place de la polarité Dorso-Ventrale de l'embryon et ceux qui interviennent dans le développement des cellules qui possèdent l'identité la plus dorsale au sein de l'embryon, les structures axiales.

1.2. Les étapes de l'embryogenèse :

Pour passer de la cellule œuf à un organisme pluricellulaire complexe, le zygote va devoir se diviser, se différencier et s'organiser. Ces transformations vont s'opérer au cours des différentes étapes qui constituent l'embryogenèse : la fertilisation, la segmentation, la gastrulation et l'organogenèse.

L'embryogenèse débute avec la fertilisation qui est caractérisée par la fusion des gamètes mâles et femelles pour former le zygote. Immédiatement après, l'embryon, qui à ce stade n'est

composé que d'une seule et grande cellule, subit plusieurs cycles de divisions mitotiques rapides. Ces divisions cellulaires se font sans changement de la taille totale de l'embryon si bien qu'à la fin de l'étape de segmentation, la blastula obtenue est constituée de nombreuses cellules de petite taille. La blastulation est une étape importante pendant laquelle le génome zygotique commence à être exprimé, c'est la transition mi-blastuléenne (MBT : Mid-Blastula Transition). De plus, les éléments de base du plan d'organisation des vertébrés tels que les axes de polarité ainsi que les feuilletts embryonnaires sont spécifiés pendant la blastulation. L'étape suivante, la gastrulation, est le siège de plusieurs événements complexes qui permettent de mettre en place les trois feuilletts embryonnaires qui ont été spécifiés précédemment. L'ectoderme se positionne à l'extérieur, l'endoderme est situé en profondeur et entre ces deux feuilletts, le mésoderme se développe. Chacun de ces feuilletts embryonnaires est à l'origine de types cellulaires particuliers. L'ectoderme donne l'épiderme, le système nerveux, les crêtes neurales, les placodes et les organes sensoriels. L'endoderme produit le tube digestif et les organes qui lui sont associés. Le mésoderme donne naissance à de nombreux dérivés qui contribuent à la formation du squelette, des muscles, du système vasculaire et du sang, mais aussi des organes tels que les reins et les gonades (parties non germinatives). L'organisation des trois feuilletts embryonnaires fait intervenir des mouvements morphogénétiques complexes qui non seulement permettent de positionner ces feuilletts les uns par rapport aux autres mais établissent les axes de polarité de l'embryon : l'axe Dorso-Ventral (DV), l'axe Antéro-Postérieur (AP) et l'axe Droite-Gauche. A la fin de la gastrulation, les territoires sont donc spécifiés et organisés mais leur différenciation et l'acquisition de leur morphologie tridimensionnelle ne se feront qu'au cours de l'étape suivante, l'organogenèse.

Les premières étapes de l'embryogenèse sont donc extrêmement riches en événements moléculaires et cellulaires. L'organisation générale de l'embryogenèse en différentes étapes de segmentation, de gastrulation et d'organogenèse est incroyablement bien conservée des insectes aux mammifères. L'exemple le plus couramment utilisé pour illustrer ce point est l'analyse comparative des embryons de vertébrés au stade neurula. Bien que les organismes adultes présentent une grande diversité morphologique d'une espèce à l'autre, à ce stade, les embryons sont très semblables. Ce stade embryonnaire a ainsi été qualifié de stade phylotypique (c'est à dire le « stade typique du *phylum* », *phylum* étant synonyme d'embranchement) et illustre à quel point l'organisation générale de l'embryogenèse est conservée d'une espèce à l'autre (Slack et al., 1993) (Fig.1).

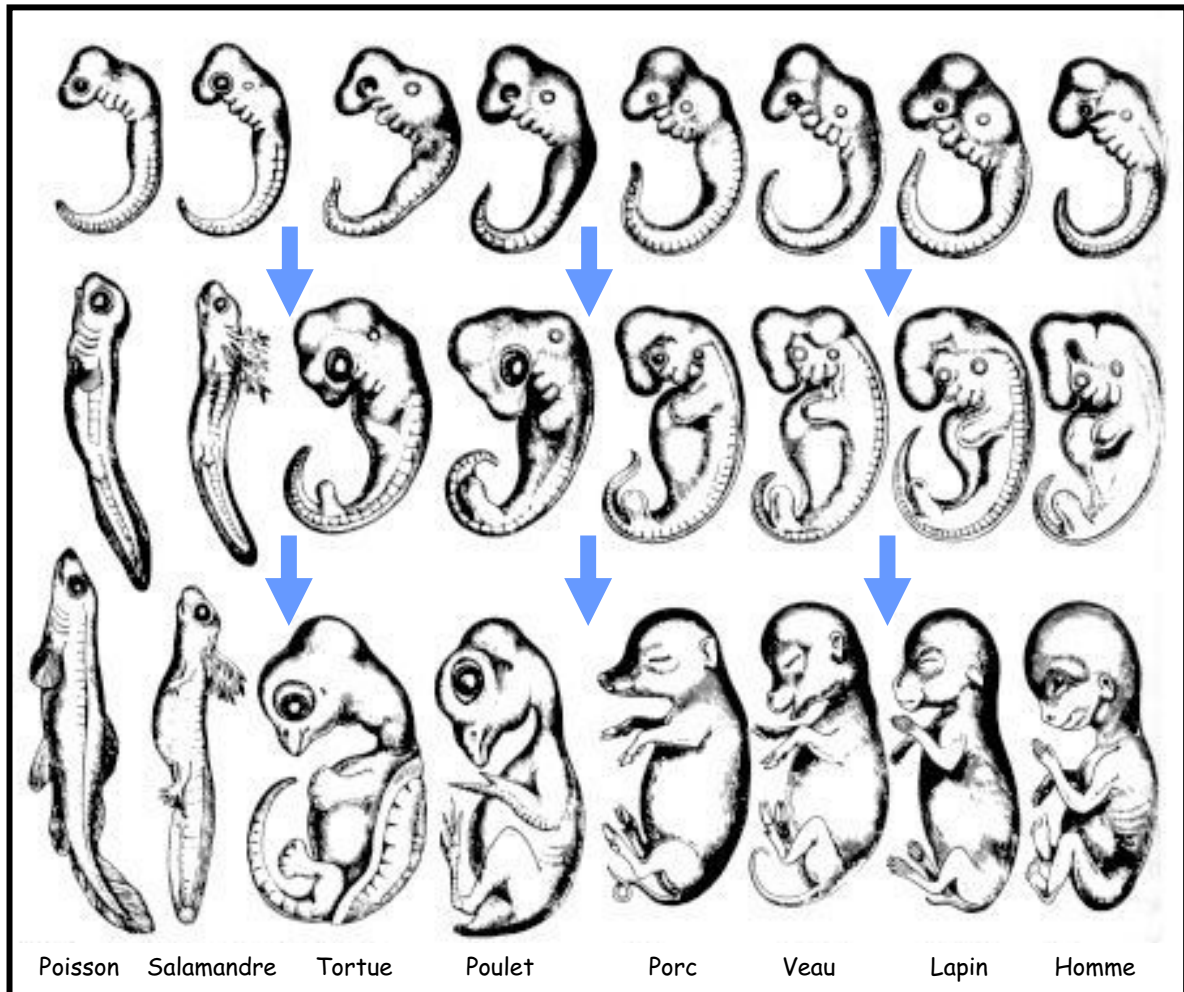


Figure 1: Illustration du stade phylotypique.

Dessin réalisé par Ernest Haeckel en 1874 pour illustrer le stade phylotypique. Les flèches indiquent le sens de progression du développement embryonnaire. Au début de la neurulation, les embryons de vertébrés sont très semblables. C'est le stade phylotypique. Puis les embryons acquièrent les caractéristiques propres à leur espèce et se différencient les uns des autres.

Dans la réalité, au stade phylotypique, les embryons ne sont pas aussi ressemblants que ce dessin le laisse penser. Il s'est avéré qu' Ernest Haeckel avait prit quelques libertés dans sa représentation graphique des embryons au stade phylotypique.

Afin d'étudier le développement précoce des vertébrés, on dispose de différents organismes modèles et notamment le poisson zèbre. L'utilisation de ce poisson en tant qu'organisme modèle s'est considérablement développée depuis le début des années 90 en raison des nombreux avantages qu'il présente pour la biologie du développement. Chez cette espèce, l'étude de la mise en place des axes embryonnaires et du développement des tissus peut être abordée en utilisant à la fois des approches embryologiques, moléculaires et génétiques de la biologie.

II. Le poisson zèbre : un modèle de choix pour l'étude du développement embryonnaire

Le poisson zèbre, *Danio rerio*, est un poisson tropical d'eau douce. Il a été utilisé pour la première fois comme modèle génétique pour l'étude du développement embryonnaire par Georges Streisinger en 1981 (Streisinger et al., 1981). En effet, ce téléostéen offre de nombreux avantages. Son élevage est facile et ne requiert que peu d'espace, chaque adulte ne mesurant que trois à quatre centimètres de long. Maintenu à 28,5°C selon un cycle de 14h de jour et 10h de nuit, le poisson zèbre est extrêmement résistant et très prolifique. L'accouplement est synchronisé avec le réveil. En laboratoire, quand la lumière s'allume, le mâle déclenche la ponte de la femelle par des stimulations abdominales. Plusieurs centaines d'œufs sont alors pondus et fertilisés dans le milieu extérieur. On peut ainsi disposer d'un nombre important d'embryons, dans un laps de temps court et sans sacrifice de la femelle. Les embryons ont la particularité d'être transparents permettant une observation facile du développement des tissus et des organes. Leur développement est rapide (24 h suffisent à leur embryogenèse) et synchrone. De plus, leur temps de génération n'étant que de trois mois, il est possible de réaliser des études génétiques (mutagenèse, transgenèse)

Bien que ce modèle animal ait été introduit dans les années 80, son utilisation ne s'est généralisée que dans les années 90 grâce à la réalisation de plusieurs cribles de mutagenèse aléatoire (Haffter et al., 1996). La plupart des mutants utilisés actuellement ont été générés lors de ces cribles. Chez le poisson zèbre, il n'est pas possible de réaliser la perte de fonction d'un gène spécifique par mutagenèse dirigée, cependant différentes techniques ont été mises au point pour palier à ce problème. La première, le TILLING, associe une mutagenèse aléatoire à un crible systématique des gènes mutés par PCR. Cette méthode permet d'identifier assez rapidement une mutation pour un gène souhaité (Wienholds et al., 2003). La seconde

est basée sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens modifiés de l'ordre de 25 bases, les morpholinos (Nasevicius and Ekker, 2000). Ces petites séquences s'hybrident de façon spécifique à un ARNm donné et empêchent sa traduction. Spécifiques et faciles à délivrer, les morpholinos offrent de nombreux avantages. Ils fonctionnent de façon dose-dépendante et peuvent être utilisés en combinaison, permettant l'inactivation simultanée de la fonction de plusieurs gènes. Ces différentes caractéristiques, associés à l'embryogenèse rapide du poisson zèbre, font du morpholino un outil puissant pour l'étude de la fonction des gènes. Outre ces aspects génétiques et moléculaires, le poisson zèbre est accessible aux techniques classiques d'embryologie par micro-manipulation. De plus, compte tenu de sa transparence et de l'avancée des techniques d'imagerie, l'utilisation de molécules fluorescentes s'est largement répandue. L'ensemble de ces caractéristiques font du poisson zèbre un modèle puissant pour l'étude de la fonction des gènes pendant la mise en place des axes embryonnaires et le développement précoce des tissus.

III. Les principales étapes de l'embryogenèse du poisson zèbre

III.1. La segmentation (0h - 2 ¼ h)

L'œuf de poisson zèbre, tout comme celui du poulet, est télolécithe. Dès que l'œuf est fertilisé, le cytoplasme non vitellin est séparé du reste du vitellus. Le blastodisque ainsi ségrégué, repose sur la réserve vitelline au pôle animal définissant la polarité Animal/Végétative. Initialement, les divisions cellulaires sont synchrones et orientées. Les 5 premières (des stades 1 cellule à 32 cellules) se font dans le plan vertical et chacune d'entre elles est orientée perpendiculairement par rapport à la précédente (Fig.2). En revanche, la sixième division passe par le plan équatorial créant ainsi une deuxième couche cellulaire. De plus, les cellules marginales restent en contact étroit avec la réserve vitelline grâce à des ponts cytoplasmiques. A partir de là, les divisions ne sont plus orientées.

III.2. La Blastulation (2 ¼ h - 5 ¼ h)

L'embryon continue de se diviser jusqu'à atteindre 1024 cellules (3h), stade auquel débute l'activité du génome zygotique : c'est la Transition Mid-Blastuléenne (ou Mid Blastula Transition, MBT). La MBT marque la fin des divisions cellulaires synchrones. A cette même période, les cellules marginales qui étaient connectées à la réserve vitelline, fusionnent avec elle, déversant ainsi leur cytoplasme et leur noyau dans le vitellus. Ces noyaux restent à la

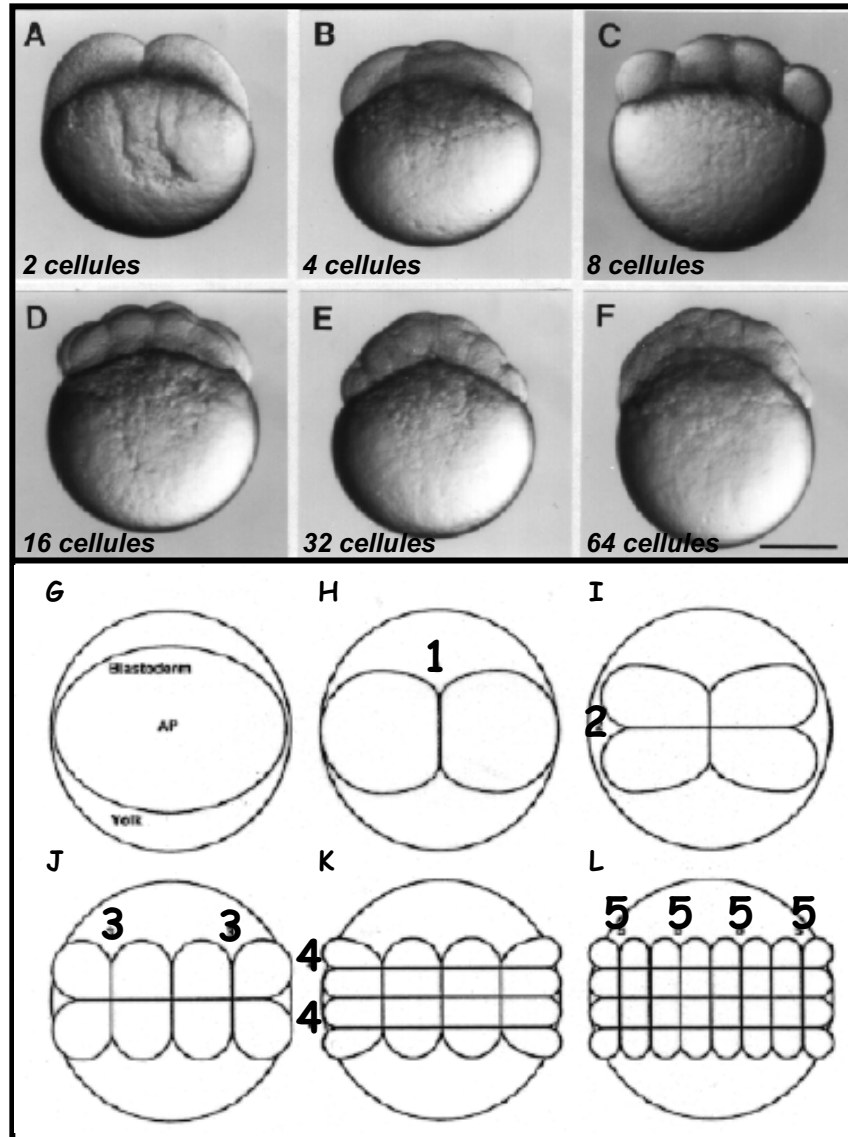


Figure 2: Les premières divisions de l'embryon de poisson zèbre.

Sur le panneau du haut (A-F), les embryons sont présentés en vue latérale. Pour chaque image le stade embryonnaire est indiqué en bas à gauche.

Sur le panneau du bas (G-L), les plans de clivages des cinq premières divisions cellulaires sont indiqués (numéros) à l'aide de dessins schématiques représentant les embryons en vue animale.

Les 5 premières divisions se font dans le plan vertical et chacune d'entre elles est orientée perpendiculairement par rapport à la précédente (G-L). La sixième division passe par le plan équatorial et crée une deuxième couche cellulaire (F).

Figure adaptée de *Kimmel et al. 1995*

surface de la réserve vitelline et forme un syncytium, appelé : couche syncytiale vitelline (ou *Yolk Syncytial Layer*, YSL). Cette structure joue un rôle important dans l'induction du mésoderme et de l'endoderme au cours de l'embryogenèse et est considérée comme l'équivalent de l'endoderme viscéral chez la souris, ou de l'hypoblaste chez le poulet. Enfin, un troisième événement majeur marque la période blastuléenne, c'est le début des mouvements d'épibolie (Fig.3). Jusqu'au stade *high* (3 ½ h), les cellules sont perchées au dessus de la réserve vitelline, puis elles commencent à se compacter contre elle, si bien qu'au stade sphère (4h), l'interface entre le blastodisque et le vitellus devient plane. Cette interface va ensuite se soulever en direction du pôle animal reflétant le mouvement d'intercalation radiaire des cellules. Ce réarrangement cellulaire provoque le déclenchement du mouvement d'épibolie pendant lequel les cellules de l'embryon vont progresser en direction du pôle végétatif afin de recouvrir la totalité de la réserve vitelline. Pendant la durée du mouvement d'épibolie, les stades embryonnaires sont nommés en pourcentage d'épibolie, qui est défini par la surface de réserve vitelline recouverte par les cellules du blastoderme.

III.3. La gastrulation (5 ¼ h – 10h)

La gastrulation est une étape importante à l'origine de la mise en place des feuilletts et des axes embryonnaires (Fig.3). Pendant cette période, l'embryon va être le siège de profonds changements morphogénétiques résultant de trois mouvements cellulaires : l'épibolie, l'involution et la convergence-extension.

La gastrulation commence à 50 % d'épibolie, c'est-à-dire lorsque le blastoderme recouvre la moitié de l'embryon. A ce stade, les cellules situées à la marge du blastoderme sont internalisées par un mouvement d'involution, créant un épaississement local appelé anneau germinatif. A cet endroit, le blastoderme est constitué de deux couches cellulaires. La couche superficielle forme l'épiblaste à l'origine de l'ectoderme. La couche profonde constitue l'hypoblaste et donnera le mésoderme et l'endoderme. Chez le poisson zèbre, on ne peut pas distinguer le feuillet mésodermique du feuillet endodermique pendant la gastrulation, c'est pourquoi on parle de mésendoderme. Dorsalement, l'anneau germinatif s'épaissit et forme l'écusson embryonnaire. Cette structure est l'équivalent de la lèvre blastoporale dorsale du xénope et constitue le premier signe visible de dissymétrie Dorso-Ventral. Tandis que le mouvement d'épibolie progresse les cellules qui involuent migrent en direction du pôle animal. Parallèlement, les cellules ventrales et ventro-latérales convergent dorsalement et les cellules dorsales s'étendent le long de l'axe antéro-postérieur. Ces derniers mouvements constituent les mouvements de convergence-extension. En fin de gastrulation, les principales

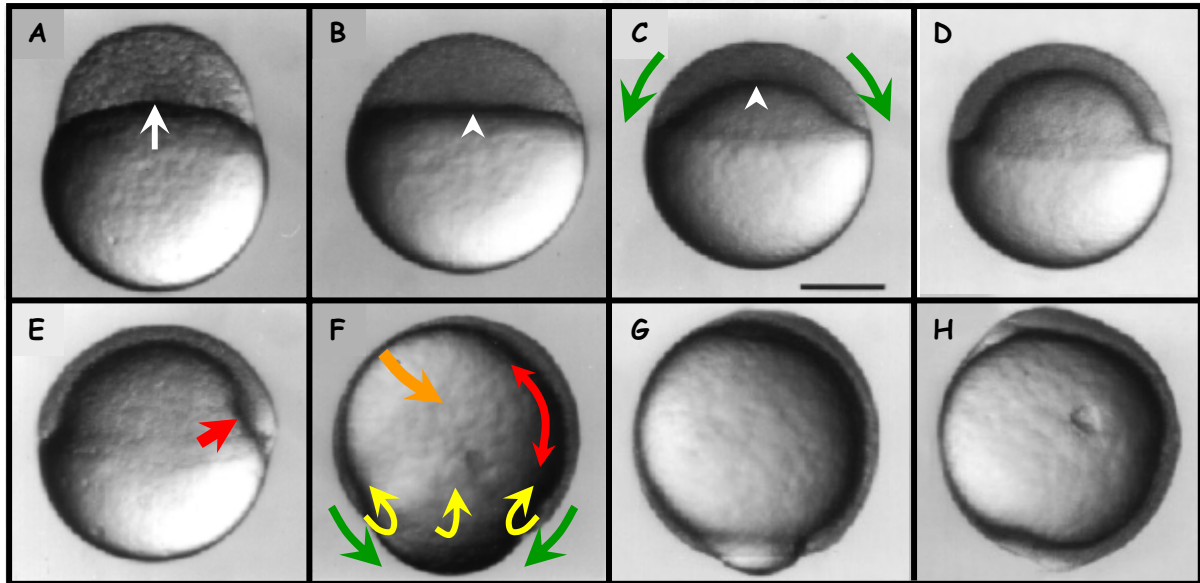


Figure 3: De la blastulation à la gastrulation

Les embryons sont présentés à différents stades au cours de la blastulation : stade *High* (3,30 hpf) (A), stade *sphere* (4 hpf) (B) et stade *30 % d'épibolie* (4,75 hpf) (C)

A partir de la transition midblastuléenne (MBT) (stade *1000 cellules*, 3 hpf), les divisions deviennent asynchrones et les blastomères marginaux fusionnent avec la réserve vitelline pour former la couche vitelline syncytiale (YSL) (flèche en A). Les cellules, initialement perchées au pôle animal (A), se compriment contre le vitellus si bien que l'interface entre ces deux compartiments devient plane (flèche en B). Le soulèvement de cette interface est le résultat de l'intercalation radiaire des cellules (flèche blanche en C) et marque le début du mouvement d'épibolie (flèches vertes).

Les embryons sont présentés à différents stades au cours de la gastrulation : stade *50 % d'épibolie* (5,25 hpf) (D), stade *shield* (6 hpf) (E), stade *75 % d'épibolie* (8 hpf) (F), stade *90 % d'épibolie* (9 hpf) (G) et stade *tailbud* (10 hpf) (H).

Pendant la gastrulation, les feuilletts embryonnaires sont mis en place grâce à des mouvements cellulaires coordonnés: l'involution (jaune), l'épibolie (vert) et la convergence-extension (orange-rouge). Au début de la gastrulation les cellules marginales involuent et forment un épaissement dorsalement, l'écusson embryonnaire (flèche rouge en E). Tandis que les cellules marginales continuent leurs mouvements d'épibolie et d'involution, les cellules ventrales et ventro-latérales convergent dorsalement et les cellules dorsales s'étendent le long de l'axe Animal-Végétatif. En fin de gastrulation, le vitellus est complètement recouvert et les principales régions de l'embryon (tête, tronc, queue) sont en place(H).

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (E-F).

Figure adaptée de *Kimmel et al. 1995*

régions de l'embryon (axe, tête, queue) ont été mises en place et sont reconnaissables morphologiquement.

III.4. La somitogenèse (10 h – 24 h)

La somitogenèse est une période pendant laquelle les territoires définis au cours de la gastrulation vont grandir et se différencier (Fig.4). Tout d'abord, le tube neural se forme au cours de la neurulation le long de l'axe AP. Les cellules du neurectoderme s'épaississent en une plaque neurale et se condensent le long de la ligne médiane créant une structure dense appelée quille neurale. Le tube neural se forme non par plissement, comme chez les autres vertébrés, mais par cavitation de cette quille neurale. A l'extrémité antérieure du tube neural se forme l'encéphale. Les vésicules otiques, optiques et olfactives apparaissent et commencent à se différencier pour former les oreilles, les yeux et le nez. Sur la face dorsale, les structures de la ligne médiane s'individualisent à partir du mésoderme axial pour former la notochorde, la plaque du plancher et l'hypochorde. Dans le même temps, le mésoderme paraxial se segmente progressivement en somites, de la partie antérieure vers la partie postérieure de l'embryon. Postérieurement, le bourgeon caudal, issu de la fusion des cellules marginales à la fin de la gastrulation, se développe pour donner les structures postérieures de l'embryon (la queue) à partir du stade 14 somites.

III.5. Après 24 hpf...

Au bout de 24 h de développement, l'embryon de poisson zèbre possède les principales caractéristiques du plan d'organisation des vertébrés (Fig.4). D'un point de vue physiologique, son système vasculaire et son système nerveux sont déjà fonctionnels. En effet, l'embryon possède un cœur qui bat et répond à une stimulation mécanique par un réflexe d'échappement. De plus, bon nombre de structures sont déjà reconnaissables. On distingue facilement le mésoderme axial (notochorde) et paraxial (somites) ainsi que le mésoderme ventral (sang). Au niveau de l'ectoderme différents repères sont présents tels que l'œil, le nez, le télencéphale, l'épiphyse, la frontière entre le cerveau moyen et postérieur (la MHB :Midbrain-Hindbrain Boundary) et l'oreille. C'est en raison de ces caractéristiques morphologiques que j'ai utilisé le stade 24 hpf pour l'analyse phénotypique des expériences réalisées à des stades plus précoces.

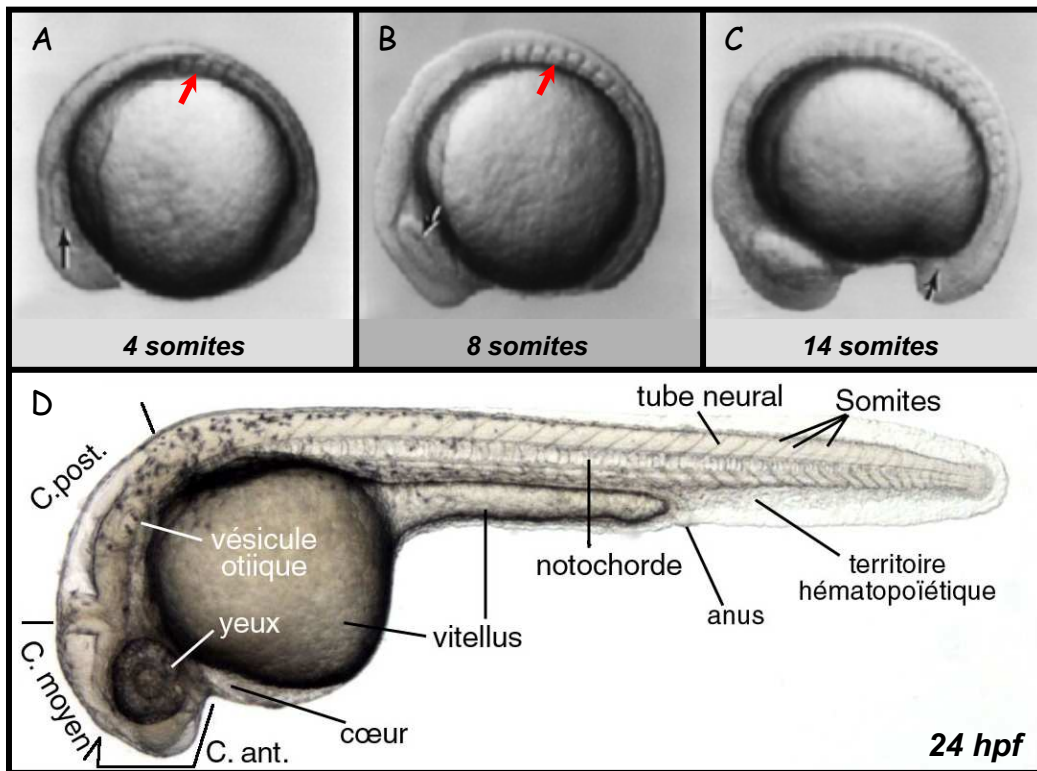


Figure 4: De la somitogenèse à 30 hpf.

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, côté antérieur à gauche et face dorsale en haut. Pour chaque embryon, le stade est indiqué en bas de l'image.

La somitogenèse se caractérise par la segmentation du mésoderme paraxial en somites (flèches rouges en A et B). Le primordium optique se développe (flèches noires en A et B). Le bourgeon caudale se détache de la réserve vitelline (flèche noire en C) avant de commencer à s'allonger pour former la queue. A 24 hpf, toutes les structures embryonnaires sont présentes et facilement reconnaissables grâce à la transparence des tissus (D).

C.ant.: Cerveau antérieur (Prosencéphale); C. moy.: Cerveau moyen (Mésencéphale); C.post.: Cerveau postérieur (Rhombencéphale).

Figure adaptée de *Kimmel et al. 1995*

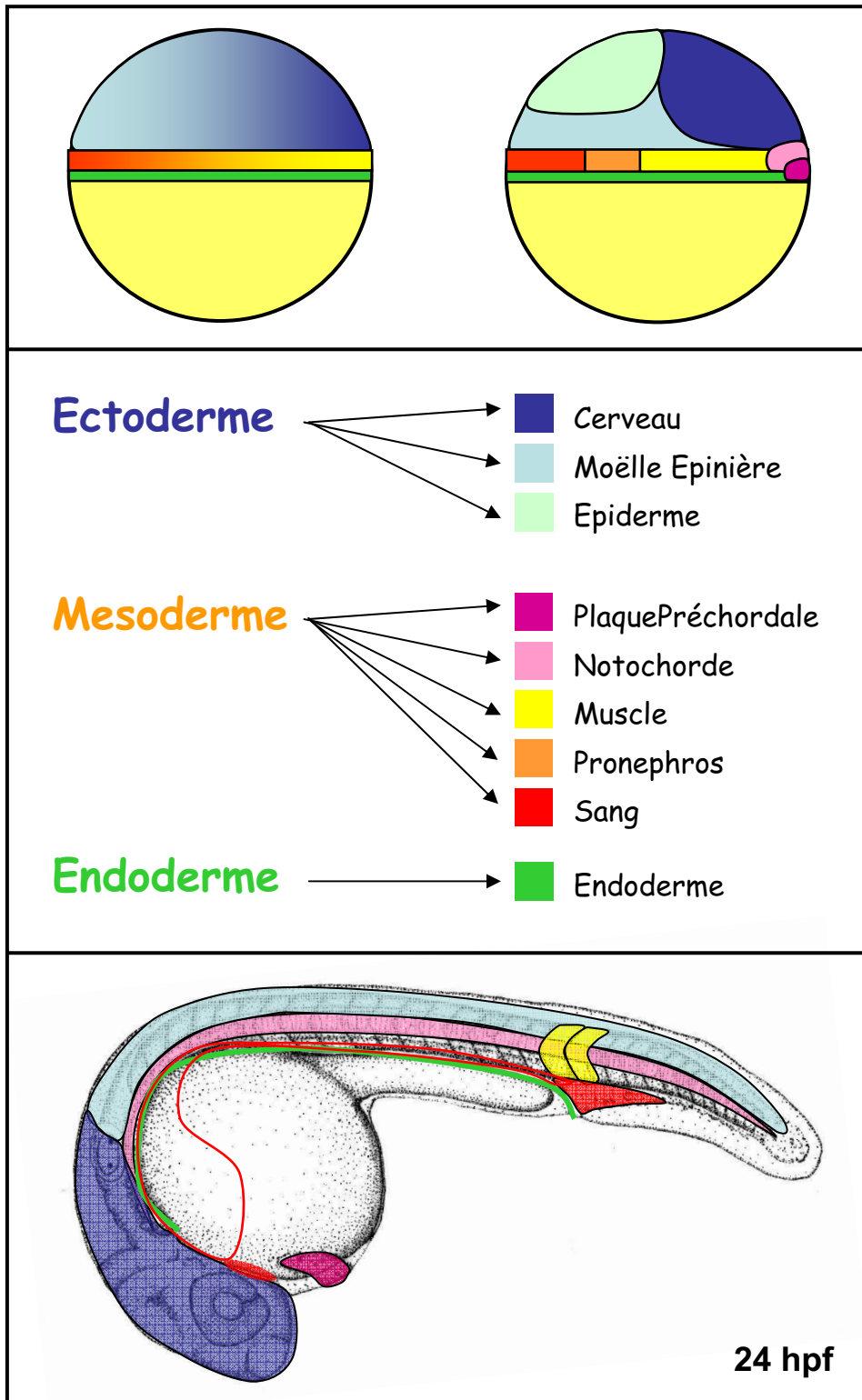


Figure 5 : La carte des territoires présomptifs.

A 50% epibolie les différents feuillet embryonnaires sont déterminés et régionalisés. Le long de l'axe animal-marginal, on peut observer l'endoderme (vert) situé le plus à la marge, le mésoderme (en dégradé de rouge-orange-jaune) puis l'ectoderme (en dégradé de bleus). Les cellules au sein du mésoderme et de l'ectoderme sont régionalisées le long de l'axe D/V.

Figure adaptée de *Kimmel et al. 1990*

IV. La carte des territoires présomptifs

La carte des territoires présomptifs est un outil indispensable pour comprendre les mécanismes précoces du développement embryonnaire. Chez le poisson zèbre, elle a été établie au début de la gastrulation, c'est-à-dire à 50 % d'épibolie (Kimmel et al., 1990). Avant ce stade, aucune restriction du lignage cellulaire n'a pu être observée. Pour réaliser cette carte, les cellules du blastoderme d'une jeune gastrula ont été injectées individuellement à l'aide d'un marqueur fluorescent et leur devenir a été analysé à 24 heures. La carte qui a ainsi pu être dessinée est présentée Figure 5.

Au début de la gastrulation, les trois feuilletts embryonnaires sont superposés les uns au-dessus des autres le long de l'axe animal-marginal. L'endoderme est situé le plus à la marge, suivi du mésoderme et de l'ectoderme. De plus, ces deux derniers feuilletts sont régionalisés le long de l'axe DV. Au niveau de l'ectoderme, la face dorsale est occupée par les territoires neuraux (le cerveau et une partie de la moëlle épinière) tandis que le territoire épidermique est situé sur la face ventrale. Au niveau du mésoderme, la plaque préchordale et la notochorde sont situées dorsalement ; les somites et le pronephros, latéralement ; et le sang occupe la région la plus ventrale.

V. Propriétés de l'écusson embryonnaire : le centre organisateur de Spemann

Au cours du développement embryonnaire, les cellules qui se divisent, s'organisent les unes par rapport aux autres afin d'acquérir la bonne identité au bon endroit. Cette notion d'organisation est fondamentale en biologie du développement puisque c'est elle qui gouverne l'architecture de l'organisme et sa polarité globale. Ainsi, la découverte d'un centre organisateur, c'est-à-dire d'un groupe de cellules capable de contrôler l'identité des tissus voisins et leur arrangement coordonné dans l'espace, au sein de l'embryon a révolutionné l'étude de la biologie du développement. A l'heure actuelle, les travaux réalisés dans notre équipe ont permis d'élargir cette notion de centre organisateur et montrent qu'au-delà d'un groupe de cellules c'est toute la partie de l'embryon qui correspond à la marge embryonnaire qui contrôle l'organisation des feuilletts embryonnaires. Ainsi, on ne parle plus de centre organisateur mais de champ organisateur.

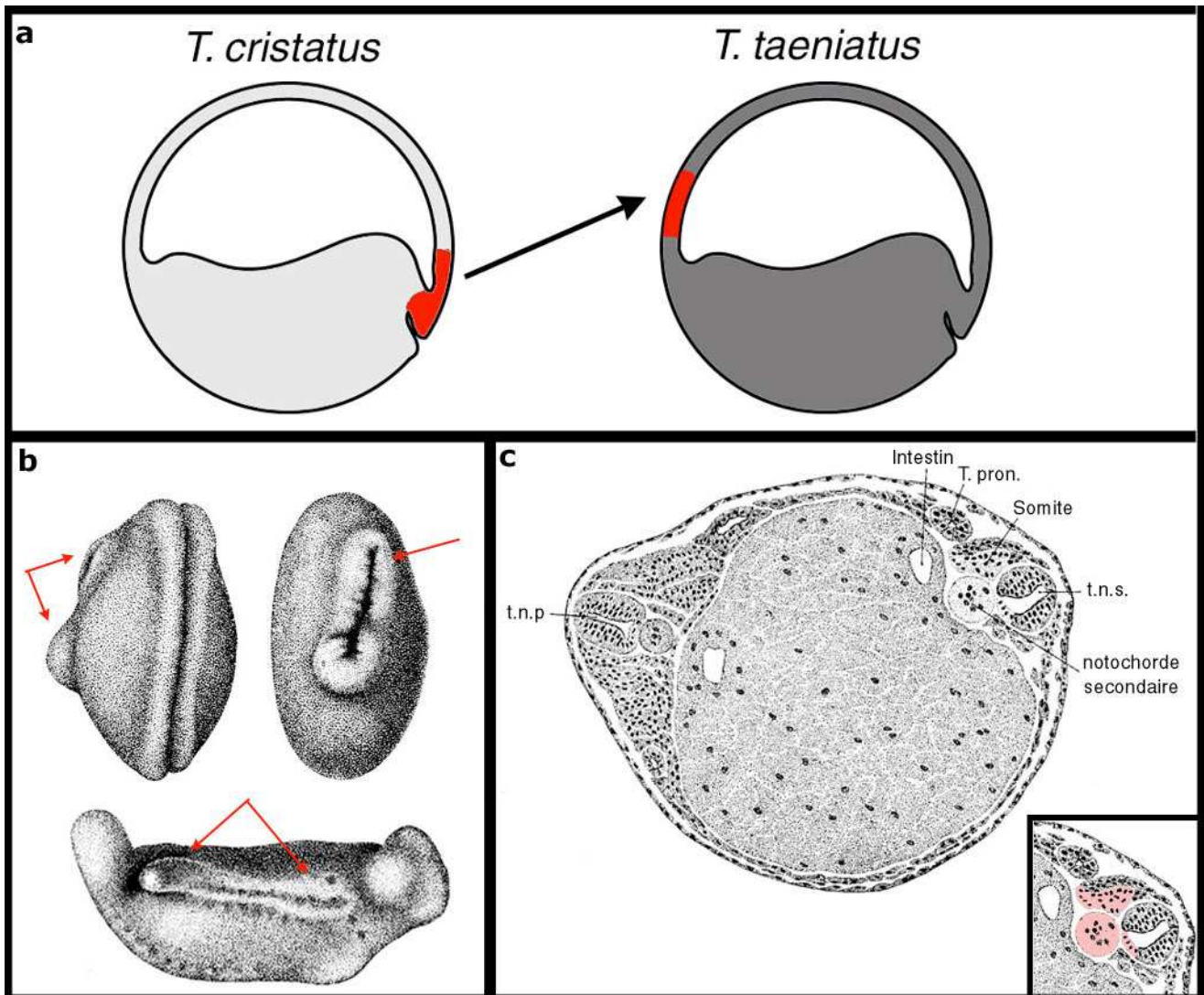


Figure 6: Découverte du centre organisateur de Spemann

Expérience de H. Spemann et H. Mangold: la lèvre dorsale du blastopore d'un embryon de *T. cristatus*, qui possède des cellules claires, est greffée sur la face ventrale d'un embryon receveur *T. taeniatus*, constitué de cellules foncées (a).

Au stade neurula, 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).

t.n.p. et t.n.s.= tube neural primaire et secondaire; T.pron.= tube pronephrique.

Figure adaptée de *Spemann et al. 1924*

V.1. La découverte du centre organisateur de Spemann

La découverte initiale d'un centre organisateur provient de travaux réalisés par Hilde Mangold et Hans Spemann dans la première moitié du 20^{ème} siècle (Spemann et Mangold, 1924). Chez les amphibiens, le premier signe visible de la polarité dorso-ventrale est la formation d'une encoche sur la face dorsale de l'embryon, la lèvre blastoporale. L'apparition de cette structure marque le début de la gastrulation et constitue le point de départ de la formation de l'axe dorsal. La célèbre expérience d'Hilde Mangold et Hans Spemann à l'origine du concept d'organisateur, consistait à greffer la lèvre blastoporale dorsale d'un amphibien sur la face ventrale d'un embryon receveur (Fig. 6). Afin de distinguer les cellules greffées des cellules de l'hôte, deux espèces de Triton dont les cellules diffèrent par leur pigmentation, furent utilisées. Le résultat de cette transplantation fut l'obtention d'un axe secondaire partiel situé sur la face ventrale de hôte. L'examen histologique détaillé de cet axe ectopique montra que les structures axiales (essentiellement la notochorde et le tube neural ventral) dérivées du greffon tandis que le reste des tissus était constitué des cellules de l'hôte. De cette observation Hilde Mangold et Hans Spemann conclurent que la lèvre du blastopore dorsal non seulement se différenciait en structures axiales mais qu'elle était capable de recruter des cellules de l'hôte pour organiser la formation d'un deuxième axe embryonnaire. En raison de cette capacité « organisatrice », la lèvre blastoporale dorsale fut renommée centre organisateur. Des structures analogues ont été mises en évidence chez les vertébrés : il s'agit du nœud chez la souris et le poulet, et de l'écusson embryonnaire chez le poisson zèbre.

V.2. L'activité du centre organisateur de Spemann

Les expériences de Hilde Mangold et Hans Spemann ont mis en évidence deux fonctions essentielles de la lèvre blastoporale dorsale au cours de la gastrulation. Premièrement, cette structure possède une activité dorsalisante vis-à-vis du mésoderme et de l'ectoderme. En effet, le centre organisateur de Spemann est capable d'induire la formation de mésoderme dorsal (notochorde et somites) dans un environnement destiné à donner du mésoderme ventral (sang). De plus, les cellules de l'ectoderme ventral destinées à donner de l'épiderme sont converties en tissu nerveux dans les axes secondaires induits par la greffe de la lèvre blastoporale dorsale. Deuxièmement, les cellules du centre organisateur de Spemann se différencient elles-mêmes pour donner les structures axiales : la plaque préchordale, la notochorde, la plaque du plancher et l'hypochorde.

V.3. L'identité moléculaire du centre organisateur de Spemann

Au début des années 90 avec l'émergence de la biologie moléculaire, une quantité considérable de travaux a été réalisée, chez le xénope, afin d'identifier la nature moléculaire du centre organisateur de Spemann (pour revues : De Robertis and Kuroda, 2004; De Robertis et al., 2000; Niehrs, 2004). De nombreux facteurs de transcription et des molécules sécrétées ont ainsi pu être mises en évidence. Parmi les facteurs de transcription, certains sont directement impliqués dans le développement des structures axiales à partir du centre organisateur de Spemann, notamment les facteurs XBrachyury et XNot. De plus, cette propriété de l'organisateur dépend aussi de la présence de molécules sécrétées qui appartiennent à la famille Nodal. D'autres molécules sécrétées par le centre organisateur de Spemann sont, quant à elles, en partie responsables dans l'activité dorsalisante de la lèvre blastoporale dorsale. Ces molécules sont pour la plupart des antagonistes. Chez les vertébrés, la mise en place de l'axe DV dépend d'un gradient d'activité de molécules signalisatrices de la famille des BMP (Bone Morphogenetic Protein). Ce gradient résulte, en partie, de l'interaction entre les BMP, sécrétés ventralement, et leurs antagonistes sécrétés dorsalement par le centre organisateur de Spemann.

Je reviendrai plus largement sur ces notions et ces facteurs moléculaires dans la suite de ce manuscrit.

V.4. La structure analogue au centre organisateur de Spemann chez le poisson zèbre : l'écusson embryonnaire

Chez le poisson zèbre, l'écusson embryonnaire, situé dorsalement, représente la structure fonctionnelle analogue à celle du centre organisateur de Spemann. Son activité a été mise en évidence pour la première fois par Oppenheimer dans les années 1930, grâce à des expériences de transplantations. La greffe d'un écusson embryonnaire sur la face ventrale d'un embryon receveur produit un axe secondaire correctement régionalisé selon l'axe DV et qui possède des structures axiales originaires du greffon (Fig. 7 : A et B). L'écusson embryonnaire du poisson zèbre, possède donc une activité similaire à celle du centre organisateur de Spemann : il participe à la régionalisation DV du mésoderme et de l'ectoderme et est à l'origine des structures de la ligne médiane. De plus, son analyse moléculaire montre que, de la même façon que chez le xénope, cette structure est une source importante d'antagonistes sécrétés et de facteurs de transcription. Ces éléments indiquent que non seulement l'activité mais aussi l'identité du centre organisateur de Spemann sont conservées chez le poisson zèbre.

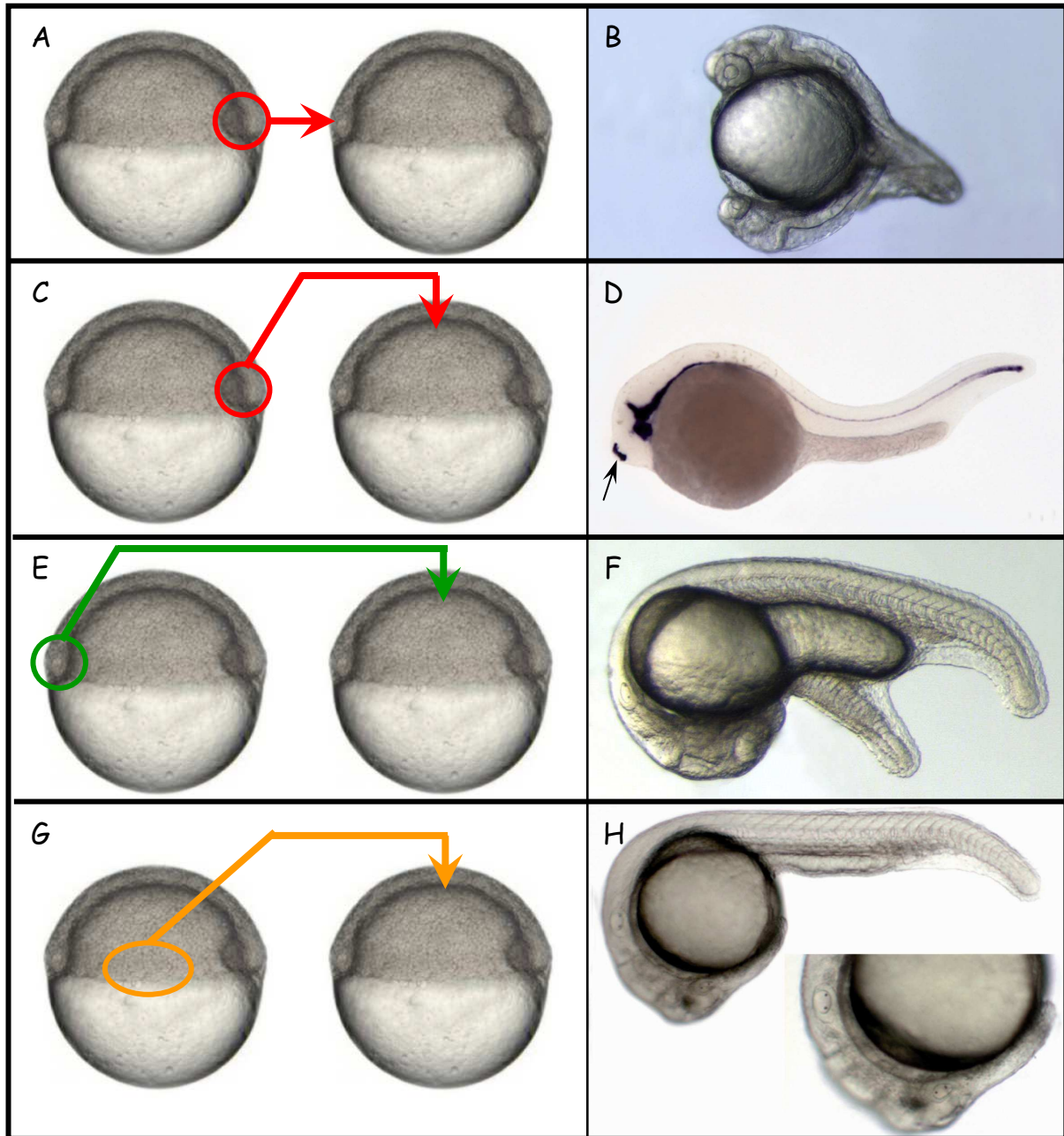


Figure 7: Toute la marge embryonnaire possède une activité organisatrice.

Comme chez le xénope, chez le poisson zèbre, la greffe de la marge dorsale d'une jeune gastrula sur la face ventrale d'un embryon receveur de même stade (A) conduit à la formation d'un axe secondaire (B). Si cette greffe est réalisée au pôle animal (la région la plus éloignée de la marge embryonnaire) (C), seules les structures axiales qui dérivent du greffon se développent (flèche en D, hybridation in situ avec le marqueur des structures axiales, *shh*). Les greffes de la marge ventrale (E) ou de la marge latérale (G) au pôle animal induisent respectivement la formation d'une queue ectopique (F) ou d'un tronc ectopique (H) composés des cellules provenant du greffon et de l'hôte.

Les embryons sont présentés en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (A, C, E et G), ou extrémité antérieure à gauche et face dorsale en haut (B, D, F et H)

V.5. La découverte du champ organisateur chez le poisson zèbre.

Depuis l'expérience de Spemann et Mangold réalisée en 1924, il était communément admis par la communauté scientifique que la formation de l'embryon de vertébré était contrôlée par un groupe de cellules situé dorsalement : le centre organisateur de Spemann. Chez le poisson zèbre, les travaux réalisés dans notre équipe ont montré que la marge dorsale de l'embryon n'est pas la seule région à posséder une activité organisatrice. En effet, en 2003 un centre organisateur responsable du développement de la queue a été identifié (Agathon et al., 2003). Il s'agit de la marge ventrale de l'embryon. Lorsque cette structure est greffée dans une région située loin du territoire marginal de l'embryon (au pôle animal), elle est capable d'organiser le développement d'une queue ectopique constituée à la fois des cellules du greffon et de cellules de l'embryon receveur (Fig. 7 : E et F). Lorsque la même expérience est réalisée avec un implant de marge dorsale, les seuls tissus qui se développent sont les structures axiales (la plaque préchordale, la notochorde, la plaque du plancher et l'hypochorde) qui proviennent de la différenciation des cellules du greffon (Fig. 7 : C et D). La marge embryonnaire est une source importante de signaux moléculaires, contrairement au pôle animal qui en est dépourvu. C'est pourquoi la greffe d'un écusson embryonnaire ne produit pas les mêmes structures selon qu'elle est réalisée à la marge ventrale (développement d'un axe secondaire), ou au pôle animal (développement de structures axiales). Compte tenu de ces éléments, les expériences de greffe réalisées au pôle animal permettent d'obtenir des résultats plus représentatifs de l'activité organisatrice endogène des structures greffées. Par conséquent, contrairement aux interprétations faites par Spemann et Mangold, la marge dorsale, par elle-même, possède une activité organisatrice très limitée. En résumé, au niveau de la marge de l'embryon, la partie ventrale organise les structures caudales de l'embryon (la queue) tandis que sa partie dorsale organise les structures axiales. Ces observations ont conduit notre équipe à se demander si les régions marginales situées entre ces deux centres possédaient, elles aussi, des activités organisatrices. Les greffes de marge latérale ou dorso-latérale au pôle animal induisent respectivement le développement de tronc ectopique ou de cerveau postérieure ectopique (J.D. Fauny, C. Thisse et B.Thisse, communications personnelles) (Fig.7 : G et H). En conclusion, l'ensemble de ces expériences a permis d'élaborer un modèle dans lequel la formation de l'embryon dépend, non pas d'un ou de plusieurs centres organisateurs situés le long de l'axe DV, mais de la totalité de la marge embryonnaire qui agit en générant un champ organisateur (Fig.8). De plus, au niveau moléculaire, notre équipe a pu démontrer que ce champ organisateur résulte d'un gradient DV de l'activité de molécules signalisatrices. La

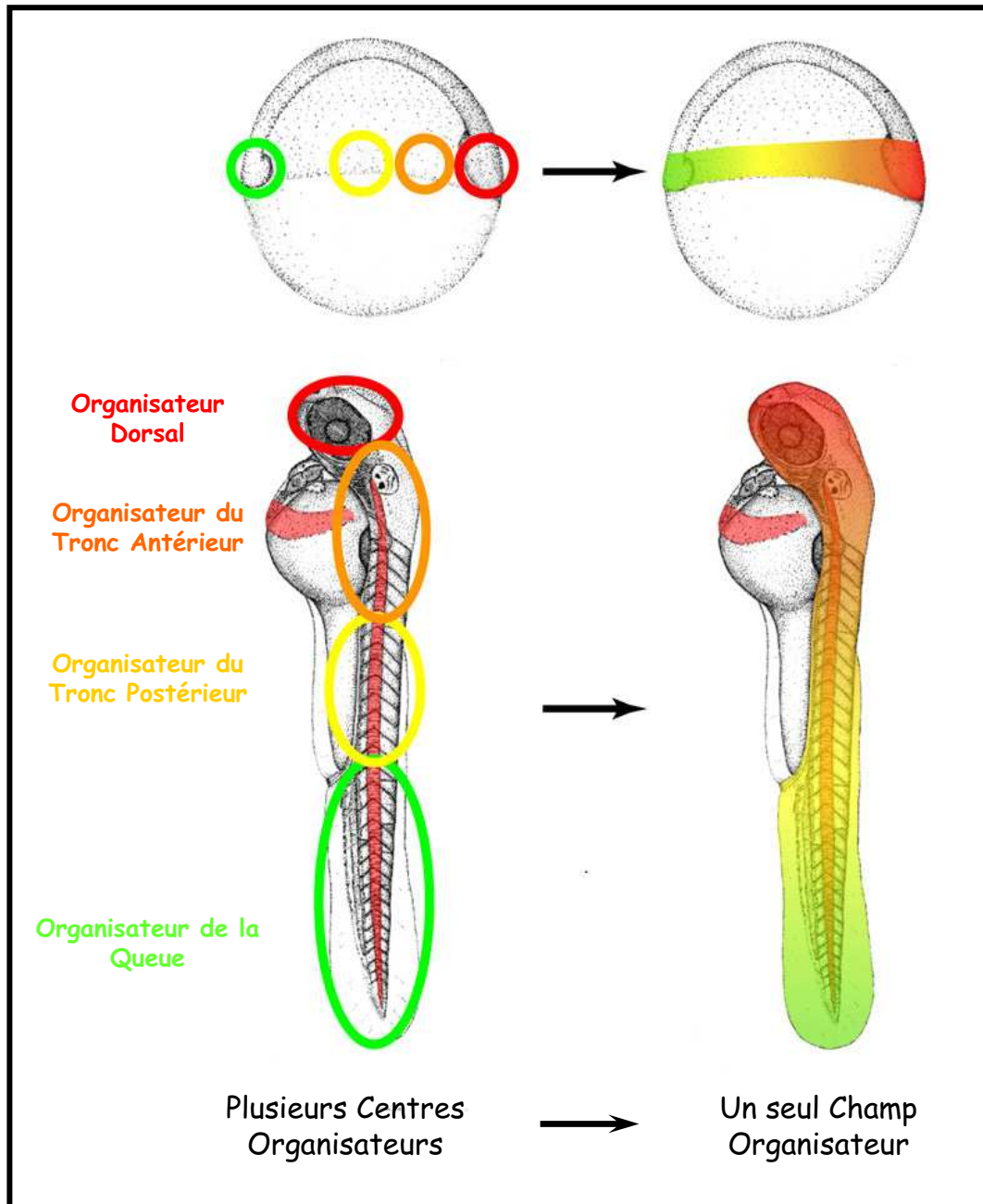


Figure 8: La marge embryonnaire agit comme un champ organisateur.

Modèle résumant l'activité organisatrice de la marge de la gastrula. Les greffes de différentes régions DV de la marge (cercles de couleurs) organisent différentes structures embryonnaires le long de l'axe AP. Ces résultats suggèrent l'existence, non pas d'un ou de plusieurs centres organisateurs situés le long de l'axe DV, mais d'un seul et unique champ organisateur situé le long de la marge embryonnaire.

sécrétion, au niveau de l'écusson embryonnaire, de protéines capables d'inhiber ces signaux est en partie responsable de l'établissement de ce gradient d'activité DV.

VI. But de mon travail

Chez le poisson zèbre, le contrôle de l'identité des tissus et leur arrangement coordonné dans l'espace ne dépend pas d'un centre organisateur (l'écusson embryonnaire) mais d'un champ organisateur (la marge embryonnaire). Néanmoins, bien que l'écusson embryonnaire ne soit pas responsable à lui seul de l'activité organisatrice, il intervient dans plusieurs processus fondamentaux du développement embryonnaire, notamment la mise en place de l'axe DV et le développement des structures axiales.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressée à ces deux aspects de la marge dorsale.

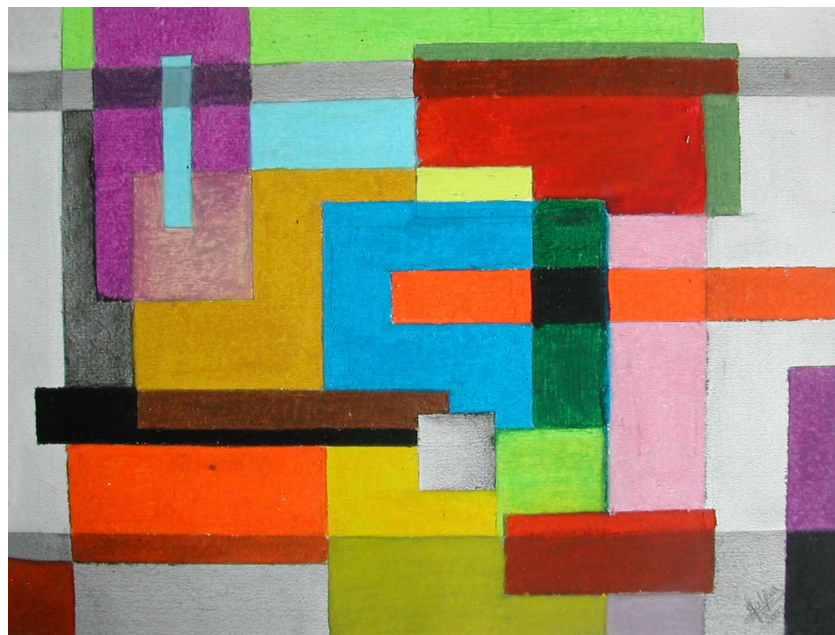
La régionalisation DV de l'embryon est contrôlée par un gradient d'activité de BMP qui résulte en partie de l'interaction de ces molécules avec leurs antagonistes, sécrétés dorsalement à partir de l'écusson embryonnaire. Chez le poisson zèbre, trois gènes codant pour des antagonistes des BMP sont exprimés à la marge dorsale pendant les stades blastula et gastrula. Il s'agit des gènes *chordin*, *noggin1* et *follistatin like-2*. Parmi eux, seule la participation du facteur Chordin à l'établissement du gradient d'activité BMP a pu être démontrée.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai étudié le rôle des deux autres antagonistes, Noggin1 et Follistatin like-2, au cours du développement de l'axe DV de l'embryon de poisson zèbre. J'ai ainsi démontré que ces facteurs possèdent des activités redondantes à celle de Chordin dans l'établissement du gradient d'activité BMP au cours de la gastrulation. Néanmoins, les résultats obtenus indiquent que ces trois antagonistes ne peuvent être responsables, à eux seuls, de l'exclusion des BMP de la face dorsale de l'embryon et qu'il existe d'autres molécules susceptibles de jouer un rôle dans ce processus. C'est dans cet objectif que je présente des résultats préliminaires concernant deux candidats potentiels : les antagonistes des BMP, Gremlin et Tsukushi.

Dans la deuxième partie de ma thèse, j'ai étudié le développement des structures de l'axe qui dérivent de la marge dorsale de l'embryon. De nombreux facteurs de transcription sont exprimés dans l'écusson embryonnaire au début de la gastrulation et sont maintenus, plus tard, dans les structures axiales en développement. Parmi eux, on distingue les gènes appartenant à la famille *foxA*. La conservation à la fois des séquences protéiques et des

territoires d'expression des membres de cette famille chez les vertébrés suggère qu'ils jouent un rôle important dans le développement des structures axiales. C'est pour cette raison que je me suis concentrée sur l'étude de la fonction de cette famille protéique pendant la formation des structures de l'axe. J'ai ainsi montré que la famille FoxA est indispensable au maintien de l'identité des cellules du mésoderme axial et que cette activité est partiellement redondante à celle d'un autre facteur de transcription homologue de XNot chez le xénope, le facteur Floating head.

Partie I : Etude des mécanismes
contrôlant la mise en place de l'axe
Dorso-Ventral



Ligand	R _I	R _{II}	Inhibiteur Membranaire	R-Smad	Co-Smad	I-Smad	Antagoniste
Activin	ALK 4	ActRIIB	BAMBI	Smad 2 Smad 3	Smad 4	Smad 7	Lefty Follistatin
Nodal	ALK 4 ALK 7	ActRIIB	BAMBI	Smad 2 Smad 3	Smad 4	Smad 7	Lefty Cerberus
BMP 2	ALK 3 ALK 6	BMPRII ActRIIA	BAMBI	Smad 1 Smad 5 Smad 8	Smad 4	Smad 6 Smad 7	Chordin Noggin Follistatin Cerberus
BMP 4	ALK 3 ALK 6	BMPRII ActRIIA	BAMBI	Smad 1 Smad 5 Smad 8	Smad 4	Smad 6 Smad 7	Chordin Noggin Follistatin Cerberus
BMP 7	ALK 2 ALK 3 ALK 6	BMPRII ActRIIA	BAMBI	Smad 1 Smad 5 Smad 8	Smad 4	Smad 6 Smad 7	Chordin Noggin Follistatin Cerberus

I-Table 1: Les protagonistes de la voie Activine, Nodal et BMP.

Abréviations: R_I et R_{II} : Récepteurs de type I et de type II, BMP: Bone Morphogenetic Protein, ALK : Activin receptor Like Kinase, ActR :Activin Receptor, BAMBI: BMP and Activin receptor Membran Bound Inhibiteur

Partie I : Introduction

Depuis la découverte du centre organisateur de Spemann jusqu'à aujourd'hui, la mise en place de l'axe Dorso-Ventral (DV) a été extensivement étudiée à la fois chez les invertébrés et les vertébrés. Ainsi, la régionalisation DV de l'embryon résulterait de l'activité d'un gradient de Bone Morphogenetic Protein (BMP) le long de cet axe embryonnaire.

I. La voie de signalisation des Bone Morphogenetic Protein (BMP) :

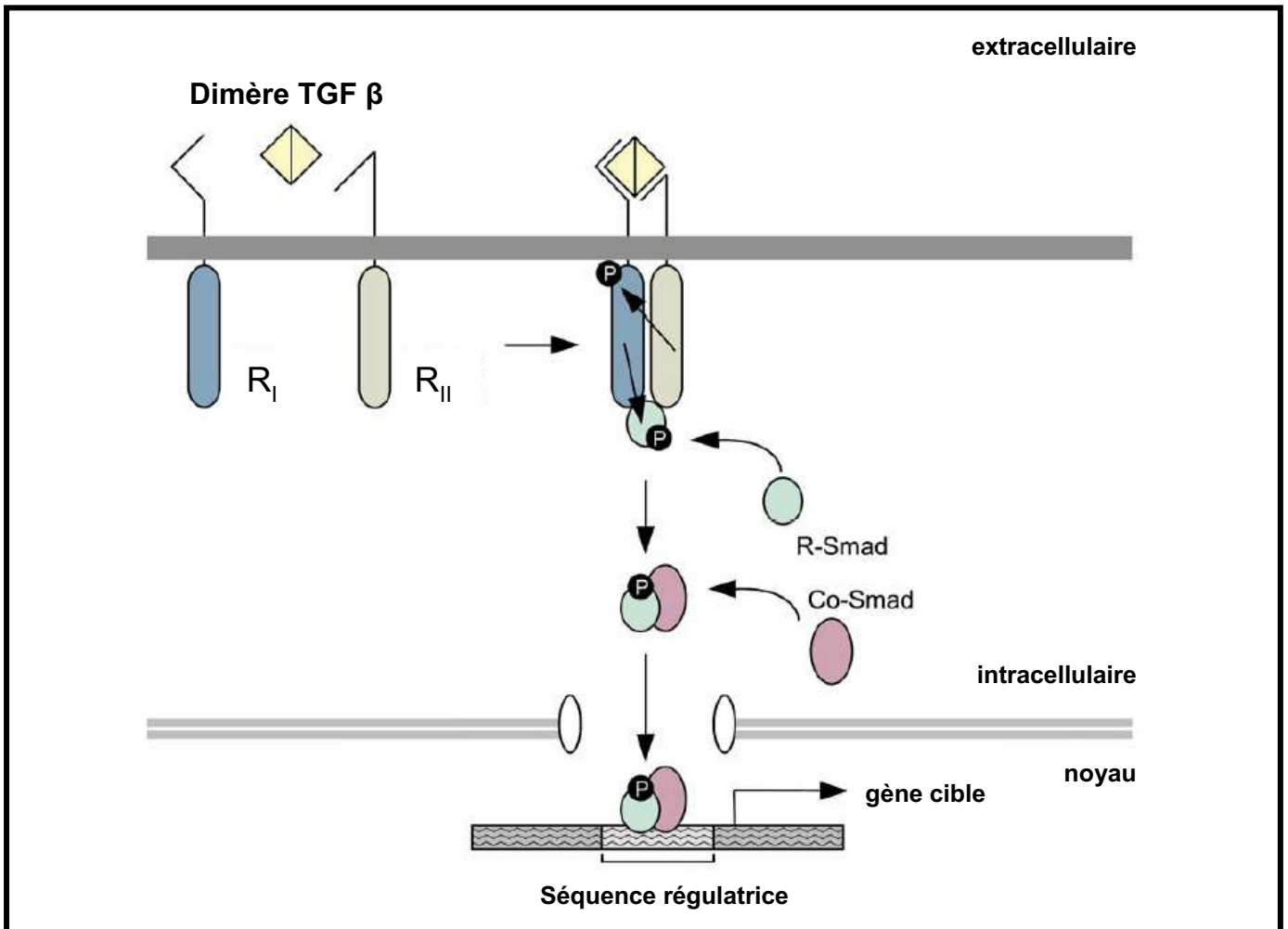
Les BMP sont des protéines solubles appartenant à la super-famille des Transforming Growth Factor β (TGF β) (pour revues : Feng and Derynck, 2005; Shi and Massague, 2003).

1.1. Activation de la voie de signalisation des TGF β :

La superfamille des TGF β est constituée de deux sous famille de protéines définies par des similarités de séquences entre les différents ligands, et liées à la spécificité des voies de signalisation qu'elles empruntent (table1). La première englobe les ligands TGF β , Activine et Nodal. La seconde est composée des ligands BMP, Growth and Differentiation Factor (GDF) et Mullerian Inhibiting Substance (MIS). Tous les ligands de la superfamille des TGF β possèdent 6 résidus cystéines conservés qui s'associent pour former un noyau appelé *cysteine knot*. Ces ligands s'associent sous la forme de dimères par l'intermédiaire d'une liaison dissulfure.

Les récepteurs des TGF β sont des protéines transmembranaires possédant une activité Sérine/Thréonine Kinase dans leur domaine intracellulaire. On distingue 12 récepteurs aux TGF β chez l'humain répartis en deux catégories: 7 récepteurs de type I (R_I) et 5 récepteurs de type II (R_{II}). L'activation de la voie des TGF β nécessite l'association d'un R_I avec un R_{II} . Pour chacun des ligands TGF β , il existe une ou plusieurs combinaison(s) spécifiques R_I/ R_{II} récapitulées dans la Table 1.

Les dimères de ligand TGF β s'associent de façon séquentielle aux récepteurs R_I et R_{II} et conduit à leur rassemblement à la surface cellulaire. La liaison du ligand modifie la conformation du récepteur R_{II} qui devient actif et phosphoryle le récepteur R_I au niveau d'un site riche en sérine et en glycine, le domaine GS. Cette phosphorylation active le récepteur R_I



I-Figure 1 : La voie de signalisation des TGF β

Le dimère de TGFβ interagit avec les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase de type I et II (RI et RII) provoquant leur rapprochement. Le récepteur RII activé peut ainsi phosphoryler le récepteur RI qui devient actif à son tour. Le récepteur RI s'associe et phosphoryle les R-Smad qui forment un complexe avec le Co-Smad. Les complexes R-Smad/Co-Smad sont transloqués dans le noyau et interagissent avec des co-facteurs transcriptionnels afin d'activer ou de réprimer l'expression de gènes cibles.

(Figure adaptée de Baleman *et al.* , 2002)

qui pourra s'associer et phosphoryler les transducteurs intracellulaires de la voie des TGF β , les Smad (Fig. 1).

1.2. Transduction du signal TGF β :

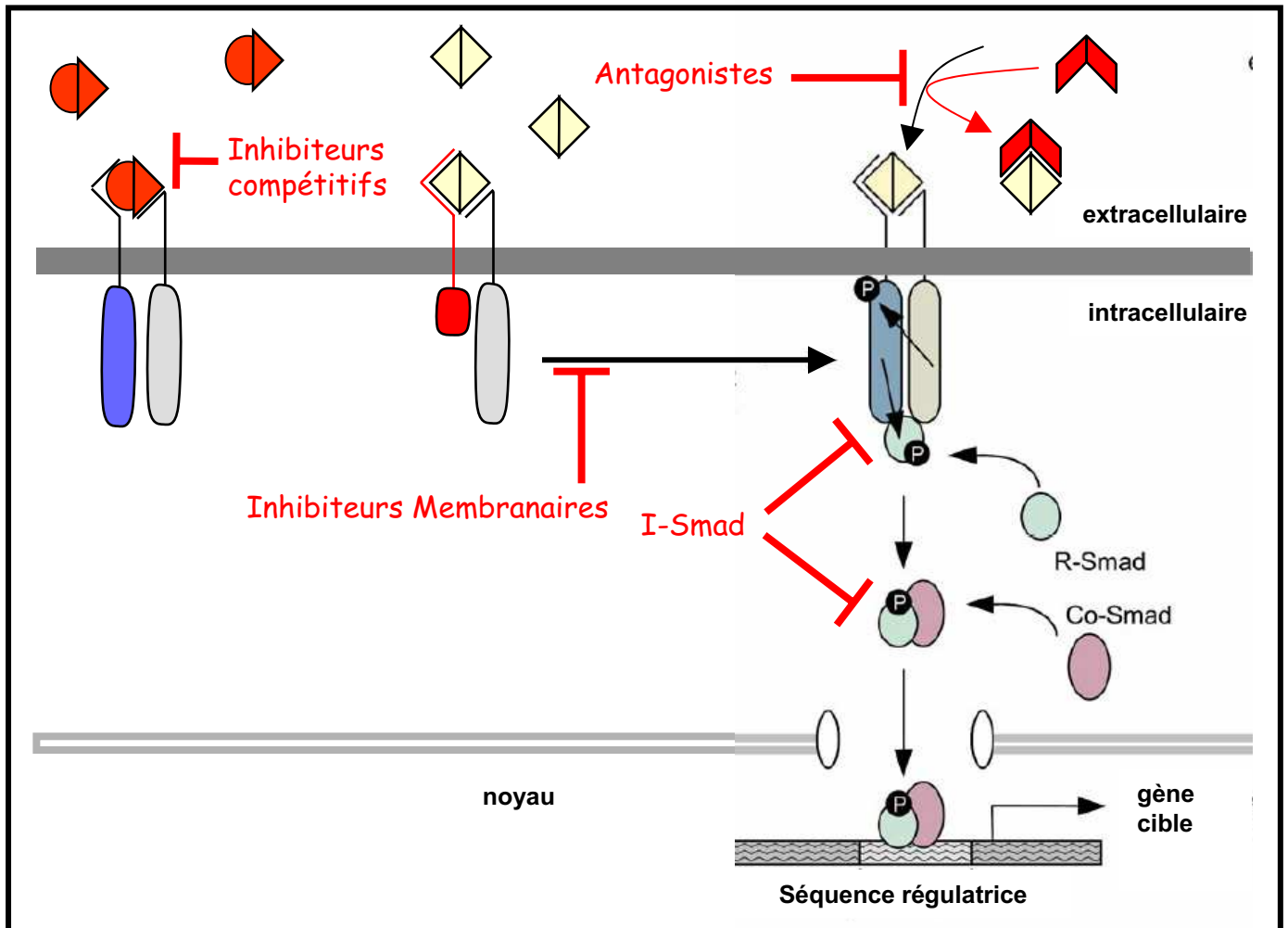
La famille des protéines Smad a été découverte chez la drosophile comme transducteur indispensable à l'activité de Decapentaplegic (Dpp), l'homologue de BMP. Cette famille de molécule tient son nom de son homologue chez la drosophile, la protéine Mother Associated Dpp (MAD). Chez les vertébrés, il existe 8 protéines Smad distinctes appartenant à trois classes fonctionnelles différentes: les R-Smad (Smad Récepteur), les Co-Smad (Smad Cofacteur) et les I-Smad (Smad Inhibiteur). On distingue 5 R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5 et 8), 1 Co-Smad (Smad 4) et 2 I-Smad (Smad 6 et Smad 7). En fonction des ligands, les R-Smad recrutés ne sont pas les mêmes. La signalisation par les ligands Activine/Nodal utilise les Smad 2 et 3 tandis que celle qui met en jeu les ligands BMP utilise les Smad 1, 5 et 8 (Table 1).

Suite à la liaison du dimère de TGF β , les R-smads recrutés au niveau du récepteur R₁ sont phosphorylés. Les R-Smad ainsi activés, se dissocient du récepteur membranaire et s'oligomérisent avec la molécule Co-Smad. Le complexe R-Smad/Co-Smad est transporté dans le noyau et s'associe à des co-facteurs transcriptionnels afin d'activer ou de réprimer l'expression de gènes cibles (Fig. 1).

Au niveau protéique, les Smads sont composées de deux domaines MH1 et MH2 (pour MAD Homology) séparés par un domaine de liaison (ou domaine *linker*). Le motif MH1 situé du côté N-terminal, contient un site de liaison à l'ADN ainsi qu'un signal de localisation nucléaire (*Nuclear Localisation Signal*, NLS). Le domaine MH2, quant à lui, contient le site de phosphorylation pour le récepteur R₁ (le motif caractéristique SXS) et est responsable de la formation du complexe hétéromérique R-Smad/Co-Smad. Alors que ces régions sont bien conservées parmi les R-Smad, le domaine MH2 de Smad 4 (le Co-Smad) ne possède pas le motif SXS de phosphorylation par le récepteur R₁, et le domaine MH1 de Smad 6 et Smad 7 (les I-Smad) est dépourvu du site de liaison à l'ADN.

1.3. Modulation de l'activité de la voie des TGF β :

La régulation de l'activité de la voie des TGF β se fait à différents niveaux et fait intervenir des protéines extracellulaires, membranaires et cytoplasmiques (pour revues (Feng and Derynck, 2005; Shi and Massague, 2003) (Fig. 2).



I-Figure 2 : La régulation de la voie de signalisation des TGF β

La voie des TGF β peut être régulée à trois niveaux.

Dans le milieu extracellulaire, l'activation de la voie des TGFβ peut être bloquée par des antagonistes (Chordin par exemple) qui se lient aux ligands ou par des inhibiteurs compétitifs (Lefty) qui se lient aux récepteurs de type I et II. Dans les deux cas, l'interaction des ligands avec les récepteurs est bloquée.

La voie des TGFβ peut être bloquée au niveau membranaire par des Récepteurs accessoires tels que la protéine BAMBI qui ne s'associent aux ligands TGFβ mais ne peuvent transduire le signal.

Dans le milieu intracellulaire, la transduction du signal TGFβ peut être bloquée par des inhibiteurs compétitifs des R-Smad appelés I-Smads.

(Figure adaptée de Baleman *et al.* , 2002)

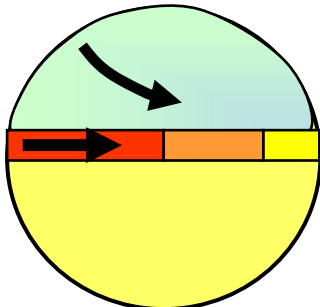
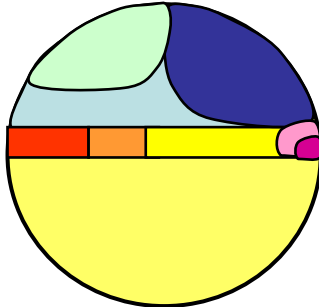
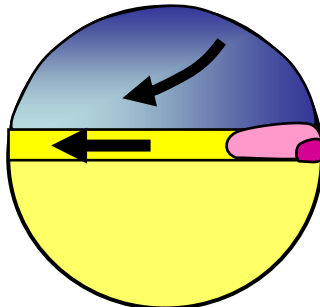

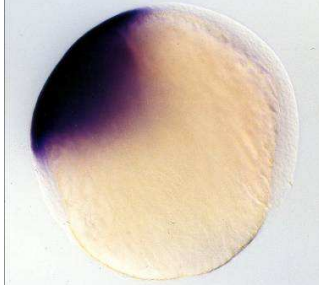


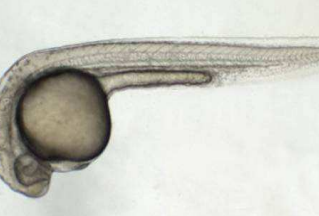

Parmi les régulateurs extracellulaires, on distingue les protéines Chordin, Noggin, Follistatin et Cerberus. Alors que Chordin et Noggin antagonisent spécifiquement les ligands BMP, les activités de Follistatin et Cerberus ne sont pas limitées aux BMP mais peuvent aussi inhiber les ligands Nodal et Activine respectivement. Ces protéines inhibent l'activité des TGF β en séquestrant les ligands, empêchant ainsi leur liaison aux récepteurs membranaires R_I et R_{II} . En effet, la cristallisation du complexe Noggin/BMP7 a montré que la liaison du monomère Noggin masque les sites d'interaction de la protéine BMP7 avec les Récepteurs R_I et R_{II} (Groppe et al., 2002).

Une deuxième classe importante de modulateurs de l'activité des TGF β est constituée de protéines ancrées à la membrane plasmique et qui fonctionnent comme récepteurs accessoires ou comme co-Récepteurs. Ces protéines peuvent réguler positivement ou négativement l'activation de la voie des TGF β . Parmi elles, la protéine transmembranaire BAMBI (BMP and Activine receptor Membrane Bound Inhibitor) est un inhibiteur compétitif du récepteur R_I . Contrairement aux récepteurs R_I et R_{II} , le domaine intracellulaire de BAMBI est très court et ne possède pas d'activité Serine/Thréonine Kinase si bien que la transduction du signal est bloquée.

Enfin, les I-Smad, smad6 et smad7, sont des régulateurs intracellulaires de la voie des TGF β . Ce sont des inhibiteurs compétitifs des R-Smad qui interviennent à des endroits différents de la voie de signalisation. Smad7 est impliqué dans la dégradation du récepteur membranaire R_I . Smad 6, quant à lui, bloque la transduction du signal BMP au niveau du Co-Smad (Smad4). En effet, la liaison de Smad 6 à Smad 4 empêche celle de Smad1. Le dimère Smad 6/Smad 4 formé est inactif.

II. L'activité morphogénétique des BMP dans la mise en place de l'axe Dorso-Ventral :

La mise en évidence de l'activité des BMP dans l'établissement de l'axe DV chez les vertébrés est issue d'une quantité importante de travaux réalisés dans les années 1990 chez le xénope. Bon nombre de ces études repose sur la surexpression graduelle du ligand BMP4. L'expérience initiale consistait à cultiver des explants ectodermiques de xénope (la calotte animale) provenant d'embryons préalablement injectés avec l'ARN *bmp4*. Dans ces conditions, *bmp4* est capable d'induire la formation de mésoderme ayant un caractère ventral (Dale et al., 1992; Jones et al., 1992). Une activité similaire fut mise en évidence pour les

Ventralisation + <i>BMP</i>	Sauvage	Dorsalisation - <i>BMP</i>																		
																				
																				
																				
<table border="0"> <tr> <td data-bbox="296 1240 344 1285">■</td> <td data-bbox="352 1240 480 1285">Cerveau</td> <td data-bbox="644 1240 692 1285">■</td> <td data-bbox="700 1240 987 1285">Plaque Préchordale</td> <td data-bbox="1035 1240 1083 1285">■</td> <td data-bbox="1091 1240 1267 1285">Pronephros</td> </tr> <tr> <td data-bbox="296 1296 344 1341">■</td> <td data-bbox="352 1296 588 1341">Moëlle Epinière</td> <td data-bbox="644 1296 692 1341">■</td> <td data-bbox="700 1296 884 1341">Notochorde</td> <td data-bbox="1035 1296 1083 1341">■</td> <td data-bbox="1091 1296 1171 1341">Sang</td> </tr> <tr> <td data-bbox="296 1352 344 1397">■</td> <td data-bbox="352 1352 501 1397">Epiderme</td> <td data-bbox="644 1352 692 1397">■</td> <td data-bbox="700 1352 804 1397">Muscle</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			■	Cerveau	■	Plaque Préchordale	■	Pronephros	■	Moëlle Epinière	■	Notochorde	■	Sang	■	Epiderme	■	Muscle		
■	Cerveau	■	Plaque Préchordale	■	Pronephros															
■	Moëlle Epinière	■	Notochorde	■	Sang															
■	Epiderme	■	Muscle																	

I-Figure 3 : L'activation ou l'inhibition de l'activité des *BMP* conduit à des phénotypes de ventralisation ou de dorsalisation.

La situation sauvage est présentée sur la colonne du centre.

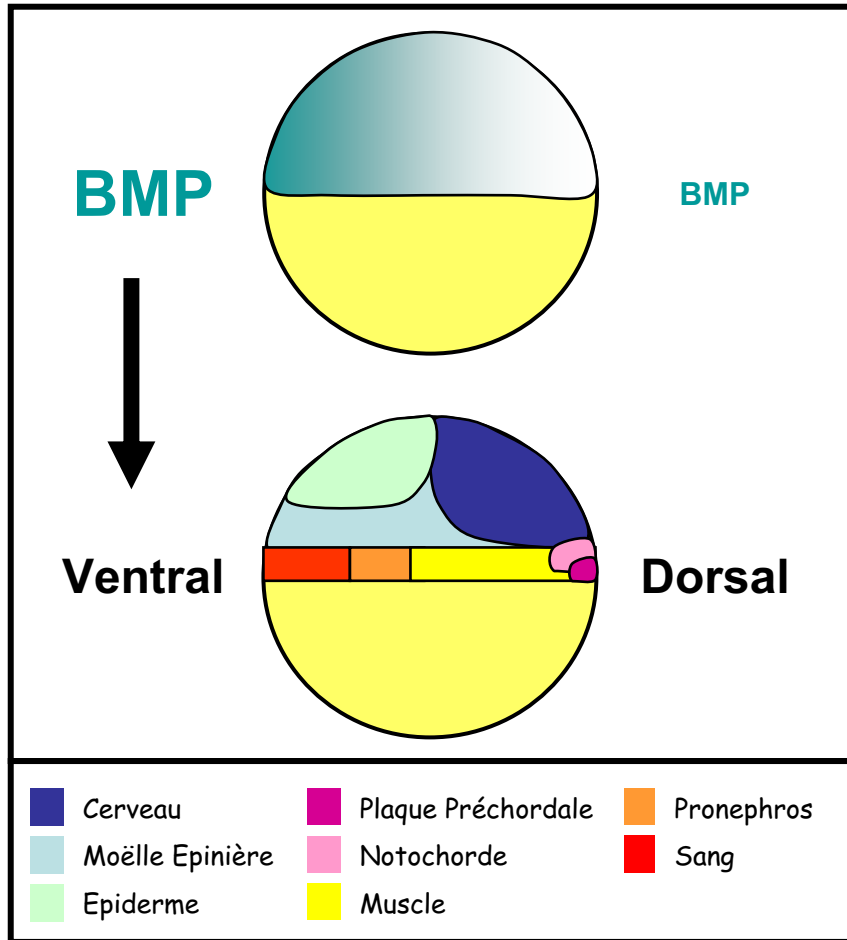
Lorsque les *bmp* sont sur-exprimés (colonne de gauche), les territoires ventraux s'étendent au détriment des territoires dorsaux. Il en résulte un phénotype de ventralisation qui, à 30 hpf, est caractérisé par une absence du territoire neural (pas d'encéphale, ni de tube neural) et du mésoderme dorsal (pas de glande d'éclosion, ni de notochorde)

Lorsque les *bmp* sont mutés (colonne de droite), les territoires dorsaux s'étendent au détriment des territoires ventraux. Il en résulte un phénotype de dorsalisation caractérisé, à 30 hpf, par une absence du mésoderme ventral (pas de sang) et une absence de mésoderme de la queue (le mésoderme non axial de la queue dérivant de la marge ventrale).

Les panneaux du haut sont des dessins schématiques de la carte des territoires présomptifs en fonction de l'activité *BMP*. Les panneaux du milieu montrent l'expression du marqueur épidermique *foxi* pendant la gastrulation. Les panneaux du bas représentent les embryons à 30 hpf.

ligands *bmp2* et *bmp7* (Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995; Wang et al., 1997). Cependant, la découverte majeure vint de l'analyse de la sur-expression de doses croissantes de l'ARN *bmp4* dans tout ou partie de l'embryon de xénope. Plus la quantité de *bmp4* augmente, plus les tissus mésodermiques ventraux s'étendent dorsalement au détriment du mésoderme dorsal (Dosch et al., 1997; Schmidt et al., 1995). De plus, cette ventralisation dose-dépendante ne se limite pas au feuillet mésodermique. En effet, des doses croissantes de l'ARN codant pour le ligand BMP4 sont capables de convertir progressivement le neurectoderme (l'ectoderme dorsal) en épiderme (l'ectoderme ventral) (Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995). A l'inverse, l'inhibition croissante de l'activité des BMP, par injection d'ARN codant pour des formes dominantes négatives de récepteur aux BMP, conduit à une expansion ventrale progressive des tissus dorsaux au détriment des tissus ventraux (Dosch et al., 1997; Schmidt et al., 1995; Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995). Plus récemment, la perte de fonctions des ligands BMP2, BMP4 et BMP7 seuls ou en combinaison, par des injections de morpholinos, a confirmé l'activité morphogénétique des BMP dans la mise en place de l'axe DV chez le xénope (Reversade et al., 2005).

Chez le poisson zèbre, la surexpression des ARN *bmp* ou d'une forme dominante négative de leur récepteur produit des effets similaires à ceux observés chez le xénope suggérant que l'activité morphogénétique des BMP dans la régionalisation DV de l'embryon est conservée (Neave et al., 1997; Nikaido et al., 1997) (Fig.3). Cependant, la démonstration la plus convaincante de l'activité des BMP dans l'établissement de l'axe DV provient de l'isolation de mutants pour cette voie (Bauer et al., 2001; Dick et al., 2000; Hild et al., 1999; Kishimoto et al., 1997; Mintzer et al., 2001; Mullins et al., 1996; Schmid et al., 2000). Ces mutants présentent des phénotypes de dorsalisation d'intensité variable. Les embryons *lost a fin/laf*, muté pour le gène *alk8* qui code pour un récepteur du signal BMP, sont faiblement dorsalisés. Seuls les territoires les plus ventraux disparaissent et à 24 hpf la nageoire et la veine caudales sont les seuls tissus absents. Les embryons *somitabun/sbn*, mutés pour le gène *smad5*, présentent une dorsalisation plus importante, reconnaissable dès la somitogenèse. Le mésoderme ventral à l'origine du tissu sanguin et du mésoderme de la queue est fortement diminué si bien qu'à 24 hpf, ces mutants ne présentent aucune circulation sanguine et leur queue, plus courte, est enroulée. A l'inverse, le mésoderme paraxial de ces mutants s'étend ventro-latéralement au début de la somitogenèse. Enfin, les embryons *swirl/swl* et *snailhouse/snh*, mutés pour les gènes *bmp2b* et *bmp7* respectivement, présentent une dorsalisation extrême. L'absence des ligands BMP2b et BMP7 est létale et la plupart du temps, les embryons ne survivent pas jusqu'à 24 hpf. Les mutants *swl* et *snh* ne développent



I-Figure 4 : Modèle de spécification de l'axe DV chez le poisson zèbre.

La régionalisation DV de l'embryon de poisson zèbre dépend d'un gradient morphogénétique de BMP le long de cet axe embryonnaire.

L'activité maximale des BMP est située ventralement et décroît en direction de la face dorsale. L'identité ventrale du mésoderme et de l'ectoderme (le sang, le pronephros et l'épiderme) est spécifiée par l'activité BMP la plus forte. La spécification des tissus latéraux (les muscles et les crêtes neurales situées à la frontière entre le tissu neural et l'épiderme) requiert des doses intermédiaires de BMP. Enfin, l'absence de l'activité BMP est nécessaire à la spécification de l'identité dorsale du mésoderme et de l'ectoderme (la plaque préchordale, la notochorde et le cerveau).

aucun dérivé du mésoderme ventral. En revanche, leur notochorde (mésoderme dorsal) apparaît élargie pendant la somitogenèse, et leurs somites (mésoderme dorso-latéral) s'étendent latéralement jusqu'à fusionner le long de la ligne médiane ventrale. L'ectoderme est aussi affecté chez ces mutants. Le territoire neural (ectoderme dorsal) est étendu ventralement au détriment de l'épiderme (ectoderme ventral). En résumé, plus l'activité de la voie de signalisation BMP diminue, plus les territoires dorsaux (somites et neurectoderme) s'étendent ventralement tandis que les territoires ventraux (sang et épiderme) disparaissent. Chez le xénope et le poisson zèbre, les transcrits *bmp* occupent la face ventrale des embryons pendant la gastrulation suggérant l'existence d'un gradient DV de BMP.

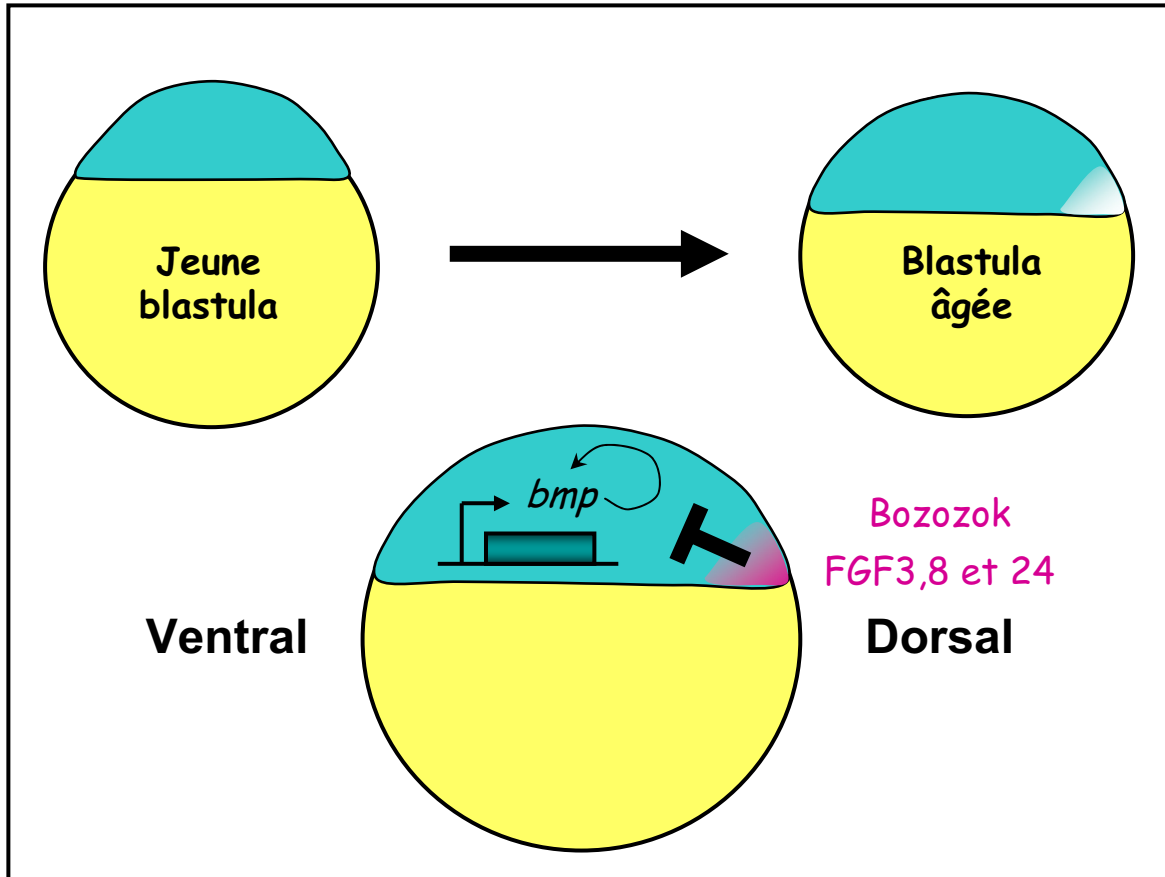
L'ensemble de ces résultats a permis d'établir un modèle où la régionalisation DV de l'embryon dépendrait d'un gradient morphogénétique de BMP le long cet axe embryonnaire, l'identité ventrale étant spécifiée par l'activité la plus forte. La diminution progressive de l'activité BMP en direction de la face dorsale permettrait aux cellules d'adopter une identité plus dorsale (Fig.4). Ce modèle très attractif suggère l'existence de molécules exprimées dorsalement, capables de restreindre l'activité des BMP à la face ventrale.

III. L'établissement d'un gradient Dorso-Ventral d'activité des BMP :

La création d'un gradient d'activité pour une molécule donnée, est le résultat d'une régulation intervenant à deux niveaux : au niveau transcriptionnel et au niveau post-traductionnel. Dans la mise en place de l'axe DV, l'établissement du gradient de BMP résulte en partie de l'activité combinée d'inhibiteur transcriptionnel et d'antagonistes extracellulaires.

III.1. La régulation transcriptionnelle des *bmp* :

Chez le xénope et le poisson zèbre, les ligands BMP sont exprimés de façon dynamique au cours du développement précoce. En effet, chez le poisson zèbre, l'expression des gènes *bmp2b* et *bmp7* débute à la MBT dans la totalité de l'embryon. Dans les 30 minutes qui suivent, leur expression est exclue du territoire présomptif de l'organisateur de Spemann. Cette disparition dorsale se poursuit jusqu'au début de la gastrulation et au stade *shield*, la restriction ventrale des transcrits *bmp2b* et *bmp7* est particulièrement visible au niveau de l'ectoderme (Dick et al., 2000). L'analyse de leur expression dans différents contextes mutants pour la voie BMP (chez les mutants *swirl/bmp2b*, *snailhouse/bmp7* et



I-Figure 5 : Régulation transcriptionnelle de l'expression précoce des *bmp*.

Au début de la blastulation, les ligands *bmp* sont exprimés de façon ubiquitaire dans le blastoderme. Avant le début de la gastrulation leur expression est éliminée à la marge dorsale où se développera l'écusson embryonnaire. Cette répression transcriptionnelle des *bmp* dépend de l'activité dorsale du facteur de transcription Bozozok et de la voie des FGF.

somitabun/smad5) a montré que les *bmp* sont l'objet d'une boucle d'autorégulation positive impliquée dans le maintien de leur expression ventrale au cours de la gastrulation (Kishimoto et al., 1997; Nguyen et al., 1998; Schmid et al., 2000).

La disparition précoce de l'expression des *bmp* de la face dorsale est un évènement très important qui initie la mise en place du gradient d'activité des BMP. Deux types de molécules, exprimées précocement à la marge dorsale, sont impliquées dans ce processus. Il s'agit du facteur de transcription à homéodomaine Bozozok/Boz (aussi connu sous les noms de Dharma et Niewkoid), et des facteurs de croissances appartenant à la famille FGF (Fibroblast Growth Factor) (Fig. 5).

Le facteur Boz est un répresseur direct de la transcription du gène *bmp2b* (Koos and Ho, 1999; Leung et al., 2003). Cependant, bien que l'activité de Boz soit essentielle, ce facteur ne peut être responsable à lui seul de la restriction ventrale de l'expression des gènes *bmp*. Premièrement, son expression pendant la blastula est limitée à un territoire dorsal très étroit, incluant la YSL et quelques cellules du blastoderme (Yamanaka et al., 1998). L'activité de Boz étant cellule autonome, il ne peut réprimer l'expression des *bmp* au-delà de son territoire d'expression. Deuxièmement, Boz n'a pas d'effet sur l'expression du gène *bmp7* (Leung et al., 2003).

La voie de signalisation FGF joue un rôle important dans l'établissement de l'axe DV (Furthauer et al., 1997; Furthauer et al., 2004; Thisse and Thisse, 2005). Contrairement à *boz*, les membres de la famille *fgf* (*fgf8*, *fgf3*, *fgf24*) sont exprimés dans un territoire dorsal plus étendu et leur dynamique d'expression coïncide avec la disparition dorsale des transcrits *bmp*. L'activation ectopique de cette voie de signalisation, via la surexpression du ligand *fgf8* ou des ARN *pea* et *erm*, codant pour des facteurs de transcription impliqués dans la transduction du signal FGF, inhibe l'expression des *bmp* et conduit à une dorsalisation des embryons. A l'inverse, en absence de l'activité des FGF, résultant d'un traitement par des agents pharmacologiques ou de la surexpression d'inhibiteurs tels que *sprouty2*, *sprouty4* ou *sef*, l'expression des *bmp* est étendue dorsalement et conduit à une forte ventralisation des embryons (Furthauer et al., 2002; Furthauer et al., 2001; Furthauer et al., 2004). La voie FGF est donc indispensable à la restriction ventrale précoce de l'expression des *bmp*.

III.2. La régulation post-traductionnelle des *bmp* :

De nombreux modulateurs extracellulaires de l'activité des BMP interviennent au cours de la mise en place de l'axe DV (pour revue : Mullins et al., 1996). Les premiers à avoir été étudiés

sont des antagonistes des BMP sécrétés dorsalement. Ces molécules sont à l'origine du modèle de spécification de l'axe DV par un gradient morphogénétique de BMP (Fig. 6).

III.2.a. Les antagonistes Chordin, Noggin et Follistatin :

Les principaux antagonistes des BMP sont les protéines Noggin, Chordin et Follistatin. Ces facteurs ont été clonés chez le xénope, au début des années 1990 dans la course à l'identification de la nature moléculaire du centre organisateur de Spemann (Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Sasai et al., 1994; Smith and Harland, 1992).

Le facteur Noggin est une protéine sécrétée de 222 acides aminés appartenant à la famille des protéines *Cystein Knot*. En effet, sa région C terminale présente 9 résidus Cystéines à des positions conservées dont l'arrangement tertiaire conduit à la formation d'un nœud. La protéine Chordin est une molécule de 941 acides aminés caractérisée par la présence de 4 domaines riches en cystéines (domaine CR), de l'ordre de 50 à 70 acides aminés chacun. Le premier domaine CR est situé dans l'extrémité N terminale tandis que les 3 autres sont localisés dans la région C terminale.

Les gènes, *noggin* et *chordin*, sont tout les deux exprimés dans la lèvre blastoporale dorsale avant le début de la gastrulation puis dans le mésoderme axial qui dérive de l'organisateur de Spemann (la plaque préchordale et la notochorde). Chez le xénope, la fonction de ces deux protéines a été mise en évidence par des expériences de surexpression. L'expression ectopique de *chordin* ou *noggin* dans un blastomère ventral conduit à la formation d'un axe secondaire partiel composé d'un tube neural et de somites, mais dépourvu de mésoderme axial (notochorde) (Sasai et al., 1994; Smith and Harland, 1992). Ces facteurs sont donc en mesure de reproduire partiellement l'activité de l'organisateur de Spemann. En particulier, ils sont capables de convertir un territoire ayant une identité ventrale (destiné à donner du sang) en un territoire plus dorsal (somites et tube neural). De plus, la sur-expression de doses croissantes de *chordin* ou de *noggin* dorsalisent progressivement le mésoderme ventral (Dosch et al., 1997; Sasai et al., 1994) et transforme l'ectoderme ventral (épiderme) en ectoderme dorsal (tissu neural) de façon dose-dépendante (Sasai et al., 1995; Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995). Les protéines Chordin et Noggin lient et inhibent l'activité des ligands BMP2, BMP4 et BMP7 (Piccolo et al., 1996; Zimmerman et al., 1996). Ainsi, les propriétés dorsalisantes de ces molécules résultent de l'antagonisme de l'activité des BMP. Par ailleurs, Chordin et Noggin agissent sur de longues distances alors que les BMP libres ne peuvent diffuser que sur

de courtes distances (Jones and Smith, 1998). En résumé, chez le xénope, les facteurs Chordin et Noggin participeraient à l'établissement d'un gradient DV de BMP en réprimant l'activité de ce morphogène dorsalement.

Chez le poisson zèbre, un gène *chordin* (*chd*) et trois gènes *noggin* (*nog*) ont été mis en évidence (Bauer et al., 1998; Furthauer et al., 1999; Miller-Bertoglio et al., 1997). Le gène *chd* débute son expression avant la gastrulation dans un territoire relativement large recouvrant un tiers de la marge dorsale. Au début de la gastrulation, son territoire d'expression coïncide avec celui de l'écusson embryonnaire (Miller-Bertoglio et al., 1997; Schulte-Merker et al., 1997). Parmi les trois gènes *nog* identifiés, seul *nog1* est exprimé suffisamment tôt pour pouvoir jouer un rôle dans la mise en place de l'axe DV (Furthauer et al., 1999). Ce gène débute son expression peu de temps après l'activation du génome zygotique dans quelques cellules de la marge dorsale. Au début de la gastrulation, *nog1* est exprimé dans l'écusson embryonnaire mais contrairement à *chd*, son territoire est limité à la couche hypoblastique à l'origine de la plaque préchordale. Comme chez le xénope, la surexpression localisée des ARN *chd* ou *nog1* reproduit l'effet d'une greffe ventrale d'organisateur en induisant la formation d'un axe secondaire partiel. Ces facteurs sont capables de convertir, de façon dose-dépendante, l'identité ventrale du mésoderme et de l'ectoderme, en une identité plus dorsale (Miller-Bertoglio et al., 1997 ; Furthauer et al., 1999 et thèse de Maximilian Fütthauer). L'activité des antagonistes Chd et Nog1 dans la mise en place de l'axe DV semble donc être conservée chez le poisson zèbre. De plus, un mutant pour le gène *chd*, appelé *chordino/dino*, a pu être isolé lors d'un crible mutagène (Schulte-Merker et al., 1997). A 24 hpf, les embryons *dino* présentent un phénotype de ventralisation caractérisé par une expansion du territoire hématopoïétique et une diminution du territoire céphalique. L'analyse de ce phénotype pendant la gastrulation montre une expansion des territoires ventraux au détriment des territoires dorsaux (Hammerschmidt et al., 1996) et confirme le rôle de l'antagoniste Chordin dans la spécification de l'axe DV.

Follistatin est une molécule sécrétée qui a été isolée en 1987, en même temps que l'Activine à partir d'extrait ovarien (pour revue : Phillips and de Kretser, 1998). Initialement considéré comme un simple inhibiteur de l'Activine, il a été montré que Follistatin pouvait aussi lier et inhiber les BMP. Chez toutes les espèces, le gène *follistatin* génère deux transcrits résultant d'un épissage alternatif. Deux isoformes protéiques sont ainsi synthétisées, une version longue (de 315 acides aminés, nommée FS315) et une forme tronquée de sa partie C terminale (de 288 acides aminés, nommée FS288). La version tronquée de Follistatin, la moins

abondante, a plus d'affinité pour l'Activine que sa forme longue qui est la plus répandue. Cette protéine très conservée est caractérisée par la présence de trois régions riches en cystéines : les modules Follistatin. Ces modules de 70 acides aminés possèdent 10 résidus cystéines à des positions conservées, et seraient responsables de l'interaction de Follistatin avec l'Activine et avec l'Héparine. Enfin, la partie N terminale de Follistatin est occupée par une séquence hydrophobe contenant un peptide signal pour sa sécrétion.

Chez le xénope, le gène *follistatin* est exprimé dès le début de la gastrulation dans quelques cellules de la lèvre blastoporale dorsale (Hemmati-Brivanlou et al., 1994). Rapidement cette expression s'étend dans le mésoderme axial qui dérive de l'organisateur de Spemann, la plaque préchordale et la notochorde. Initialement mis en évidence pour sa capacité à induire du tissu neural dans des calottes animales, la fonction de Follistatin dans la régionalisation DV du mésoderme a aussi été étudiée (Fainsod et al., 1997; Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Iemura et al., 1998). Tout comme Noggin et Chordin, sa surexpression dorsalise de façon dose dépendante l'embryon de xénope. Cette activité dépend de la capacité de Follistatin à bloquer les ligands BMP auxquels il se lie en solution (Iemura et al., 1998). Contrairement à Chordin et Noggin qui présentent une forte affinité pour les ligands BMP4 et BMP2, l'affinité de liaison la plus forte de Follistatin est pour le ligand BMP7. De plus, ce facteur est capable d'interagir avec une forme recombinante du récepteur des BMP suggérant un mode d'action différent de celui de Chordin et Noggin. Follistatin bloquerait l'activité des BMP en formant un complexe trimérique avec les ligands et le récepteur membranaire des BMP (Iemura et al., 1998). En résumé, chez le xénope, la molécule Follistatin sécrétée par l'organisateur participerait à la mise en place de l'axe DV en inhibant l'activité des BMP dorsalement.

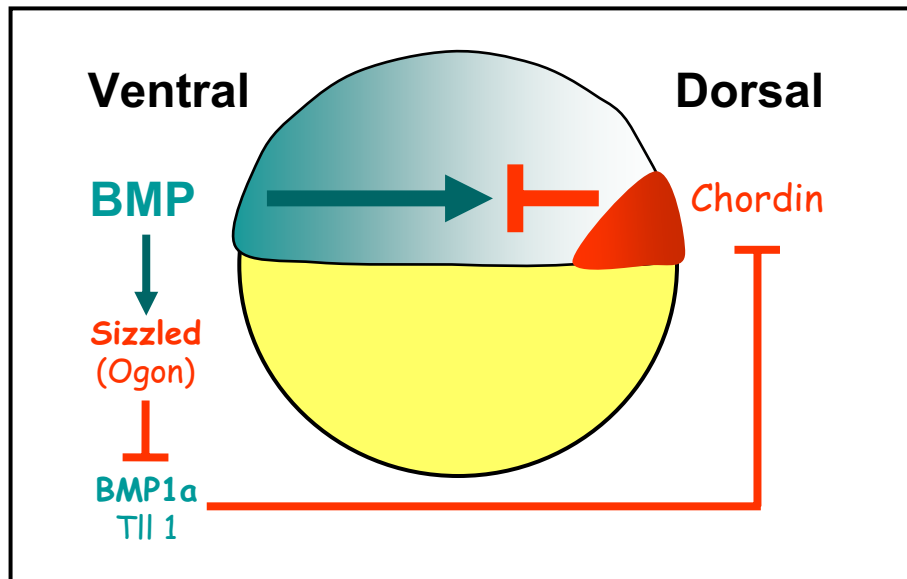
Chez le poisson zèbre, deux gènes *follistatin* (*fst*), *fst1* et *fst2* ont été isolés par Maximilian Fürthauer lors de son travail de thèse (thèse de M. Furthäuer et Bauer et al., 1998). Pour chacun de ces gènes, deux isoformes protéiques (A et B) sont synthétisées. Les transcrits *fst1A* et *fst2A* donnent naissance à une protéine de 322 ou de 319 acides aminés respectivement. Les transcrits *fst1B* et *fst2B* génèrent une protéine de 349 ou de 344 acides aminés. La surexpression de *fst1* ou *fst2* produit le même phénotype indiquant que l'activité de ces deux molécules est identique. Une injection généralisée de l'ARN *follistatin* dorsalise l'embryon de poisson zèbre de façon dose-dépendante : le neurectoderme s'étend ventralement au détriment de l'épiderme et le mésoderme ventral disparaît au profit du mésoderme paraxial. Parmi les deux gènes *fst*, seul *fst1* est exprimé pendant la gastrulation, *fst2* n'est présent qu'à partir du milieu de la somitogenèse. L'expression de *fst1* débute à 70 % d'épibolie et marque le mésoderme céphalique et une partie du mésoderme axial. En résumé,

bien que Fst1 et Fst2 aient la capacité de neuraliser l'ectoderme et de dorsaliser le mésoderme, ils sont exprimés trop tard au cours du développement embryonnaire pour pouvoir jouer un rôle dans la mise en place de l'axe DV.

Le facteur Follistatin est le premier membre identifié d'une large famille de protéines (pour revue : Phillips and de Kretser, 1998). L'appartenance à cette famille est basée sur la présence de modules Follistatin conservés. Chaque membre peut contenir entre 1 et 9 exemplaires de ces modules. La protéine Agrin en contient 9, par exemple, tandis que le facteur Follistatin en possède 3. Un des membres de cette famille est le facteur Follistatin-like (aussi connu sous le nom de FRP pour Follistatin Related Protein). Ce facteur ne contient qu'un seul module Follistatin localisé dans la région N terminale, suivi d'un peptide signal responsable de sa sécrétion. Chez le xénope, un gène *follistatin-like* a été isolé et appelé *xFRP* (Okabayashi et al., 1999). Ce gène est exprimé faiblement au début de la gastrulation dans l'organisateur de Spemann. Au cours du développement embryonnaire, les transcrits *xFRP* marquent les structures occupant la ligne médiane dorsale : la notochorde, l'hypochorde et la plaque du plancher. De façon surprenante, la surexpression de *xFRP* n'affecte pas le développement embryonnaire.

Chez le poisson zèbre, deux gènes *follistatin-like* (*fstl*), *fstl1* et *fstl2* ont été clonés par Maximilian Fürthauer au cours de son travail de thèse. L'expression de *fstl1* débute en fin de gastrulation dans les cellules adaxiales situées de part et d'autre de la ligne médiane et qui participent à la formation des muscles somitiques. Compte tenu de cette expression tardive il est peu probable que *fstl1* contribue à la spécification de l'axe DV. En revanche, *fstl2* est exprimé dès le début de la gastrulation dans les cellules hypoblastiques de l'écusson embryonnaire (donnant la plaque préchordale) ainsi que la YSL. Plus tard, ces transcrits marquent de nombreux tissus parmi lesquels on distingue la notochorde et l'hypochorde qui dérive de l'organisateur, et le mésoderme somitique. Contrairement à *fstl1*, *fstl2* est exprimé au bon endroit et au bon moment pour pouvoir jouer un rôle dans la mise en place de l'axe DV.

Au cours des travaux réalisés par Maximilian Fürthauer, l'isolation des gènes *fst* et *fstl* chez le poisson zèbre et la description de leur patron d'expression a permis de mettre en évidence un nouveau candidat potentiel dans l'établissement de l'axe DV, le facteur Fstl2.



I-Figure 6 : Régulation de l'activité des BMP.

Au début de la gastrulation, un gradient d'activité BMP est déjà présent le long de l'axe DV et résulte en partie de l'activité de protéines ayant des activités pro-BMP (bleu) ou anti-BMP (rouge).

L'activité des BMP est limitée dorsalement par la présence d'antagonistes sécrétés, tels que Chordin, qui séquestrent les ligands BMP et empêchent la liaison à leur récepteur membranaire. L'activité de Chordin est elle-même limitée ventralement par la présence de métalloprotéases de la famille Tolloïd, les protéines BMP1a et Tolloïd like 1 (TII1), qui dégradent cet antagoniste des BMP. Enfin, l'activité de ces métalloprotéases est inhibée par la protéine Sizzled qui est exprimée ventralement sous le contrôle des BMP.

III.2.b. Les autres modulateurs : Tolloïd et Sizzled

Les antagonistes Chordin, Noggin et Follistatin ne sont pas les seules protéines extracellulaires impliquées dans la régulation de l'activité des BMP lors de la spécification de l'axe DV. Depuis l'identification de ces antagonistes un nombre croissant de modulateurs extracellulaires a été mis en évidence (pour revue : Little and Mullins, 2006) Parmi eux, on distingue les protéines de la famille Tolloid (*Bmp1a* et *Tolloid like1*) et la molécule Sizzled dont les fonctions ont été bien caractérisées (Fig. 6).

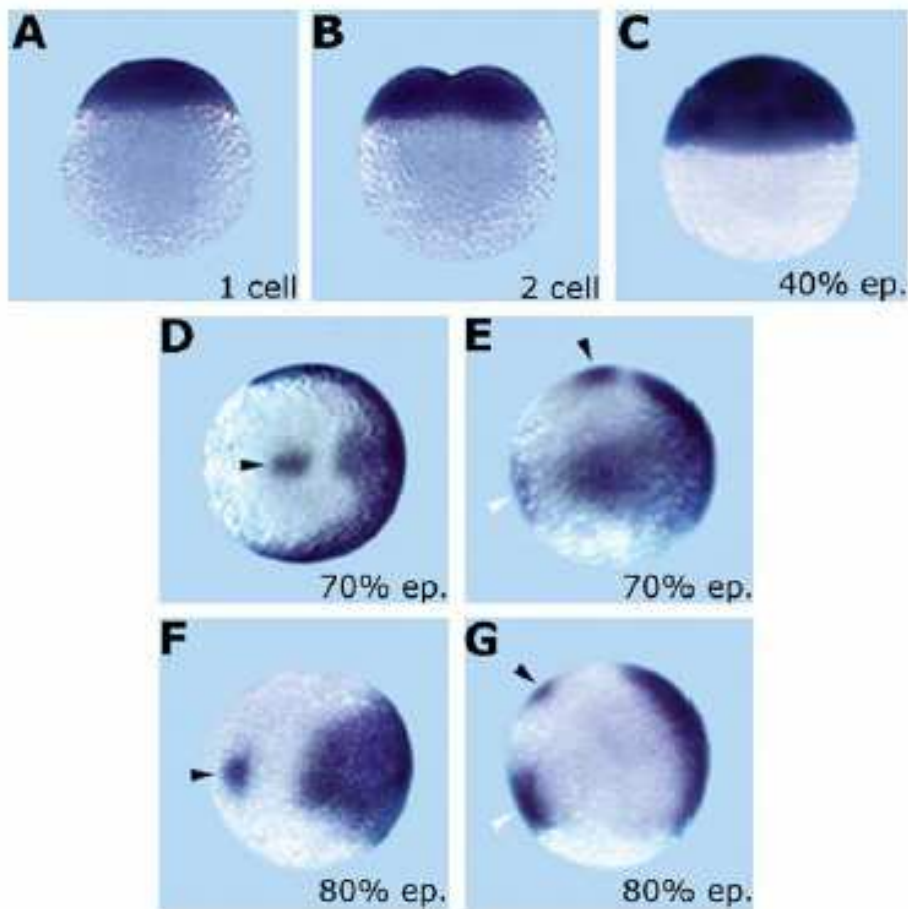
Les gènes *bmp1a* et *tolloid like 1 (tll1)* code pour des métalloprotéases (Blader et al., 1997; Muraoka et al., 2006). Ces protéines participent à l'activité des BMP en dégradant spécifiquement l'antagoniste Chordin. Cependant, alors que les mutants *minifin*, pour lesquels le gène *tll1* est inactif, présente une faible dorsalisation (seule la nageoire caudale est affectée), le phénotype de dorsalisation obtenu suite à l'inactivation de *BMP1a* est beaucoup plus fort (Blader et al., 1997; Muraoka et al., 2006). Contrairement à *tll1*, le gène *bmp1a* est exprimé maternellement et son expression zygotique débute avant celle de *tll1* (Connors et al., 1999; Muraoka et al., 2006). Ces éléments indiquent que parmi les membres de la famille Tolloid, *BMP1a* est le facteur principal participant à la mise en place de l'axe DV. L'activité de *Tll1* serait requise à la fin de la gastrulation pour la régionalisation DV de la partie caudale de l'embryon (Connors et al., 2006).

Le gène *sizzled* code pour une molécule sécrétée de la famille SFRP (Secreted Frizzled Related Protein) qui réprime l'activité des BMP (Yabe et al., 2003). En effet, les mutants *ogon*, pour lesquels le gène *sizzled* est muté, présentent un phénotype de ventralisation de faible intensité, similaire à celui des mutants *chordino* (Hammerschmidt et al., 1996). Ce facteur soluble, exprimé ventralement de façon *bmp*-dépendante, inhibe les BMP en modulant l'activité de Chordin (Yabe et al., 2003). En effet, Sizzled est capable de lier et d'inhiber l'activité de *BMP1a* (et *Tll1*). L'antagoniste Chordin, qui n'est plus dégradé, peut alors bloquer l'activité des BMP (Muraoka et al., 2006).

En résumé, bien que l'antagonisme des BMP par Chordin soit essentiel, la mise en place d'un gradient d'activité BMP est le résultat de boucles de régulations complexes faisant intervenir de nombreuses molécules ayant des activités très variées.

III.2.c. De nouveaux antagonistes : Gremlin et Tsukushi

Gremlin a été cloné à la fin des années 1990, lors d'un crible visant à identifier des facteurs maternels ayant la capacité de reproduire l'activité de l'organisateur de Spemann (Hsu et al.,



I-Figure 7: Expression maternelle et zygotique de *gremlin* pendant les stades précoces du développement et la gastrulation.

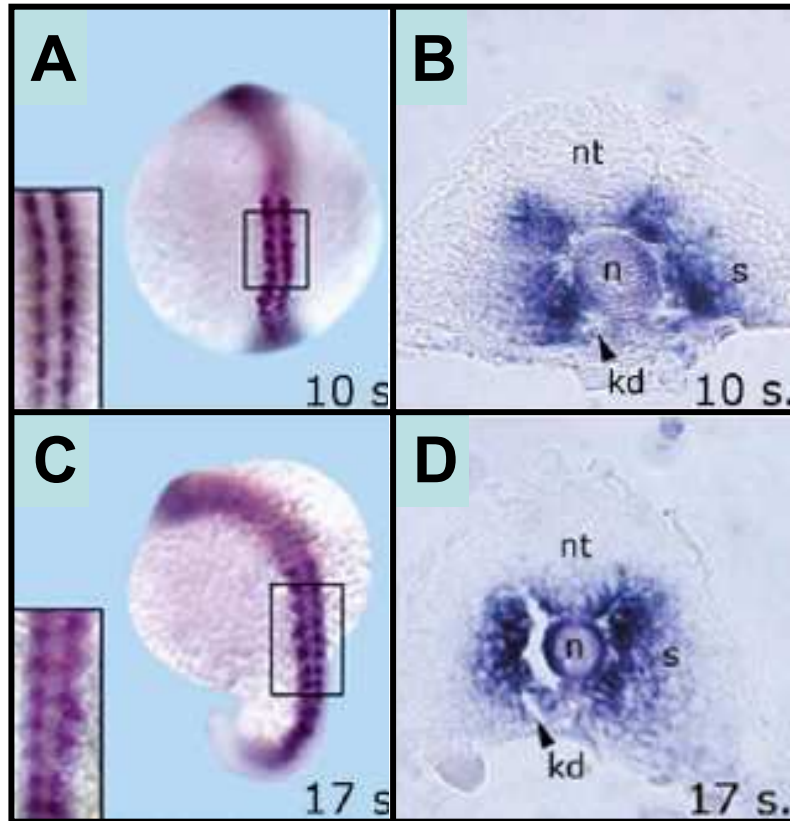
(A et B) Expression maternelle ubiquitaire de *gremlin* au stade 1 (A) et 2 cellules (B). (D-G) Pendant la gastrulation, l'expression de *gremlin* disparaît du territoire animal-ventral en dépit d'une région (flèche noire) qui semble correspondre au mésoderme préchordal. Bien que l'expression de *gremlin* soit plus importante dorsalement, elle marque aussi le mésoderme ventral marginal (flèche blanche).

Les stades analysés sont indiqués en bas à droite de chaque image. Les embryons sont présentés en vue latérale (A, B, C, E et G) ou en vue animale (D et F). Ils sont orientés avec leur face dorsale à droite et leur pôle animal en haut (E et G)

Adapté de Nicoli et al. 2005

1998). En effet, l'injection de l'ARN *gremlin* dans un blastomère ventral induit deux types de phénotypes. Soit les embryons injectés forment un axe secondaire partiel, possédant un tube neural, une notochorde et des somites mais dépourvu de structures antérieures. Soit ils sont dorsalisés suggérant que ce facteur interfère avec l'activité ventralisante des BMP. La protéine Gremlin est une molécule de 28 kDa constituée de 182 acides aminés. Ce facteur possède, dans sa région N-terminale, une séquence hydrophobe ainsi qu'un site de N-glycosylation qui sont responsables de sa sécrétion dans le milieu extracellulaire. Le domaine remarquable de Gremlin est une séquence riche en résidus cystéines (9 occupant des positions conservées) située dans la région C-terminale (aussi connu sous le nom de domaine CAN, Pearce et al., 1999). L'analyse par BLAST a montré que les protéines DAN et Cerberus possédaient aussi ce domaine riche en cystéines et a permis de définir une nouvelle famille : la famille DAN (en raison du premier membre mis en évidence). L'analyse fonctionnelle de l'activité de Gremlin chez le xénope a montré que ce facteur avait la capacité de convertir le mésoderme ventral en mésoderme dorsal et d'induire la formation de tissu neural dans des explants ectodermiques (Eimon and Harland, 1999). Ces propriétés sont liées à sa capacité de bloquer de façon dose-dépendante l'activité des BMP. Comme les autres antagonistes, Gremlin se lie aux BMP dans le milieu extracellulaire, et empêche leur interaction avec leurs récepteurs membranaires (Hsu et al., 1998). Cependant, contrairement à *chordin*, *noggin* et *follistatin*, *gremlin* n'est pas exprimé pendant la gastrulation, excluant une éventuelle participation dans l'établissement précoce de l'axe DV.

Récemment, un homologue de *gremlin* (*grm*) a été cloné chez le poisson zèbre et contrairement au Xénope, ce gène est exprimé précocément dans l'organisateur (Nicoli et al., 2005) (Fig. 7 et 8). Son expression zygotique (le gène *grm* présente une expression maternelle) débute à la MBT et marque la totalité du blastoderme jusqu'à la fin du stade blastula. Pendant la gastrulation son expression disparaît du territoire ventro-animal mais persiste dorsalement et le long de la marge. De plus, ce gène semble être exprimé dans la plaque préchordale. A partir de la somitogenèse, ses transcrits marquent la partie médiane des somites, la couche externe de la notochorde, le tube neural ventral et le tube pronéphrique. A des stades tardifs, *grm* est exprimé dans les bourgeons des nageoires pectorales et les cellules des crêtes neurales. Sa capacité à antagoniser les BMP, et son expression dorsale précoce font de Grm un bon candidat pour participer à la régionalisation DV de l'embryon de poisson zèbre.



I-Figure 8 : Expression de *gremlin* pendant la somitogenèse.

(A-D) Expression de *gremlin* pendant la somitogenèse. B et D représente des coupes transversales de dans la région troncale (encadrés en A et C) des embryons présentés, en vue dorsale, en A et C. Pendant la somitogenèse, *gremlin* est exprimé dans la partie médiane des somites (s), située à proximité de la notochorde (n). Son expression marque aussi la couche externe de la notochorde, la partie ventrale du tube neural (nt) ainsi que dans le tube rénal (kd).

Les stades analysés sont indiqués en bas à droite de chaque image.

(Adapté de Nicoli et al. 2005)

Un nouvel antagoniste des BMP, le facteur Tsukushi (TSK) a récemment été identifié chez les vertébrés (Ohta et al., 2004). Cette protéine appartient à la famille Small Leucin-Rich Proteoglycan (SLRP) qui comprend 11 membres. Cette famille protéique se caractérise par la présence de domaines riches en résidus leucine, les motifs LRR (Leucine Rich Repeat). TSK forme un homodimère de 90 kDa composé de monomères possédant chacun 12 motifs LRR. De part et d'autres de ces 12 motifs, on distingue des séquences riches en résidus cystéine. De plus, TSK possède un peptide signal dans sa région N terminale ainsi que des sites de N-glycosylation indiquant que cette protéine est sécrétée. Des gènes orthologues de *TSK* ont été isolés chez le poulet, le xénope et le poisson zèbre (Ohta et al., 2004).

Chez le xénope, *TSK* est exprimé dans l'organisateur de Spemann au début de la gastrulation. Sa surexpression ventrale est capable d'induire la formation d'un axe secondaire partiel, possédant un tube neural, des somites et une notochorde mais dépourvu des structures les plus antérieures. De plus, l'expression ectopique de *TSK* est capable de convertir du mésoderme ventral en mésoderme dorsal et d'induire la formation de tissu neural dans des explants ectodermiques (calottes animales). L'activité dorsalisante de *TSK* peut être sauvée par l'addition de *BMP4* suggérant que ces molécules s'inhibent mutuellement. In vitro, TSK peut former un complexe trimérique avec les ligands BMP et l'antagoniste Chordin. Il a ainsi été proposé que ce facteur coopère avec l'antagoniste Chordin pour bloquer l'activité des BMP. De plus, la perte de fonction de TSK par injection de morpholino entraîne une augmentation du territoire épidermique au détriment du territoire neural suggérant que dans les conditions endogènes, ce facteur contribue à la régionalisation DV de l'embryon pendant la gastrulation. Récemment, deux transcrits *TSKA* et *TSKB* ont été mis en évidence chez le poulet, et résultent d'un épissage alternatif de l'ARN pré-messager *TSK* (Ohta et al., 2006). *TSKA*, l'isoforme la plus courte, est déletée d'une séquence C-terminale de 17 acides aminés par rapport à *TSKB*. L'activité biologique de ces deux protéines n'est pas identique. En effet, *TSKA* possède une plus forte affinité pour les BMP que *TSKB*. Chez le poulet, les transcrits *TSKA* et *TSKB*, sont exprimés de façon différente pendant la formation du nœud de Hensen, l'équivalent de l'organisateur de Spemann. A ce stade, *TSKA* marque le nœud de Hensen tandis que *TSKB* est présent au niveau de la ligne primitive. La formation du nœud de Hensen à l'extrémité antérieure de la ligne primitive, nécessite l'action combinée de deux événements : premièrement, la création d'une zone dépourvue de BMP le long de la ligne primitive ; et deuxièmement, un signal inducteur originaire de la partie médiane de la ligne primitive. Les isoformes *TSKA* et *TSKB* ont été récemment impliquées dans l'induction et la fonction de l'organisateur. Au niveau du nœud de Hensen, *TSKA* coopère avec *Chd* pour inhiber

l'activité de BMP4. Au niveau de la ligne primitive TSKB coopère avec un autre membre de la voie des TGF β , le ligand VG1 pour induire la formation du nœud de Hensen à l'extrémité antérieure de la ligne primitive.

Chez le poisson zèbre, *TSK* est exprimé dans la couche hypoblastique de l'écusson embryonnaire, à l'origine du mésendoderme axial, ainsi que dans la YSL au début de la gastrulation. Pendant la somitogenèse, son expression apparaît dans le mésendoderme céphalique (à l'origine du mésenchyme de la tête), la notochorde (qui dérive de l'hypoblaste axial), au niveau des bords latéraux des somites ainsi que dans le bourgeon caudal. Entre 24 et 48 h, l'expression de *TSK* persiste dans le bourgeon caudal et la tête, et elle débute dans les arcs branchiaux et les bourgeons des nageoires pectorales (Ohta et al., 2004 et communication personnelle de C. Thisse et B. Thisse). Compte tenu de son expression dorsale précoce, Tsukushi est un nouvel antagoniste des BMP susceptible de jouer un rôle dans l'établissement de l'axe DV.

IV. But de mon travail :

Au moment où j'ai commencé ma thèse, l'essentiel des données concernant la fonction des antagonistes des BMP au cours de la spécification de l'axe DV, principalement les facteurs Chordin et Noggin, reposait sur des expériences de gain de fonction. Bien que ce type d'expériences ait permis d'identifier la fonction biologique de ces protéines, elles n'ont pas prouvé leur réelle implication dans l'établissement du gradient d'activité BMP. Chez le poisson zèbre, parmi ces deux facteurs, seule la participation de Chordin (Chd) a pu être démontrée grâce à l'analyse des mutants *chordino* qui présentent un phénotype de ventralisation. Néanmoins, la ventralisation de ces embryons est nettement moins forte que celle résultant de la surexpression des ARN *bmp*. En effet, chez les mutants *chordino*, bon nombre de structures mésodermiques et ectodermiques dorsales (telles que la notochorde, les somites et le tube neural) persistent et suggèrent l'existence d'autres facteurs capables de bloquer l'activité ventralisante des BMP. Chez le poisson zèbre, les gènes *noggin1 (nog1)* et *follistatin like-2 (fstl2)* sont exprimés à la marge dorsale suffisamment tôt pour pouvoir jouer un rôle dans la mise en place de l'axe DV.

Ainsi, pendant mon travail de thèse, j'ai tenté de mettre en évidence le rôle endogène de ces deux antagonistes des BMP. Pour cela, j'ai réalisé des pertes de fonctions de Nog1 ou Fstl2 en utilisant la technologie des morpholinos. J'ai ainsi démontré que ces facteurs ne sont pas indispensables à l'établissement du gradient DV d'activité BMP au début du stade gastrula mais qu'ils participent à ce processus en collaboration avec la protéine Chordin. En effet, alors que la simple inactivation de Nog1 ou Fstl2 n'affecte pas le développement embryonnaire, elle amplifie fortement le phénotype de ventralisation résultant de l'absence de Chd. Dans les cas les plus extrêmes, la plupart des tissus dorsaux qui persistaient chez les embryons dépourvus de l'activité Chd sont éliminés si bien que ces embryons ne développent pas d'encéphale et sont essentiellement constitués de tissus ventraux tels que l'épiderme et le sang. De plus, la triple perte de fonction des antagonistes Chd, Nog1 et Fstl2 ne produit pas de phénotype plus fort mais elle augmente la quantité d'embryons présentant une ventralisation extrême. L'analyse de différents marqueurs moléculaires au cours du développement embryonnaire a montré que cette amplification phénotypique est visible dès le début du stade gastrula et qu'elle résulte d'une expansion dorsale de l'activité des BMP.

En conclusion, j'ai démontré qu'en plus de Chordin, deux autres facteurs sont requis pendant le stade blastula/gastrula afin d'inhiber l'activité des BMP sur la face dorsale de l'embryon de poisson zèbre. Ces résultats sont présentés dans la publication jointe à ce manuscrit (Dal-Pra et al., 2006).

Néanmoins, bien que la triple inactivation des facteurs Chd, Nogd1 et Fstl2 perturbe de façon importante l'établissement de l'axe DV, le développement des tissus les plus dorsaux (la notochorde) n'est jamais entièrement aboli. Ces observations indiquent qu'il existe encore des molécules capables de bloquer l'activité des BMP dorsalement chez les embryons dépourvus de l'activité de ces trois antagonistes. Afin d'identifier ces protéines, j'ai commencé à étudier deux candidats potentiels, les antagonistes Gremlin et Tsukushi, pour lesquels je présente des données préliminaires.

Partie I : Publication

**Noggin1 and Follistatin-like2 function redundantly to Chordin to
antagonize BMP activity**

Noggin1 and Follistatin-like2 function redundantly to Chordin to antagonize BMP activity

Sophie DAL-PRA, Maximilian FÜRTHAUER, Jeanne VAN-CELST, Bernard THISSE and Christine THISSE

Developmental Biology, 2006, vol. 298, pages 514-526

Pages 39-... :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.002>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Partie I : Résultats Complémentaires

Pendant mon travail de thèse, j'ai montré que *Noggin1* (*Nog1*) et *Follistation-like2* (*Fstl2*) fonctionnaient de façon redondante par rapport à *Chordin* (*Chd*) pour inhiber l'activité des BMP lors de la mise en place de l'axe DV du poisson zèbre. Cependant, bien que la perte simultanée de ces trois protéines perturbe de façon importante le développement de l'axe DV, les phénotypes de ventralisation obtenus sont moins forts que ceux résultant de la surexpression des *bmp*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence. Premièrement, les phénotypes des triples morphants *Chd-Nog1-Fstl2* pourraient être le résultat d'une perte partielle de ces protéines. Cependant, l'inactivation de *Chd* par injection de 100 μ M de MO-*Chd* produit le même phénotype que celui des mutants *dino*, et les morpholinos dirigés contre *Nog1* et *Fstl2* ont été utilisés à de fortes concentrations (allant jusqu'à 1000 μ M). Il est donc peu probable que les structures dorsales qui persistent dans les triples morphants *Chd-Nog1-Fstl2* soient le résultat d'une activité résiduelle de ces antagonistes. Deuxièmement, il est possible que d'autres facteurs participent à l'antagonisme des BMP au cours de l'établissement de l'axe DV. Au début de la gastrulation, les antagonistes *Gremlin* (*Grm*) et *Tsukushi* (*TSK*) sont exprimés dorsalement et pourraient jouer ce rôle. Pour tester cette hypothèse, j'ai tenté d'élucider le rôle de ces facteurs pendant la spécification de l'axe DV. Tous les résultats présentés dans cette section sont des données préliminaires qui nécessitent d'être répétées et étendues.

I. Contribution de l'antagoniste Gremlin à l'établissement de l'axe DV du poisson zèbre :

Chez le xénope, *Gremlin* est capable d'inhiber l'activité des BMP en se liant aux ligands BMP dans le milieu extérieur. Cependant, bien que sa surexpression produise une dorsalisation des embryons, *gremlin* n'est pas exprimé suffisamment tôt chez le xénope pour participer à l'établissement de l'axe DV. Une étude récente a identifié un homologue du gène *gremlin* chez le poisson zèbre et a révélé une expression précoce de ce gène. Ainsi, contrairement aux données obtenues chez le xénope, le gène *grm* exprimé dorsalement pendant la gastrulation, pourrait contribuer à la mise en place de l'axe DV.

wt		ARN Grm						
		C1	C2	C3				
				Phénotypes (%)				
I	ARN injecté	Concentrations (ng/µL)	stade / position clone	n	wt	C1	C2	C3
	Grm	170	1 cellule	111	8,1	1,8	1,8	88,3
	Grm	40	1 cellule	87	4,6	4,6	0	90,8
	Grm	10	1 cellule	67	6	17,9	4,5	71,6
	Grm	5	1 cellule	86	5,8	39,5	15,2	39,5
	Grm	2,5	1 cellule	165	13,9	32,7	18,8	34,6
	Grm	1,25	1 cellule	60	15	41,6	21,7	21,7
	Grm*	2,5	8-16 cellules / ventral	19	26,3	21,1	15,8	36,8
	Grm	2,5	8-16 cellules / dorsal	23	82,6	17,4	0	0
	Grm**	1,25	8-16 cellules / ventral	20	30	25	35	10
	Grm	1,25	8-16 cellules / dorsal	16	100	0	0	0
*: Cette injection d'ARN Gremlin en position ventrale produit 5 % d'embryons présentant des axes secondaires partiels								
**: Cette injection d'ARN Gremlin en position ventrale produit 9 % d'embryons présentant des axes secondaires partiels								

I-Figure 9 : Le facteur Gremlin est capable de dorsaliser les embryons au cours du développement embryonnaire et d'induire la formation d'axe secondaires partiels.

(A et E) Embryons sauvages à 24 hpf (A) et au stade 8-10 somites (E). (B,C,D et F) Embryons injectés avec l'ARN *gremlin* dans la réserve vitelline au stade 1 cellule et présentés à 24 hpf (B,C,D) ou au stade 8-10 somites (F). La surexpression généralisée de l'ARN *gremlin* produit des phénotypes de dorsalisation d'intensité croissante (C1, C2 et C3) caractérisés par une perte progressive de la nageoire et de la veine caudale (flèche en B), puis du mésoderme non axial de la queue (C) et du tronc (D). L'absence de mésoderme non axial produit un enroulement de la notochorde (flèches et C et D). Au stade 8-10 somites, les embryons surexprimant gremlin présentent une forme ovoïde caractéristique d'une forte dorsalisation (F). L'injection de l'ARN *gremlin* dans 1 blastomère ventral au stade 8-16 cellules (G et H) est capable de générer un axe secondaire partiel dépourvu de notochorde (H) au stade 8-10 somites.

(I) Tableau récapitulatif de la répartition statistique des phénotypes de dorsalisations à 24hpf en fonction des doses d'ARN *gremlin* injectées, et de la position DV ventral de ces ARN.

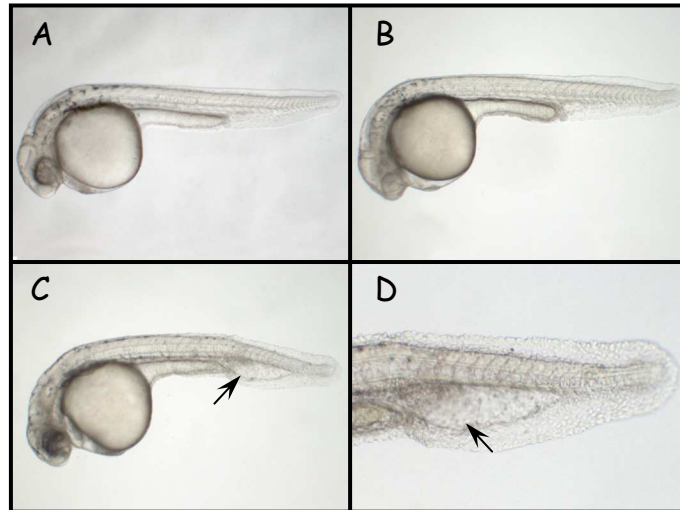
(A, B, C, D, G et H) les embryons sont présentés en vue latérale avec leur pôle antérieur à gauche et leur face dorsale en haut. L'image en D représente un grossissement de la partie caudale de l'embryon présenté en C.

1.1. La sur-expression de gremlin dorsalise les embryons :

Afin de déterminer si l'activité biologique de la protéine Grm est conservée chez le poisson zèbre, j'ai surexprimé ce facteur en injectant son ARN à différentes concentrations (allant de 1,25 ng/μL à 170 ng/μL) dans la réserve vitelline au stade 1 cellule.

La surexpression de *grm* produit des phénotypes de dorsalisation reconnaissables dès le début de la somitogenèse. En effet, à ce stade, les embryons présentent une forme ovoïde caractéristique (Fig. 9 : E et F). A 24 hpf, les embryons montrent des phénotypes de dorsalisation d'intensités variables. Pour rendre compte de ces variations, j'ai distingué trois classes phénotypiques. Les embryons de classe C1 présentent une dorsalisation de faible intensité, caractérisée par la perte de la nageoire caudale et de la veine caudale (Fig. 9 B). Chez les embryons de classe C2, le phénotype de dorsalisation est plus important. Le mésoderme non axial de la queue, provenant du territoire marginal ventral, disparaît et les embryons résultants sont caractérisés par un enroulement de l'extrémité postérieure de la notochorde (Fig. 9 C). Enfin, dans les cas de dorsalisations les plus extrêmes (phénotype de classe C3), les embryons ne développent ni tronc, ni queue et les seuls tissus maintenus sont le système nerveux et mésoderme axial (notochorde et plaque préchordale), provenant des territoires dorsaux (Fig. 9D). Alors que l'injection de l'ARN *grm* à de fortes concentrations produit plus de 80 % d'embryons de classe C3, ce phénotype maximal n'est observé que pour 20 à 30 % des embryons injectés avec des concentrations plus faibles d'ARN (Fig. 9 I). Ces résultats suggèrent que, de la même façon que chez le xénope, la sur-expression de l'ARN *grm* dorsalise les embryons de façon dose-dépendante.

De plus, alors que l'injection de fortes doses de l'ARN *grm* produit essentiellement des phénotypes de classe C3, celle réalisée avec de faibles concentrations ne conduit pas à une majorité de phénotypes de classe C1 mais on observe plutôt une hétérogénéité dans les phénotypes obtenus (Fig. 9 I). Deux hypothèses peuvent expliquer cela : soit la quantité réelle d'ARN injecté n'était pas identique d'un embryon à l'autre pour une concentration donnée, soit c'est la distribution des ARN injectés au sein de l'embryon qui était hétérogène. Pour savoir si l'intensité du phénotype de dorsalisation peut être influencée par la position du clone exprimant *grm*, j'ai réalisé des surexpressions locales de cet ARN. Pour cela, j'ai injecté l'ARN *grm* à de faibles concentrations (1,25 et 2,5 ng/μL) dans 1 blastomère marginal au stade 8-16 cellules en combinaison avec l'ARN codant pour la GFP. Au stade *shield*, les embryons ont été triés en fonction de la position dorsale ou ventrale du clone fluorescent (Fig. 9 I). Dans la majorité des cas, la sur-expression dorsale de *grm* n'a pas d'effet sur le développement de l'axe DV. A l'inverse, lorsque le clone sur-exprimant *grm* est situé



I-Figure 10 : L'inactivation de Gremlin chez le poisson zèbre a peu d'effet sur le développement de l'axe DV à 24 hpf.

Dans plus de 80 % des cas (82% n=60 pour les embryons injectés avec le morpholino MO1-Grm à 2000 μ M; 84 % n=125 pour les embryons injectés avec le morpholino MO2-Grm à 2000 μ M), les morphants Gremlin (B) sont similaires aux embryons sauvages (A). Les reste des morphants Gremlin (C et D) présentent une légère augmentation du territoire hématopoïétique ventral (flèches en C et D).

Tous les embryons sont présentés en vue latérale avec leur pôle antérieur à gauche et leur face dorsale en haut. L'image en D représente un grossissement de la partie caudale de l'embryon présenté en C.

ventralement, les embryons présentent une faible dorsalisation pouvant aller jusqu'à une dorsalisation extrême. De plus, j'ai observé la formation d'axes secondaires partiels suite à l'expression ectopique ventrale de *grm*. Ces axes secondaires sont dépourvus de notochorde et ne développent pas les structures les plus antérieures, tout comme ceux produits par l'expression ectopique ventrale des facteurs *chd* ou *nog1* (cf. Introduction III.2.a). Ces résultats indiquent que la position dorso-ventrale du clone sur-exprimant *gremlin* influence le développement de l'axe DV.

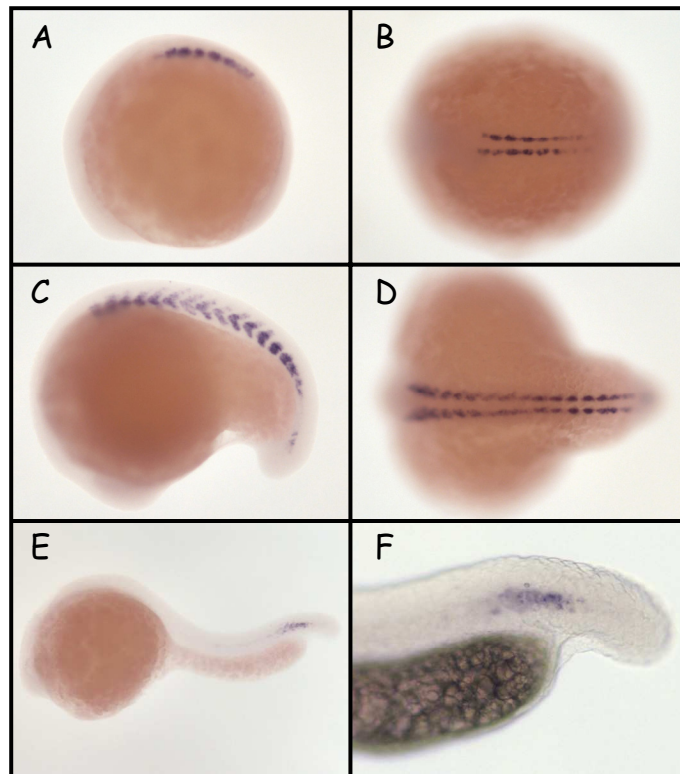
En conclusion, comme chez le xénope, la sur-expression de *grm* est capable de dorsaliser les embryons. Cette activité biologique semble dépendre non seulement de la quantité d'ARN injectés mais aussi de la position DV de ces ARN.

1.2. La simple perte de fonction de Gremlin a peu d'effet sur le développement de l'axe DV :

Compte tenu de l'activité dorsalisante dose-dépendante du facteur Grm, j'ai tenté d'élucider le rôle endogène de cet antagoniste des BMP pendant la mise en place de l'axe DV en réalisant des pertes de fonctions par injections de morpholinos. Pour cela, j'ai utilisé indépendamment deux morpholinos, MO1-Grm et MO2-Grm, à des concentrations allant jusqu'à 2000 μ M.

Dans la plupart des cas, la simple inactivation de Grm n'a pas d'effet sur le développement de l'axe DV et les embryons résultants sont similaires aux embryons sauvages (Fig. 10 : A et B). Pour une faible proportion des morphants Grm, j'ai observé une légère augmentation du territoire hématopoïétique qui pourrait indiquer un défaut dans l'établissement de l'axe DV (Fig. 10 : C et D, 18% n=60 pour MO1-Grm et 16 % n=125 pour MO2-Grm). Bien que ces résultats soient encourageants, ces pertes de fonctions par injection de morpholinos doivent être renouvelées afin de pouvoir conclure quant à la participation éventuelle de Grm dans la régionalisation de l'axe DV.

Dans le même temps, j'ai analysé le patron d'expression de *grm* et de façon surprenante, je n'ai pu reproduire que partiellement le patron d'expression publié récemment (Fig. 11 et Nicoli *et al.*, 2005). En effet, contrairement à Nicoli *et al.*, je n'ai observé aucune expression de ce gène pendant la gastrulation. Dans mes hybridations *in situ*, l'expression de *grm* n'est détectée qu'au début de la somitogenèse dans la partie médiane des somites et cette expression disparaît progressivement à 24 hpf pour n'être maintenue que dans la partie la plus postérieure de l'axe. Pour réaliser ces hybridations *in situ*, j'ai utilisé une sonde complémentaire de la région codante de l'ARN *grm*, alors que Nicoli *et al.* ont utilisé une



I-Figure 11 : Patron d'expression du gène *gremlin* chez le poisson zèbre.

L'expression de *gremlin* débute au début de la somitogenèse dans la partie médiane du mésoderme somitique (embryons présentés au stade 5 somites en A et B). Au stade 16 somites, cette expression s'étend dans la partie dorsale et la partie ventrale des somites (C) mais elle reste confinée dans leur région médiane (D). A 24 hpf, l'expression somitique de *gremlin* disparaît (E) et n'est maintenue que dans la région la plus postérieure (F).

Les embryons sont présentés en vue latérale (A,C,E et F) avec leur pôle antérieur à gauche et leur face dorsale en haut; ou en vue dorsale (B et D) avec leur pôle antérieur à gauche.

sonde complémentaire de la séquence complète de cet ARN incluant les régions 5' et 3' UTR. Par rapport à la taille totale de l'ARN *grm*, sa région 3' UTR est particulièrement longue (de 635 pb). L'utilisation d'une sonde dépourvue de cette région 3' UTR pourrait donc être à l'origine des différences observées entre mon analyse est celle publiée par Nicoli *et al.*

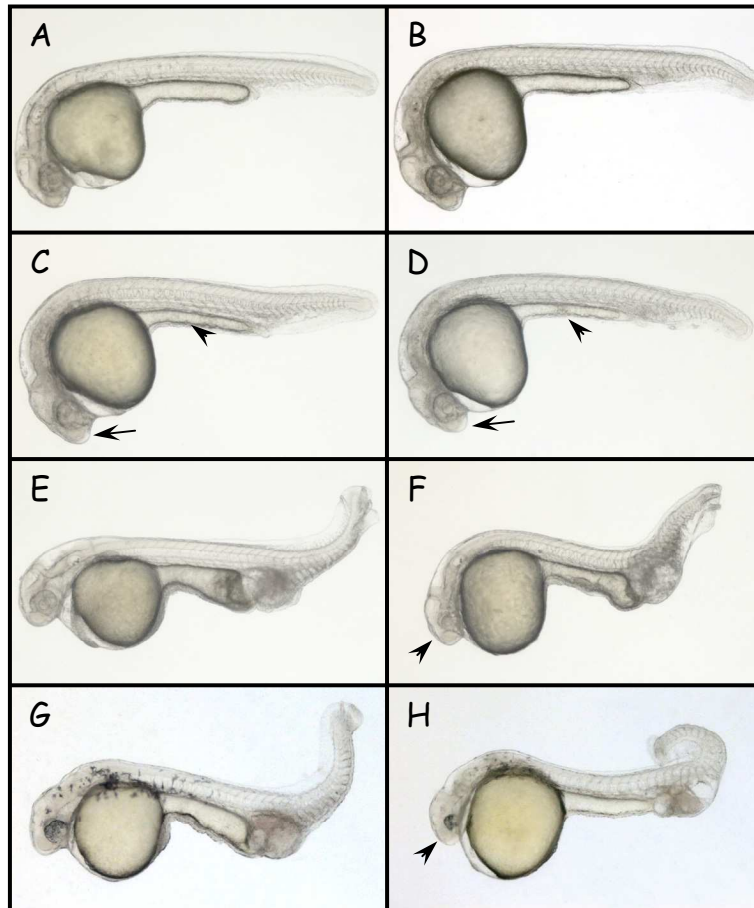
En résumé, tandis que la surexpression de *grm* est capable de dorsaliser les embryons, sa simple inactivation n'a pas d'effet majeur sur le développement de l'axe DV. De plus, contrairement aux résultats publiés, je n'ai observé aucune expression de ce gène pendant la gastrulation. Compte tenu de ces résultats contradictoires et dans l'état actuel de ce travail, il est impossible de conclure quant à la contribution de l'antagoniste Grm dans la mise en place de l'axe DV.

II. Contribution de l'antagoniste Tsukushi à l'établissement de l'axe DV du poisson zèbre :

Chez le xénope, le facteur Tsukushi, sécrété dorsalement pendant la gastrulation, est capable de lier et d'inhiber l'activité des BMP. De plus, des expériences de gain et de perte de fonction suggèrent que cet antagoniste participe à la spécification de l'axe DV du xénope. Chez le poisson zèbre, le gène *TSK* est exprimé dès le début de la gastrulation dans la couche hypoblastique de l'écusson embryonnaire dorsal. Compte tenu de l'activité biologique de cette protéine et de son expression dorsale précoce, TSK est un bon candidat pour participer à l'antagonisme des BMP au cours de la mise en place de l'axe DV du poisson zèbre. Afin d'élucider son rôle dans ce processus, j'ai inactivé TSK seul ou en combinaison avec d'autres antagonistes des BMP (Fig. 12).

Pour cela, j'ai injecté dans la réserve vitelline au stade 1 cellule, une combinaison de deux morpholinos, MO1-TSK et MO2-TSK, à des concentrations de 250 ou 500 μ M chacun. La simple inactivation de TSK ne semble pas affecter le développement de l'axe DV et à 24hpf, les morphants sont indissociables des embryons sauvages (Fig. 12).

J'ai précédemment démontré que les antagonistes Chd, Nog1 et Fstl2, exprimés dorsalement pendant la gastrulation, agissaient de façon redondante au cours de la spécification de l'axe DV afin d'antagoniser l'activité ventralisante des BMP. Il est donc possible que la présence de ces antagonistes compense l'absence du facteur TSK. Afin de tester cette hypothèse, j'ai inactivé TSK en combinaison avec Nog1 ou Chd. Pour cela, j'ai injecté simultanément les



I-Figure 12 : L'inactivation de Tsukushi/TSK amplifie faiblement le phénotype de ventralisation induit par la perte de l'antagoniste Chordin à 24 hpf.

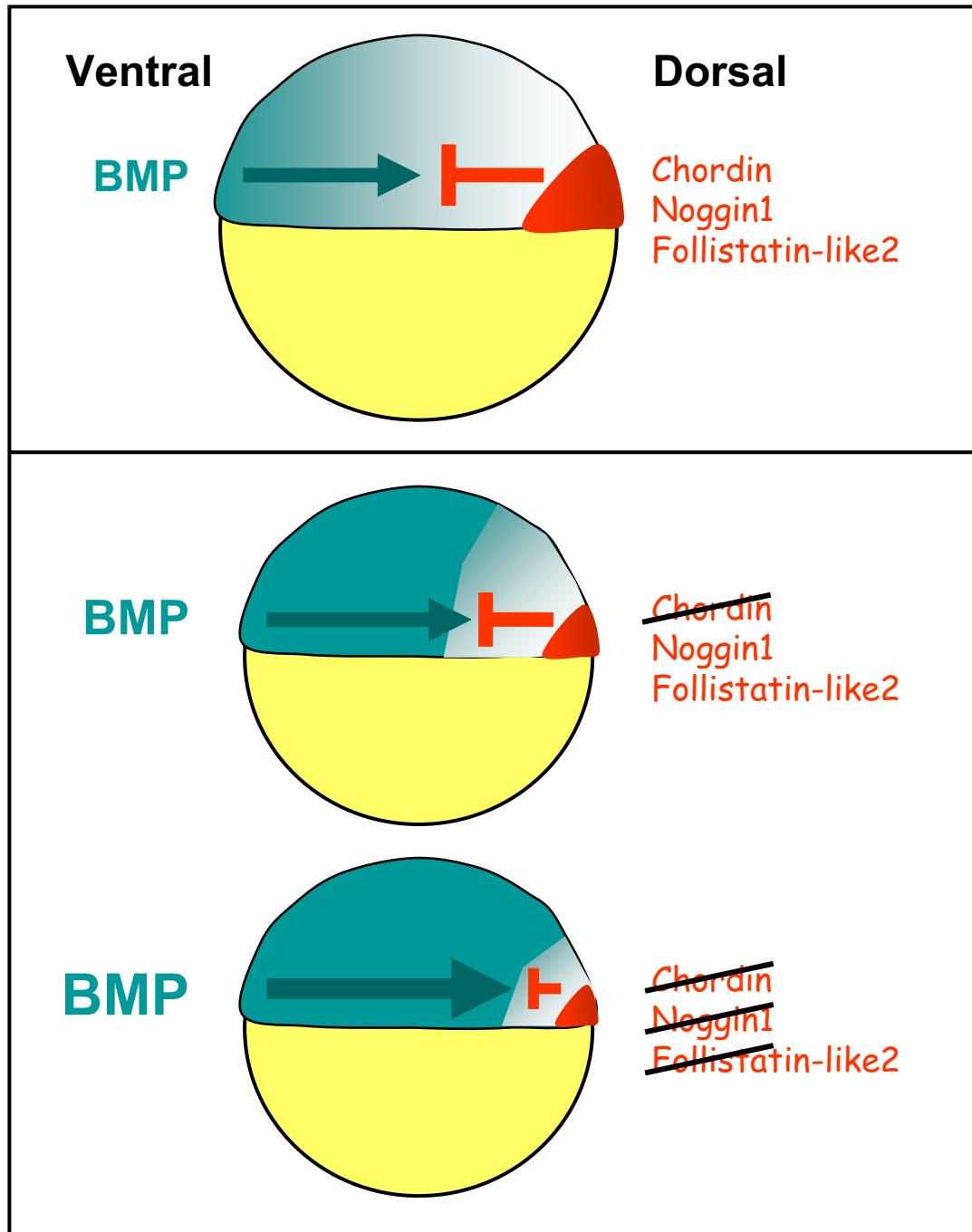
A 24hpf, les embryons injectés avec une combinaison de morpholinos MO1-TSK et MO2-TSK, utilisés à 500 μ M chacun, (B) sont identiques aux embryons sauvages (A). L'inactivation de Nog1 (par injection du morpholino MOa-nog1 à 800 μ M) (C), en combinaison avec celle de TSK ne produit pas de phénotype de ventralisation (D). Les seuls défauts présents chez ces doubles morphants sont un télencéphale proéminent (flèche en D) et une extension vitelline plus étroite (tête de flèche en D) résultant de l'absence de Nog1(C). En revanche, la ventralisation observée chez les morphants injectés avec 100 μ M de MO-chd (E) ou chez les mutants *dino* (G) est légèrement amplifiée par la perte simultanée du facteur TSK (F et H). En effet, cette amplification est visible au niveau de la tête qui apparaît plus petite et présente une microphthalmie (flèches en F et H)

Les embryons sont présentés en vue latérale, leur pôle antérieur à gauche et la face dorsale en haut.

morpholinos MO1-TSK et MO2-TSK (utilisés à 250 ou 500 μ M chacun) avec le morpholino MOa-nog1 (utilisé à 800 μ M) ou avec le morpholino MO-chd (utilisé à 100 μ M). La régionalisation DV des embryons n'est pas affectée par la perte de fonction simultanée de TSK et Nog1 (Fig.12 D). Les seuls défauts observés chez ces doubles morphants sont un télencéphale anormalement proéminent et une extension vitelline plus étroite. Ce phénotype résulte de l'inactivation de Nog1 (Fig.12 C et Dal-Pra et al., 2006).

En revanche, l'inactivation de TSK en absence du facteur Chd amplifie le phénotype de ventralisation des morphants *chd* (Fig.12 E et F). Chez la plupart des simples morphants *chd*, le phénotype de ventralisation est caractérisé par une augmentation du territoire hématopoïétique en aval de l'anus, sans diminution de la taille de la tête (Fig.12 E; 48,6 % n=37). En revanche, chez les doubles morphants Chd-TSK, bien que leur territoire hématopoïétique soit identique à celui des morphants Chd, leur tête est plus petite (Fig.12 F; 76 % n=158 lorsque les morpholinos MO1-TSK et MO2-TSK sont utilisés à 500 μ M chacun, et 67 % n=91 lorsqu'ils sont utilisés à 250 μ M). La même amplification est observée lorsque le facteur TSK est inactivé chez les mutants *dino* (Fig.12 E; 84,3 % n= 84 pour une injection des morpholinos MO1-TSK et MO2-TSK à une concentration de 250 μ M chacun).

Ces résultats préliminaires suggèrent que le facteur TSK, sécrété dorsalement, coopère avec Chd lors de l'établissement de l'axe DV chez le poisson zèbre. Néanmoins, les phénotypes de ventralisation observés suite à la double inactivation de ces antagonistes reste modérés suggérant que la contribution de TSK lors de la spécification de l'axe DV est relativement faible.



I-Figure 13 : Contribution des antagonistes Chordin, Noggin1 et Follistatin-like2 à l'établissement de l'axe DV.

L'activité des BMP est limitée dorsalement par la présence des antagonistes, Chordin, Noggin1 et Follistatin-like2, qui séquestrent les ligands BMP et empêchent leur liaison à leur récepteur membranaire. Cet antagonisme est en partie responsable de l'établissement du gradient d'activité BMP.

En absence de Chd, l'activité des BMP s'étend dorsalement au détriment des territoires dorsaux. La perte simultanée de Nog1, sans effet par elle-même, amplifie fortement la ventralisation des morphants Chd qui ne développent pas de structures céphaliques dans les cas les plus extrêmes. Enfin, la triple inactivation de Chd, Nog1 et Fstl2 ne produit pas de nouveau phénotype de ventralisation mais augmente la fréquence d'embryons présentant une ventralisation extrême. En absence de ces trois facteurs, une partie des structures dorsales persiste reflétant probablement la présence d'autres antagonistes.

Partie I : Discussion et Perspectives

La spécification de l'axe DV résulte en partie de l'interaction entre les ligands BMP présents ventralement et leurs antagonistes sécrétés dorsalement. Chez le poisson zèbre, l'écusson embryonnaire qui marque la face dorsale est une source importante d'antagonistes des BMP. Parmi ces facteurs, on distingue notamment la molécule Chordin (Chd). La perte de ce facteur, chez les mutants *chordino/dino*, affecte le développement de l'axe DV en produisant un phénotype de ventralisation. Chez les mutants *dino* les tissus ventraux, tels que le sang et l'épiderme, s'étendent dorsalement au détriment des tissus dorsaux, tels que la notochorde et le cerveau. A 24 h, ces embryons présentent une augmentation du territoire hématopoïétique, une diminution de la taille de la tête ainsi qu'une interruption prématurée de la notochorde. Néanmoins, de nombreuses structures dorsales et latérales (tube neural, somites) persistent chez les mutants *dino* par rapport aux embryons surexprimant les ligands *bmp* suggérant que d'autres antagonistes des BMP sont actifs chez ces mutants. Dans l'équipe, deux candidats potentiels pour jouer ce rôle ont été mis en évidence. Il s'agit des facteurs Noggin1 (Nog1) et Follistatin-like (Fstl2). En effet, ces deux antagonistes des BMP sont exprimés dorsalement dès la MBT pour Nog1, et dès le début de la gastrulation pour Fstl2. Au cours de mon travail de thèse, j'ai focalisé mon attention sur ces deux facteurs afin de mettre en évidence leur contribution respective lors de la spécification de l'axe DV. J'ai ainsi démontré, par la réalisation de pertes de fonction, que ces facteurs fonctionnent de façon redondante par rapport à Chd lors de la régionalisation DV du poisson zèbre. En effet, tandis que la simple perte de fonction de Nog1 ou Fstl2 n'affecte pas la spécification de l'axe DV leur inactivation amplifie fortement la ventralisation résultant de l'absence de Chd (Fig. Discussion).

I. Nog1 est-il impliqué dans le développement du télencéphale ?

Bien que le facteur Nog1 participe à la régionalisation DV de l'embryon de poisson zèbre, sa simple perte de fonction n'affecte pas ce processus. En revanche, à 24 hpf les embryons présentent un télencéphale proéminent ainsi qu'une extension vitelline plus fine et à 48 h, ils ne développent pas d'arcs branchiaux postérieurs. J'ai pu reproduire ce phénotype en utilisant deux morpholinos différents suggérant que ces défauts sont spécifiques de la perte de fonction de Nog1. Cependant, plusieurs questions restent sans réponse. De façon surprenante, le gène *noggin1* n'est exprimé ni dans le télencéphale, ni dans les arcs branchiaux. Le gène *noggin2*,

dont l'expression débute en fin de gastrulation, est exprimé dans le télencéphale et le diencéphale antérieur depuis la somitogenèse jusqu'à des stades embryonnaires tardifs. Les transcrits *noggin3* sont détectés à partir de 48h et marquent les arcs branchiaux. Ces observations laissent supposer que les morpholinos MOa-nog1 (dont la séquence recouvre l'ATG) et MOb-nog1 (complémentaire d'une séquence située en amont de l'ATG dans la région 5'UTR) pourraient s'hybrider aux ARN *nog2* et *nog3*. Le phénotype télencéphalique résulterait de l'inactivation de *nog2* tandis que celui observé au niveau des arcs branchiaux refléterait celle de *nog3*. Afin de tester cette hypothèse, j'ai réalisé des alignements de séquences qui ont montré que les deux morpholinos utilisés s'hybrident à des séquences présentes uniquement au niveau des transcrits *nog1*. Le phénotype observé n'est donc pas le résultat d'une inactivation aspécifique des transcrits *nog2* et *nog3*.

Au début de la gastrulation, *nog1* est exprimé transitoirement dans la plaque préchordale. De façon intéressante, ce territoire est aussi le siège de l'expression de *bmp2b* et *bmp7*. A la fin de la gastrulation, les cellules préchordales migrent sous le cerveau présomptif et s'accumulent devant le télencéphale pour former le polster (cf introduction de la partie II). L'antagonisme des BMP par Nog1 au niveau de la plaque préchordale pourrait être important pour assurer le développement du cerveau antérieur. Ainsi, les défauts télencéphaliques observés à 24 hpf seraient le résultat soit de l'absence du signal Nog1 sécrété par la plaque préchordale ; soit, plus simplement, de l'absence de cette structure. L'analyse du marqueur préchordal, *gooseoid*, n'a pas révélé de défaut dans la spécification de la plaque préchordale pendant la gastrulation. De plus, l'ensemble des marqueurs de l'encéphale testés chez les morphants *nog1* au début de la somitogenèse (Emx1 pour le télencéphale, Hlx1 pour le diencéphalique, Pax2.1 pour la frontière entre le mésencéphale et le rhombencéphale et Krox 20 pour les rhombomères 3 et 5) présente une expression similaire à celle des embryons sauvages.

En résumé, bien que les défauts antérieurs des morphants *nog1* soient spécifiques, je n'ai pu identifier, au cours de mon travail de thèse, aucune modification précoce susceptible d'expliquer ce phénotype. La compréhension de ce phénotype nécessitera une étude plus approfondie. En particulier, il serait utile d'analyser l'expression de différents marqueurs céphaliques chez les morphants *nog1* afin d'identifier le stade et les structures responsables de la protubérance télencéphalique observée à 24 hpf. Par ailleurs, l'inactivation d'un autre antagoniste des BMP, le facteur Follistatin 1 (Fst1), affecte le développement des arcs branchiaux postérieurs de façon similaire à celle de Nog1. Il serait donc très intéressant de

réaliser une étude comparative de ces phénotypes tardifs afin d'élucider le rôle de l'antagonisme des BMP au niveau des arcs branchiaux.

II. Fstl2 n'est pas capable, à lui seul, d'inhiber l'activité des BMP.

Comme *Nog1*, la simple inactivation de *Fstl2* n'a pas d'effet sur la spécification de l'axe DV. Cependant, contrairement à *Nog1*, la surexpression de cet antagoniste ne produit aucun phénotype de dorsalisation. Les mêmes résultats ont été obtenus chez le xénope (Okabayashi et al., 1999). Ces données suggèrent que *Fstl2* n'est pas capable, à lui seul, d'inhiber l'activité des BMP. *Fstl2*, appartenant à la famille des protéines possédant des domaines Follistatin, peut lier plusieurs ligands de la voie des TGF β . In vitro, cette protéine inhibe l'Activine avec une forte affinité et les BMP avec une plus faible affinité. On peut imaginer que si la surexpression de *Fstl2*, qui a peu d'affinité pour les BMP par rapport à l'Activine, est sans effet sur le développement embryonnaire, c'est que son activité anti-BMP nécessite la présence d'un co-facteur dont la nature reste encore inconnue. Ce mode de fonctionnement n'est pas surprenant. Il existe des molécules qui fonctionnent en coopération avec d'autres antagonistes afin d'inhiber l'activité des BMP. Par exemple, TSK inhibe l'activité des BMP en formant un complexe trimérique avec ces ligands et leur antagoniste Chd. Un autre modulateur de l'activité des BMP, le facteur Twisted Gastrulation, pourrait à la fois promouvoir l'activité des BMP ou la bloquer en fonction des espèces et de son environnement moléculaire. Des études biochimiques ont montré que cette protéine est capable de lier indépendamment les ligands BMP ou leur antagoniste Chd ; mais qu'elle est aussi capable de former un complexe trimérique avec ces deux molécules (Larrain et al., 2001; Little and Mullins, 2004). Il est donc possible que l'activité antagoniste de *Fstl2* dépende de la présence d'un autre facteur. Sachant que de nombreuses molécules modulent l'activité des BMP via l'antagoniste Chordin, il serait intéressant de tester si Chd est le co-facteur nécessaire à l'activité de *Fstl2*. Un moyen rapide pour vérifier cette hypothèse, serait de sur-exprimer simultanément les ARN *fstl2* et *chd*. Si l'activité anti-BMP de *Fstl2* requiert la présence de Chd alors sa sur-expression devrait être amplifiée la dorsalisation induite par Chordin.

III. Fonction redondante des antagonistes Chd, Nog1 et Fstl2 dans la spécification de l'axe DV.

Parmi les trois antagonistes Chd, Nog1 et Fstl2, seule l'inactivation de Chd est capable de produire, à elle seule, un phénotype de ventralisation. L'intensité de ce phénotype est augmentée par la perte simultanée de Nog1 ou de Fstl2 conduisant à une absence des structures céphaliques dans les cas de ventralisation les plus extrêmes (classe C3), associée à une forte augmentation du territoire hématopoïétique. Cette amplification, visible dès la gastrula, indique que les facteurs Chd, Nog1 et Fstl2 fonctionnent de façon redondante afin d'antagoniser l'activité ventralisante des BMP au cours de la régionalisation DV de l'embryon. La triple inactivation de ces molécules, en revanche, ne produit pas de phénotype de ventralisation plus forts mais augmente la fréquence des embryons présentant une ventralisation extrême. Chez ces triples morphants, une partie des structures dorsales persiste néanmoins. En effet, l'expression de marqueurs du mésoderme axial (*hgg1* pour la plaque préchordale et *flh* pour la notochorde) n'est jamais entièrement éliminée pendant la gastrulation. Il en va de même pour le marqueur du mésoderme paraxial, *myf5*, dont l'expression persiste dans les cellules adaxiales. Ce maintien des tissus les plus dorsaux pourraient être le résultat d'une activité anti-BMP persistante. En absence des trois antagonistes Chd, Nog1 et Fstl2, l'expression du gène cible des BMP, le gène *ved*, n'est jamais circularisée. Ces données indiquent qu'une petite zone dépourvue d'activité BMP est maintenue dorsalement. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela. Cette région dorsale dépourvue d'activité BMP pourrait être le résultat de la répression précoce de la transcription des *bmp* par les facteurs Bozozok et FGF. De façon intéressante, l'inactivation de *fgf8* est capable d'amplifier la ventralisation obtenue suite à l'inactivation de Chd (Furthauer et al., 2004). Il est aussi possible que d'autres molécules sécrétées dorsalement contribuent à l'antagonisme des BMP en absence des trois facteurs Chd, Nog1 et Fstl2 (cf chapitre suivant de la discussion).

Le mésoderme axial (la plaque préchordale et la notochorde) correspond au tissu mésodermique le plus dorsal. Cette région du mésoderme est la moins sensible à l'augmentation de l'activité des BMP. En effet, ce tissu a tendance à être maintenu même dans les cas de ventralisation les plus extrêmes et seule la surexpression de doses importantes de *bmp* est capable de l'éliminer. De façon intéressante, le mésoderme axial est aussi le tissu le moins sensible à la diminution de l'activité des BMP. En effet, alors que le mésoderme

paraxial s'étend latéralement jusqu'à fusionner ventralement en absence du signal BMP (chez les mutants *swl* ou *snh* par exemple), le mésoderme axial n'est que faiblement élargi. Ces données indiquent que la spécification de l'identité de ce tissu ne résulte pas de la simple régionalisation DV du mésoderme par l'activité des BMP. En effet, la spécification du mésoderme axial (mésoderme le plus dorsal) au cours du développement embryonnaire est en grande partie sous le contrôle de l'activité morphogénétique d'une autre voie de signalisation, la voie Nodal. Par conséquent, le maintien du mésoderme le plus dorsal en absence des trois antagonistes *Chd*, *Nog1* et *Fstl2* pourrait être le résultat de l'activité de la voie Nodal.

IV. D'autres facteurs sécrétés participent à l'antagonisme des BMP lors de la spécification de l'axe DV.

Au début de la gastrulation, les antagonistes *Grm* et *TSK* sont exprimés dorsalement et pourraient être responsables de l'activité anti-BMP résiduelle chez les triples morphants *Chd-Nog1-Fstl2*. J'ai réalisé des expériences préliminaires afin d'élucider la contribution éventuelle de ces facteurs lors de la spécification de l'axe DV.

J'ai montré que la surexpression de *grm*, tout comme celle de *chd* ou *nog1*, produit un phénotype de dorsalisation dont l'intensité semble varier en fonction de la dose d'ARN injecté. De plus, son expression ectopique ventrale induit la formation d'un axe secondaire partiel. Ces résultats préliminaires suggèrent que, de la même façon que *Chd* et *Nog1*, le facteur *Grm* a la capacité d'inhiber l'activité ventralisante de BMP chez le poisson zèbre. Cependant, l'inactivation de ce facteur par des injections de morpholinos, ne semble pas avoir d'effet majeur sur le développement de l'axe DV suggérant que *Grm* n'est pas indispensable à l'antagonisme des BMP lors de la régionalisation DV de l'embryon. De la même façon que les observations faites pour *Nog1* et *Fstl2*, il est possible que cette absence de phénotype résulte de la présence d'autres antagonistes capable de compenser la perte de *Grm*. Il serait donc intéressant d'inactiver *Grm* simultanément avec *Chd*, *Nog1* ou *Fstl2*. Cependant, il est aussi possible que *Gremlin* ne participe pas, tout simplement, à la spécification de l'axe DV. L'analyse de son patron d'expression par hybridation *in situ*, contrairement aux données publiées par *Nicoli et al.*, n'a pas mis en évidence une expression précoce de ce gène. En effet, je n'ai détecté les transcrits *grm* qu'à partir de la somitogenèse dans la partie médiane des somites. Pour réaliser cette hybridation *in situ*, j'ai utilisé une sonde ARN antisens complémentaire de la séquence codante de *grm* alors que *Nicoli et al.* ont utilisé une sonde

complémentaire de la séquence complète de l'ARN *grm*. L'utilisation de sondes différentes pourrait être à l'origine des différences observées. Il est indispensable de renouveler cette expérience en utilisant une sonde complémentaire de la totalité de l'ARN *grm* pour voir si je peux reproduire les résultats de Nicoli *et al.*. Néanmoins, leurs résultats restent surprenants. En effet, l'équipe de Rolf Zeller qui a analysé le patron d'expression de *grm* chez le poisson zèbre n'a pas détecté d'expression précoce de ce gène (communications personnelles d'Odyssé Michos) De plus, ce facteur, qui joue un rôle important dans le développement tardif de l'embryon (régionalisation du bourgeon de membre, développement et morphogénèse du rein et spécification et différenciation des crêtes neurales), ne semble pas être exprimé pendant la gastrulation chez les vertébrés. En effet, chez le xénope, *grm* n'est activé qu'après la gastrulation dans les cellules de crêtes neurales et les tubes pronéphriques (Hsu *et al.*, 1998). Chez la souris, *grm* est activé pendant la somitogénèse au niveau du mésoderme présomitique et dans la partie ventrale du cerveau antérieur (Pearce *et al.*, 1999). Enfin, chez le poulet, *grm* marque le bourgeon de membre, les crêtes neurales et les dérivés du mésoderme paraxial (Bardot *et al.* 2001).

En conclusion, à ce stade du travail, il est impossible de conclure quant à la participation éventuelle de Grm dans la spécification de l'axe DV du poisson zèbre. Avant de poursuivre cette analyse, il faudra déterminer de façon définitive si *grm* est exprimé au cours du développement précoce.

Dans un deuxième temps, j'ai commencé à analyser la fonction de l'antagoniste Tsukushi. Alors que la simple inactivation de ce facteur n'affecte pas le développement embryonnaire, sa perte de fonction amplifie la ventralisation résultant de l'absence de Chd. Ces résultats préliminaires suggèrent que le facteur TSK, sécrété dorsalement, coopère avec Chd pour antagoniser l'activité des BMP. Il a été proposé que TSK bloque l'activité des BMP en formant un complexe trimérique avec BMP et Chd. Si l'activité antagoniste de TSK nécessite la présence de Chd alors son inactivation ne devrait pas amplifier la ventralisation des morphants Chordin. Les résultats obtenus suite à la double inactivation de TSK et Chd suggèrent donc que TSK possède une activité antagoniste des BMP indépendante de celle de Chd. Ces résultats devront être confirmés en renouvelant ces pertes de fonctions et en analysant le phénotype de ventralisation obtenu à l'aide de marqueurs moléculaires pendant la gastrulation. Par ailleurs, il serait intéressant de voir si la perte de TSK est capable d'amplifier la ventralisation la plus forte qui résulte de la triple inactivation de Chd, Nog1 et Fstl2.

Au cours des 7 dernières années, de nouvelles molécules capables d'antagoniser l'activité des BMP ont émergées (pour revue : Yanagita, 2005). Parmi elles, on distingue les protéines Kielin, USAG-1 (Uterine Sensitization Associated Gene1) et Sclerostin (Kusu et al., 2003; Matsui et al., 2000; Yanagita et al., 2004). Kielin, qui a été isolée chez le xénope, est une protéine sécrétée contenant 27 domaines CR (riches en cystéines) similaires à ceux présents chez Chd. Son expression débute au milieu de la gastrulation le long de la ligne médiane dorsale et marque le mésoderme axial (la notochorde et la plaque préchordale) et la plaque du plancher. De plus, la sur-expression de *kielin* est capable de convertir du mésoderme ventral en mésoderme dorsal. Les facteurs USAG-1 et Sclerostin sont des nouveaux membres de la famille DAN. Ces protéines sécrétées, contrairement à la plupart des antagonistes des BMP, agissent sous la forme de monomères. Chez les mammifères, les gènes *USAG-1* et *sclerostin* sont abondamment exprimés dans le rein et les os longs respectivement. USAG-1 se lie avec une forte affinité aux ligands BMP 2, 4, 6 et 7. De plus, la surexpression de USAG-1 à la marge ventrale de l'embryon de xénope est capable d'induire la formation d'un axe secondaire et son activation dans des explants ectodermiques induit la formation de tissu neural. La protéine Sclerostin, quant à elle, se lie avec une forte affinité aux ligands BMP 6 et 7 et avec une plus faible affinité à BMP 2 et 4. Aucune étude concernant l'un de ces trois nouveaux antagonistes n'a été rapportée chez le poisson zèbre et il serait très intéressant, compte tenu des éléments énoncés précédemment, de les isoler afin de déterminer leur patron d'expression et le cas échéant, de tester leur fonction dans la mise en place d'un gradient DV d'activité BMP.

V. L'activité redondante de multiples antagonistes des BMP, pendant la régionalisation DV de l'embryon, est conservée chez le xénope

Jusqu'en 2005, l'essentiel des travaux réalisés sur les antagonistes des BMP reposaient sur des expériences de gain de fonction. Ces expériences ont révélé l'activité biologique de ces molécules mais n'ont pas prouvé leur participation réelle pendant la spécification de l'axe DV. Au cours de mon travail de thèse, l'équipe de Richard Harland a publié l'analyse de la perte de fonction des facteurs Chordin, Noggin et Follistatin chez le xénope. Cette équipe a montré que la simple ou la double inactivation de ces molécules n'affecte que très faiblement l'identité DV du mésoderme et de l'ectoderme. En revanche, la triple inactivation de Chordin

(Chd), Noggin (Nog) et Follistatin (Fst) a des effets catastrophiques sur le développement du mésoderme dorsal et de la plaque neurale. En effet, les tissus dorsaux disparaissent entièrement chez ces triples morphants et cela d'une façon similaire au phénotype observé en absence d'un organisateur. Il semble donc que chez le xénope, l'essentiel de l'activité anti-BMP de l'organisateur soit portée par les antagonistes Chd, Nog et Fst. Ces résultats sont différents de ceux que j'ai obtenu chez le poisson zèbre où même en absence des trois antagonistes Chd, Nog1 et Fstl2, une partie du mésoderme dorsal et du tissu neural persiste. Ces différences suggèrent que, l'organisateur de l'embryon de poisson zèbre, sécrète probablement d'avantage de molécules capables d'antagoniser l'activité ventralisante des BMP. Une duplication génomique a donné naissance à de nombreux paralogues pour un gène donné chez les téléostéens (pour revue : Hurley et al., 2005). Cette redondance pourrait expliquer en partie la présence de structures dorsales résiduelles chez les triples morphants. Chez le xénope, bien que les tissus dorsaux disparaissent entièrement, de façon surprenante, les tissus ventraux ne sont jamais radialisés. Une zone dépourvue de tissus ventraux persiste dans la partie la plus dorsale de la même façon que chez le poisson zèbre. L'ensemble de ces résultats indique que même si les protéines Chd, Nog et Fst chez le xénope, et Chd, Nog1 et Fstl2 chez le poisson zèbre, semblent être les principaux facteurs limitant l'activité des BMP dorsalement, d'autres protagonistes restent à découvrir chez ces deux espèces.

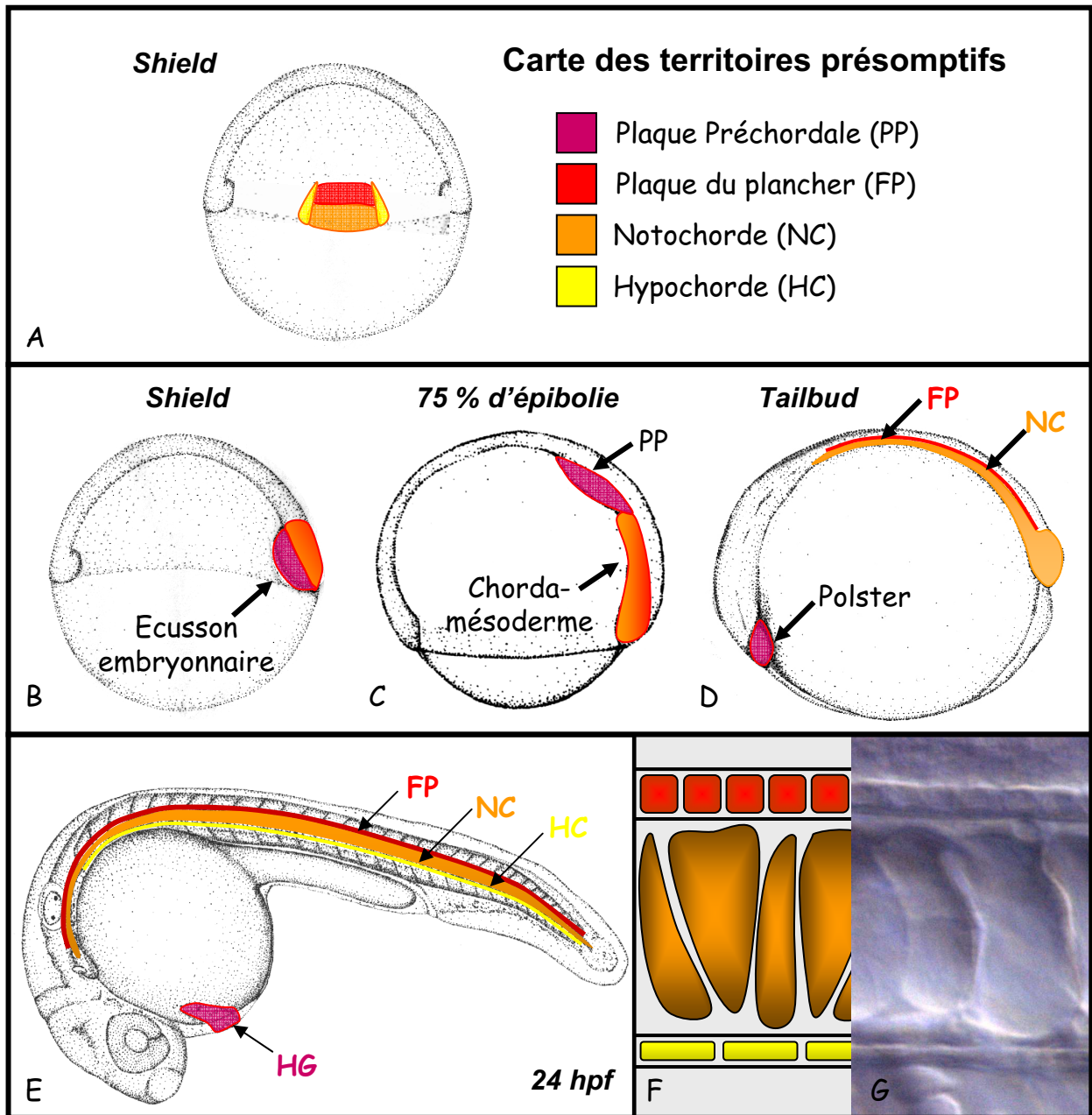
VI. Conclusion

Chez les vertébrés, la spécification de l'axe DV est contrôlée par un gradient d'activité BMP. Ce gradient résulte, en partie, de l'interaction entre les ligands BMP, sécrétés ventralement, et leurs antagonistes présents dorsalement. Au cours de mon travail de thèse, j'ai montré qu'au moins trois antagonistes, Chordin, Noggin1 et Follistatin like 2, interviennent simultanément et de façon redondante dans le contrôle du gradient BMP. Cependant, il semble évident, aux vues des résultats obtenus, que l'exclusion des BMP de la face dorsale est un processus important qui met en jeu bien plus de trois protéines dont la nature reste à identifier. L'intervention d'un tel nombre d'antagonistes et d'inhibiteurs des BMP laisse penser que l'établissement du gradient DV de BMP fait l'objet d'un contrôle important visant à maintenir la stabilité du système au cours du développement embryonnaire.

Je reviendrais sur cet aspect en conclusion générale.

Partie II : Etude du développement des structures axiales





II-Figure 1 : Les structures axiales: origine et développement.

Carte des territoires présomptifs des structures axiales au début de la gastrula (A). Les précurseurs de l'axe sont régionalisés au sein de l'écusson embryonnaire (carte réalisée pour la couche épiblastique). Les précurseurs de la notochorde et de plaque du plancher sont situés au centre, les premiers étant plus proche de la marge que les deuxièmes. Les précurseurs de l'hypochorde occupent les bords latéraux de l'écusson embryonnaire. Le mésoderme axial est régionalisé au sein de l'écusson embryonnaire (B). La plaque préchordale est située en profondeur (couche hypoblastique), les précurseurs de la notochorde sont situés à la surface (l'épiblaste). Suivi du développement des structures axiales au cours de l'embryogenèse (C, D et E). A 24 hpf, un fort grossissement des structures axiales est présenté (G) associé à un schéma explicatif (F)

Les embryons sont présentés en vue dorsale (A) ou en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (B et C) ou côté antérieur à gauche et face dorsale en haut (D-G).

Partie II : Introduction

I. Le développement des structures axiales

1.1. Qu'est ce que les structures axiales ?

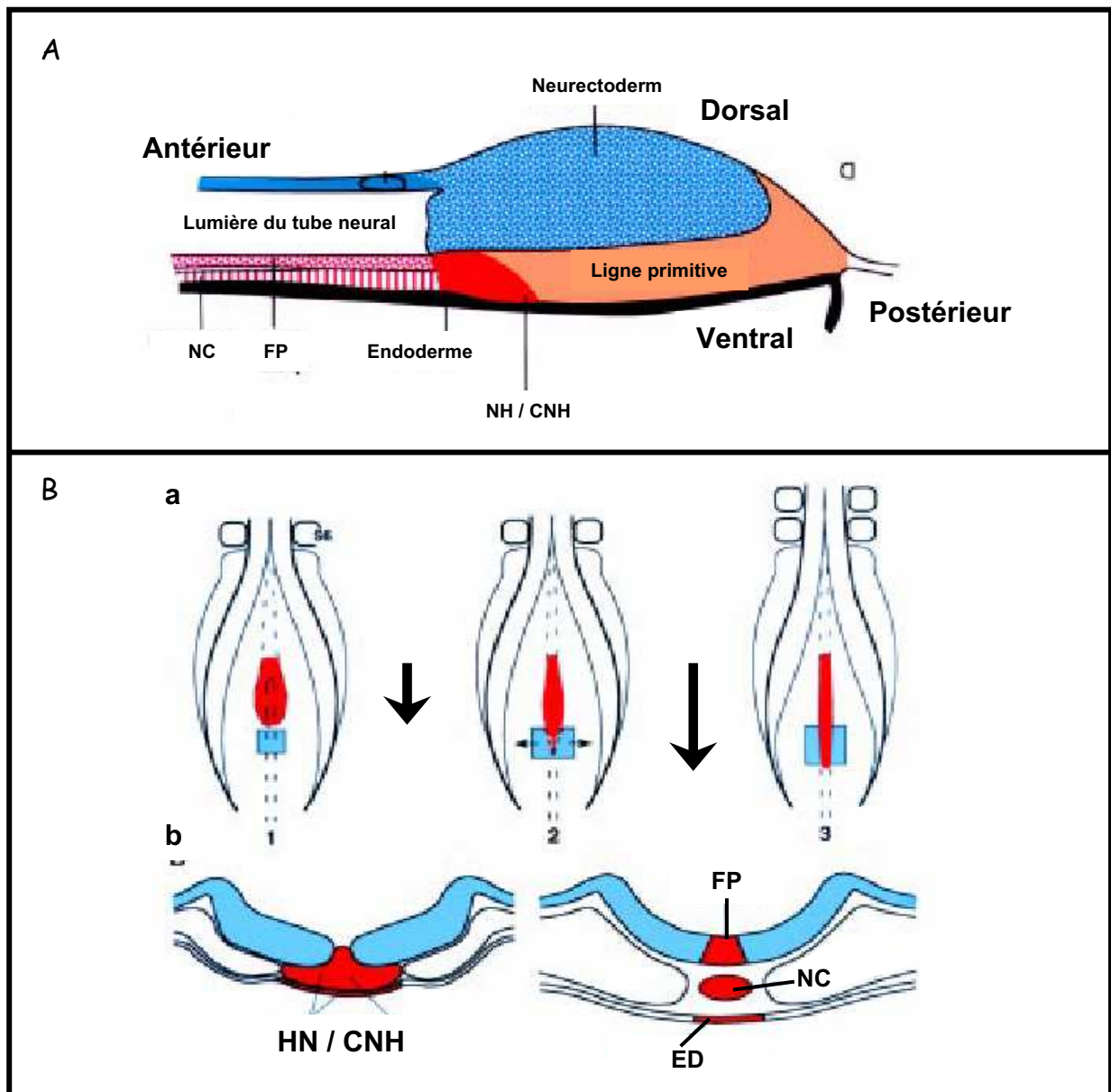
Les structures axiales correspondent à trois éléments situés le long de la ligne médiane dorsale. Elles se composent de la notochorde, de la plaque du plancher et de la partie dorsale de l'intestin chez les amniotes ou de l'hypochorde chez les anamniotes (Fig.1).

La notochorde est une structure mésodermique de forme cylindrique occupant la face dorsale de l'embryon et située immédiatement sous le tube neural. Cette structure transitoire, caractéristique des chordés, assure la rigidité (soutien) de l'axe longitudinal et constitue l'axe de la future colonne vertébrale. De plus, la notochorde joue un rôle très important au cours du développement embryonnaire dans la spécification, la régionalisation et la différenciation des tissus environnants. Elle participe, entre autre, à la régionalisation dorso-ventrale du tube neural sus-jacent, à la spécification et la différenciation des cellules musculaires ainsi qu'au développement de la vasculature. Bon nombre de ces propriétés sont le résultat de l'activité de molécules diffusibles sécrétées par la notochorde.

La plaque du plancher est une structure spécialisée occupant la partie ventrale du tube neural, et située immédiatement dorsalement par rapport à la notochorde. Tout comme la notochorde, elle sécrète de nombreuses molécules solubles et participe à la régionalisation dorso-ventrale du tube neural, à l'induction des motoneurons ventraux et la guidance des axones commissuraux.

Enfin, l'hypochorde est une structure transitoire cylindrique allongée située ventralement par rapport à la notochorde et qui participe, via la sécrétion de molécules diffusibles, au développement du système vasculaire et de l'aorte dorsale. Cette structure, qui est l'équivalent de la partie dorsale de l'intestin des amniotes, a longtemps été assimilée à de l'endoderme. Cependant, de récents travaux suggèrent, sur la base d'observations moléculaires et de lignages cellulaires, une origine mésodermique.

Compte tenu de leur position finale dans l'embryon, ces trois structures axiales ont longtemps été considérées comme étant originaires de feuillet embryonnaires différents : le mésoderme pour la notochorde, l'ectoderme pour la plaque du plancher et l'endoderme pour



II-Figure 2: Développement des structures axiales chez le poulet:

A. Représentation schématique du bourgeon caudale en coupe sagittale (à 25-27 somites).

La charnière chordo-neurale (CNH) qui dérive du nœud de Hensen (NH) forme une masse dense à l'extrémité antérieure de la ligne primitive. Cette structure est à l'origine de la plaque du plancher, la notochorde et l'endoderme dorsal.

B. Représentation schématique du mouvement rostro-caudal du NH/CNH.

a. Le NH/CNH (rouge) qui régresse caudalement, divise le sinus rhomboïde (bleu) en deux parties qui deviendront les plaques alaires de la moëlle épinière. b. Les cellules du NH/CNH sont ségréguées en trois couches: la plaque du plancher (FP), la notochorde (NC) et l'endoderme dorsal (ED).

Figure adaptée de *LeDouarin et al., 2001*

l'hypochorde. Cependant, les études menées au cours des vingt dernières années ont démontré une origine histologique commune.

1.2. Origine des structures axiales : la Charnière Chordo-Neurale (CNH):

Le terme de Charnière chordo-neurale (ou Chordo-Neural Hinge : CNH) a été utilisé pour la première fois chez les amniotes par Pasteels en 1937. Dans la région antérieure du bourgeon caudal de l'embryon de poulet, les extrémités postérieures de la notochorde et du tube neural ventral sont jointes par une masse dense de cellules : la charnière chordo-neurale. Cette structure dérive du nœud de Hensen (NH), l'homologue du centre organisateur de Spemann chez les amphibiens, situé à l'extrémité antérieure de la ligne primitive (Fig.2A). Au milieu des années 90, le potentiel de développement de cette structure a largement été étudié par l'équipe de Nicole Le Douarin (Catala et al., 1996; Catala et al., 1995; Charrier et al., 1999; Le Douarin et al., 1998; Teillet et al., 1998). Le marquage cellulaire par génération de chimère caille-poulet a montré que les structures axiales dérivent antérieurement du NH et caudalement de la CNH. De plus, dans ces chimères caille-poulet, toutes les cellules composant les structures axiales sont originaires du greffon indiquant que le NH/CNH possède un fort potentiel prolifératif. A l'inverse, une large ablation du NH conduit à un embryon dépourvu de l'ensemble des structures axiales mais possédant un tube neural correctement développé selon l'axe AP. Les structures axiales dérivent donc d'un tissu commun, cependant, au cours du développement embryonnaire elles vont participer aux trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme pour la plaque du plancher, le mésoderme pour la notochorde et l'endoderme pour la partie dorsale de l'intestin. Pendant l'allongement postérieur de l'embryon de poulet, le NH puis la CNH subissent un mouvement de régression caudale au cours duquel les dérivés de l'axe sont déposés le long de la ligne médiane (Fig.2B). Les cellules notochordales qui quittent le NH/CNH se développent immédiatement sous le tube neural. Les cellules de la partie dorsale de l'intestin sont positionnées sous la notochorde. Enfin, les cellules de la plaque du plancher s'insèrent dans la partie ventrale du tube neural située immédiatement au dessus de la notochorde. Ce modèle d'insertion ventrale des cellules de la plaque du plancher dans le tube neural contraste avec le modèle d'induction de la plaque du plancher par un signal émanant de la notochorde sous-jacente, développée par l'équipe de Marizia Placzek (Placzek et al., 2000; Placzek et al., 1993; Placzek et al., 1990; Roelink et al., 1994; Ruiz i Altaba et al., 1995).

Ce modèle d'induction repose sur des expériences d'ablation ou de greffe de notochorde ectopique en position latérale par rapport au tube neural. Alors que la greffe de notochorde

induit la formation d'une plaque du plancher ectopique, son ablation l'abolit. Le ré-examen de ces ablations par l'équipe de Nicole Le Douarin indique que, dans les conditions expérimentales utilisées, les deux tissus, notochorde et plaque du plancher, sont si étroitement liés, qu'il est difficile d'éliminer spécifiquement la notochorde sans affecter la plaque du plancher (Le Douarin and Halpern, 2000). Bien que l'origine de la plaque du plancher reste un sujet de controverse, la comparaison des données obtenues chez le poulet, le poisson zèbre et la souris tend à réconcilier ces deux modèles (Placzek and Briscoe, 2005; Strahle et al., 2004)

Chez le poisson zèbre, les structures axiales dérivent de l'écusson embryonnaire, l'homologue du nœud de Hensen chez le poulet (Fig.1). Tout comme les observations faites chez le poulet, l'ablation de cet écusson embryonnaire abolit spécifiquement le développement des structures axiales (Saude et al., 2000; Shih and Fraser, 1996). De plus, les structures axiales qui composent l'axe secondaire induit par la greffe en position ventrale d'un écusson embryonnaire sont constituées exclusivement de cellules originaires du greffon alors que les autres tissus sont composés à la fois de cellules donneuses et receveuses (Saude et al., 2000; Shih and Fraser, 1996). Ainsi, comme chez le poulet, l'écusson embryonnaire du poisson zèbre est capable de donner les trois structures de la ligne médiane de façon cellule-autonome, c'est-à-dire sans recruter de cellules originaires des tissus voisins, suggérant son fort pouvoir prolifératif. Pour corroborer ces données, des marquages cellulaires ont été réalisés et confirment que les précurseurs des structures axiales sont situés dans l'écusson embryonnaire. De plus, ces expériences indiquent qu'en début de gastrulation ils possèdent déjà une organisation particulière au sein de l'écusson embryonnaire (Melby et al., 1996; Shih and Fraser, 1995; Shih and Fraser, 1996). Plus récemment, une carte précise de l'organisation des précurseurs de la notochorde, de l'hypochorde et de la plaque du plancher les uns par rapport aux autres à l'intérieur de l'écusson embryonnaire a été établie (Appel et al., 1999; Latimer and Appel, 2006). Cette carte est présentée sur la figure 1A. La partie marginale centrale de l'écusson embryonnaire contient principalement les précurseurs de la notochorde. Les précurseurs de la plaque du plancher, quant à eux, sont localisés essentiellement dans sa partie antérieure. Enfin, les bords latéraux de l'écusson embryonnaire, situés entre le territoire notochordal et les cellules adaxiales du mésoderme somitique, sont occupés par les précurseurs de l'hypochorde. De plus, chacun de ces territoires possède une combinaison de transcrits particulière (*cf* chap. I.6 de cette introduction)

En conclusion, les structures axiales dérivent d'une population hétérogène de cellules souches pré-organisées au sein de l'écusson embryonnaire, situé à la marge dorsale, en début de

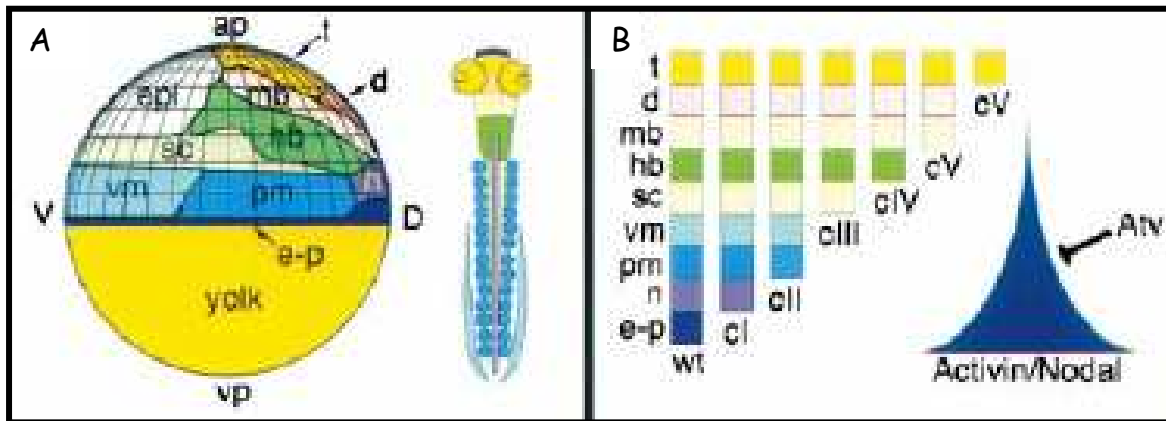
gastrulation. Après la gastrulation, au cours de l'élongation de la queue, cette population cellulaire constitue la Charnière chordo-neurale (CNH).

1.3. Induction et régionalisation animal-marginal du mésendoderme par la voie Activine/Nodal:

La voie de signalisation Nodal est requise, avant la gastrulation, pour l'induction du mésendoderme ainsi que sa régionalisation antéro-postérieure (AP).

En effet, l'implication de cette voie dans ces processus provient, en partie, de l'analyse comparative du phénotype des mutants de la voie Nodal, à savoir : les mutants pour les ligands de cette voie, Cyclops/Cyc et Squint/Sqt, ou pour le co-récepteur de type EGF-CFC, One eye pinhead/Oep. Alors qu'une faible diminution de l'activité Nodal (mutants *sqt*, *cyc* et *Zoep*) ne perturbe le développement que d'une partie des structures axiales (la plaque préchordale et le tube neural ventral) (Feldman et al., 1998; Rebagliati et al., 1998b; Sampath et al., 1998; Zhang et al., 1998), une forte diminution de son activité (double mutant *sqt/cyc* ou mutant hypomorphe *MZoep*), conduit à la disparition de la totalité de l'endoderme et du mésoderme de la tête et du tronc (Dougan et al., 2003; Gritsman et al., 2000). Le seul territoire mésodermique qui persiste dans ces mutants est constitué de quelques somites au niveau de la queue. La perte totale de l'activité Nodal par surexpression, à de très fortes doses, de l'ARN codant pour un inhibiteur compétitif de la voie Nodal/Activine, appelé Lefty1 (aussi connu sous le nom d'Antivin), ou dans les mutants amorphes *MZoep*, abolit le développement de ce territoire (Agathon et al., 2003; Dougan et al., 2003; Gritsman et al., 2000; Thisse et al., 2000). La voie Nodal/Activine est donc responsable de l'induction de la totalité du mésendoderme.

De plus, les signaux Nodal/Activine sont des morphogènes, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'induire une identité cellulaire de façon dose-dépendante. Chez le poisson zèbre, l'activité morphogénétique de la voie Nodal/Activine a été testée par surexpression de doses croissantes de *lefty1* et par comparaison des phénotypes des mutants *sqt^{-/-};cyc^{+/+}*, *sqt^{-/-};cyc^{+/-}*, *sqt^{-/-};cyc^{-/-}*. (Thisse et al., 2000; Thisse and Thisse, 1999; Dougan et al., 2003). La diminution graduelle de l'activité Nodal/Activine abolit progressivement les territoires situés le long de l'axe animal-marginal, les plus sensibles à cette inhibition étant localisés à la marge et les plus résistants au pôle animal (Thisse et al., 2000; Thisse and Thisse, 1999) (Fig.3). Ainsi, les embryons pour lesquels l'activité Nodal/Activine n'est que faiblement diminuée sont semblables aux mutants *Zoep* et ne possèdent pas les territoires les plus marginaux tels que la plaque préchordale et l'endoderme (Schier et al., 1997). Des inhibitions plus fortes de cette



II-Figure 3: L'axe AP est contrôlé par un gradient animal-marginal de l'activité Nodal/Activin.

A: Représentation de la carte des territoires présomptifs

e-p: endoderme et plaque préchordale, n: notochorde, pm: mésoderme paraxial, vm: mésoderme ventral et latéral, sc: chorde spinale, hb: cerveau postérieur, me:cerveau moyen, d: diencephale, t:telencéphale, epi: épiderme.

Orientation: V: Ventral, D: Dorsal, ap: pôle animal et vp: pôle végétatif.

A: Phénotypes (cl à cV) obtenus après surexpression de l'inhibiteur compétitif *lefty1* (ou *antivin*)

La diminution progressive de l'activité Nodal/Activin par surexpression de *lefty1* abolit le développement des territoires le long de l'axe Animal-Marginal. Une faible diminution de l'activité Nodal/Activin affecte uniquement les tissus les plus marginaux (e-p) (phénotype de classe cl).L'élimination des tissus situés au pôle animal (d et t) nécessite une forte diminution de l'activité Nodal/Activin (phénotype de classe cV).

Figure adaptée de *Thisse et al. 2000*

voie éliminent progressivement la notochorde, les somites, le tissu hématopoïétique, la corde spinal puis le cerveau postérieur et moyen.

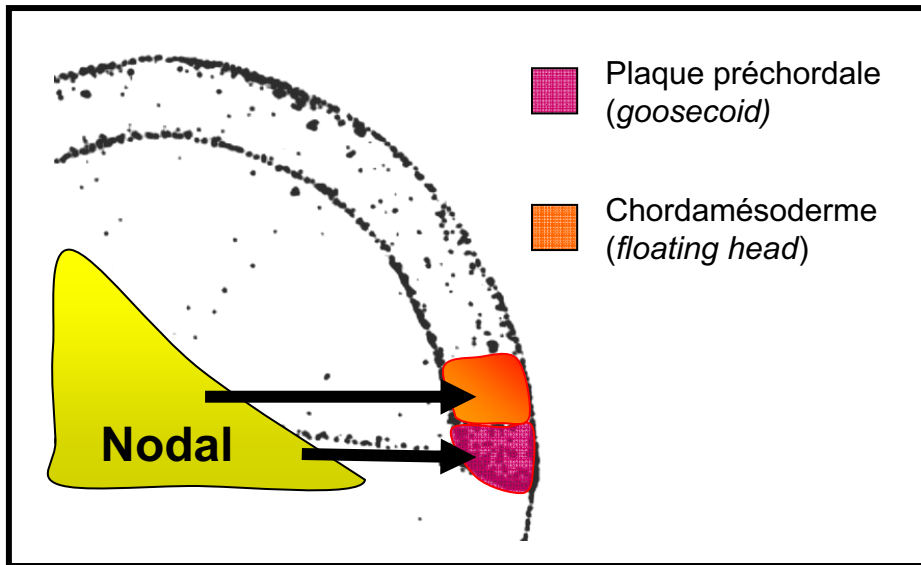
Ainsi, la mise en place de l'axe AP de l'embryon dépend de l'activité d'un gradient morphogénétique animal-marginal de Nodal/Activine, son activité la plus forte étant située à la marge.

1.4. Régionalisation antéro-postérieure du mésoderme axial par la voie Nodal:

En dehors de l'activité globale de la voie Nodal sur la mise en place de l'axe AP de l'embryon, son rôle spécifique dans l'induction et la régionalisation antéro-postérieure du mésoderme axial a été étudié.

Les structures axiales qui dérivent de l'écusson embryonnaire possèdent une identité AP. Cette identité est visible au niveau du mésoderme axial qui est constitué de la plaque préchordale antérieurement et de la notochorde postérieurement (Fig.1). Comme nous l'avons déjà mentionné, la greffe de l'écusson embryonnaire sur la face ventrale d'un embryon au stade *shield* induit la formation d'un axe secondaire contenant l'ensemble des structures axiales (plaque préchordale, notochorde, plaque du plancher et hypochorde) (Saude et al., 2000; Shih and Fraser, 1996). En revanche, la greffe de la partie hypoblastique (profonde) ou épiblastique (superficielle) de cet écusson produit des axes secondaires incomplets (Saude et al., 2000). En effet, la couche hypoblastique de l'écusson embryonnaire induit un axe secondaire composé des tissus antérieurs et des structures axiales qui lui sont associées (plaque préchordale, notochorde et plaque du plancher antérieures); celle de la couche épiblastique produit un axe secondaire postérieur contenant les structures axiales du tronc et de la queue mais dépourvu de plaque préchordale. Ces résultats suggèrent qu'au moment où l'écusson embryonnaire se forme, les précurseurs des structures de l'axe possèdent déjà une identité AP.

L'écusson embryonnaire se forme à la marge dorsale et exprime les ligands de la voie Nodal (Rebagliati et al., 1998a). Sa régionalisation AP pourrait donc être, tout comme le reste de l'embryon, sous le contrôle de la voie Nodal. L'injection de doses croissantes de l'inhibiteur compétitif *lefty1* indique que la plaque préchordale est plus sensible à la diminution de l'activité de la voie Nodal/Activine que la notochorde (Thisse et al., 2000; Thisse and Thisse, 1999). De même, les simples mutants *cyc* ou *sqt* ne développent pas de plaque préchordale mais possèdent une notochorde tandis que les doubles mutants *cyc;sqt* ne présentent aucun de ces deux tissus (Feldman et al., 1998; Sampath et al., 1998). A l'inverse, l'expression ectopique de Nodal au pôle animal (zone dépourvue d'une activité Nodal endogène) induit, à



II-Figure 4: La régionalisation AP du mésoderme axial dépend de la voie Nodal.

La régionalisation AP du mésoderme axial est contrôlée par un gradient morphogénétique d'activité Nodal. La plaque préchordale (le mésoderme axial antérieure) qui exprime *goosecoid* est induite par une forte stimulation de la voie Nodal, tandis que le chordamésoderme (mésoderme axial postérieur) exprimant *floating head* est spécifié par des doses plus faibles.

forte dose, la formation de la plaque préchordale et, à moindre dose, la formation de la notochorde (Thisse et al., 2000). L'analyse du marqueur préchordal, *hgg1*, et du marqueur notochordal, *shh*, indique que cette induction dose dépendante est déjà effective au stade gastrula (Thisse et al., 2000). En résumé, l'identité AP des structures axiales, tout comme le reste de l'embryon, est contrôlée par un gradient morphogénétique d'activité Nodal. La partie antérieure de l'axe nécessitant une plus forte stimulation de la voie Nodal que sa partie postérieure.

Au niveau moléculaire, les gènes *goosecoid* (*gsc*) et *floating head* (*flh*) marquent les précurseurs de la plaque préchordale ou de la notochorde respectivement (Schulte-Merker et al., 1994a; Stachel et al., 1993; Talbot et al., 1995; Thisse et al., 1994). Au stade blastula, ces gènes sont co-exprimés à la marge dorsale, puis leurs territoires d'expression deviennent différents. Ainsi, dès le début de la gastrulation, le gène *gsc* est exprimé dans la couche hypoblastique (profonde) de la marge dorsale qui donnera la plaque préchordale. Le gène *flh* occupe la couche épiblastique (superficielle) à l'origine de la notochorde (ou chordamésoderme) (Gritsman et al., 2000). Ces gènes sont induits précocement par la voie Nodal et de façon dose-dépendante. Une faible stimulation de cette voie est suffisante pour induire l'expression de *flh*, alors que celle de *gsc* nécessite une activité maximale de la voie Nodal (Gritsman et al., 2000).

En conclusion, l'induction du territoire préchordal, exprimant le gène *gsc*, nécessite une activité maximale de la voie Nodal tandis que des doses intermédiaires sont suffisantes à l'induction du chordamésoderme, exprimant *flh* (Fig.4).

1.5. Détermination des différentes structures de l'axe : le rôle des gènes cibles de la voie Nodal

I.5.a. La plaque préchordale : Goosecoid

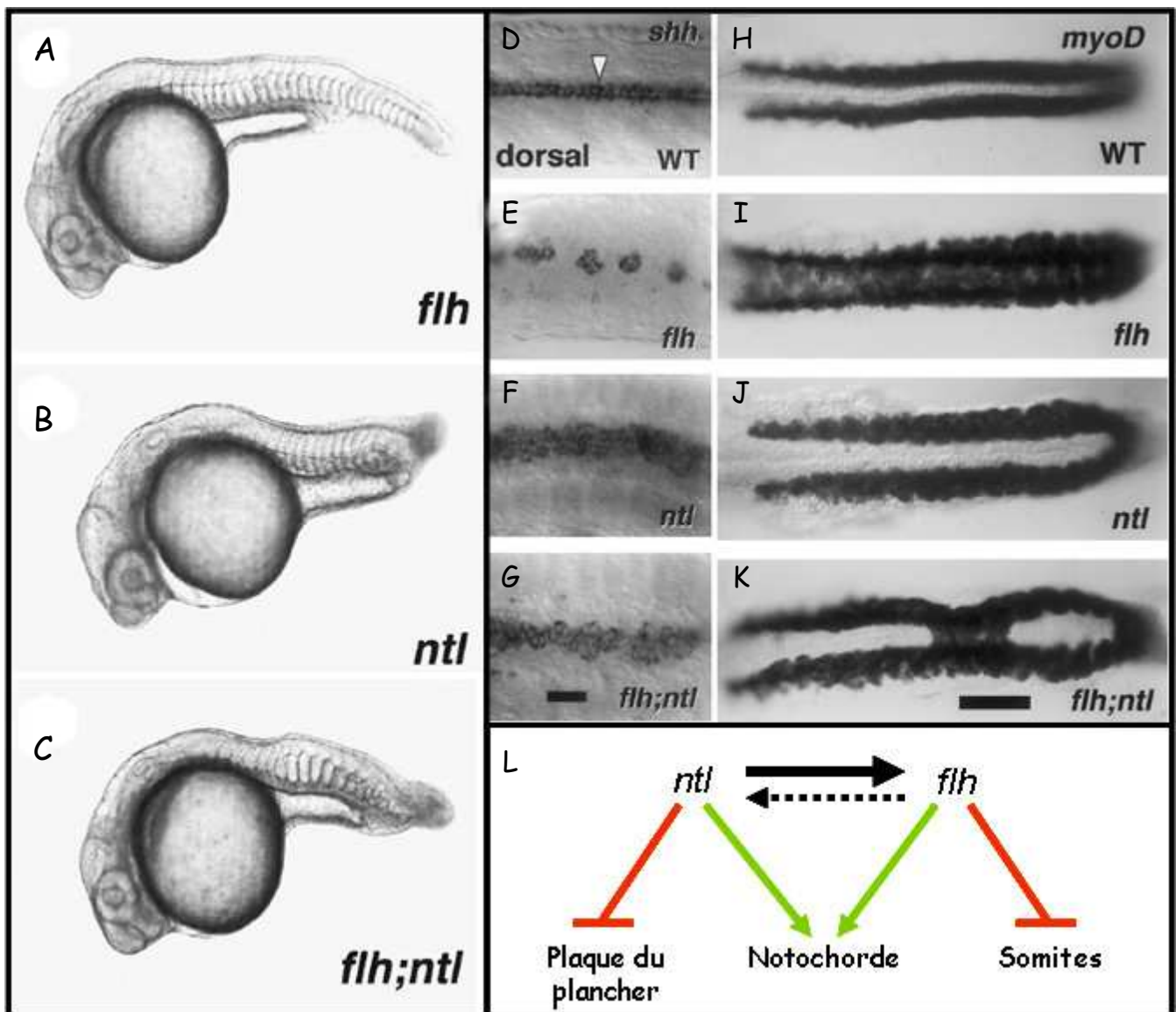
En aval de la voie Nodal, le rôle de Gsc dans le développement de la plaque préchordale a été testé. Le gène *gsc* code pour un facteur de transcription à homéodomaine agissant comme répresseur (Ferreiro et al., 1998; Yao and Kessler, 2001). Pendant la gastrulation, l'expression du gène *gsc* dans le centre organisateur de Spemann est conservée chez les vertébrés suggérant un rôle important dans le développement de cette structure (Blum et al., 1992; Cho et al., 1991; Izpisua-Belmonte et al., 1993; Stachel et al., 1993, Schulte-Merker, 1994 #48; Thisse et al., 1994). Chez le xénope, la perte de fonction de Gsc abolit entièrement le développement de la tête mais n'induit que rarement des défauts dans le développement des

territoires de l'axe (Ferreiro et al., 1998; Steinbeisser et al., 1995; Yao and Kessler, 2001). Chez la souris, son inactivation par recombinaison homologue n'affecte pas le développement embryonnaire (Rivera-Perez et al., 1995; Yamada et al., 1995). Chez le poisson zèbre, les embryons résultant de la perte de fonction de ce gène sont semblables aux embryons sauvages, excepté pour une faible proportion d'entre eux qui présente une perte partielle (cyclopie) pouvant aller jusqu'à une absence totale des structures antérieures (Seiliez et al., 2006). L'ensemble de ces résultats indique que chez les vertébrés le facteur de transcription Gsc n'est pas à lui seul responsable du développement du territoire préchordal. En revanche, l'inactivation de ce facteur de transcription en combinaison avec le facteur de transcription FoxA2 chez la souris, ou FoxA3 chez le poisson zèbre, abolit le développement des structures antérieures (Filosa et al., 1997; Seiliez et al., 2006). Ces résultats suggèrent que l'absence du facteur Gsc peut être compensée par la présence de facteurs de transcription ayant des fonctions redondantes.

I.5.b. Le chordamésoderme : Floating head et Notail

Contrairement aux observations faites pour Gsc, le facteur de transcription Flh (connu sous le nom de Not chez le xénope, le poulet et la souris) est indispensable au développement de la notochorde chez les vertébrés (Abdelkhalek et al., 2004; Gont et al., 1996; Halpern et al., 1995; Talbot et al., 1995). Ce gène code pour un facteur de transcription à homéodomaine qui fonctionne comme un répresseur (Yasuo and Lemaire, 2001). L'expression de *flh* dans le centre organisateur de Spemann et la notochorde est conservée chez les vertébrés (Abdelkhalek et al., 2004; Gont et al., 1996; Stein and Kessel, 1995; Stein et al., 1996; Talbot et al., 1995; von Dassow et al., 1993). Sa surexpression, chez l'embryon de xénope, induit la formation de notochorde élargies ou ectopiques (Gont et al., 1996). A l'inverse, chez la souris, des mutants hypomorphes de ce gène ne développent pas la partie caudale de la notochorde (Abdelkhalek et al., 2004).

Chez le poisson zèbre, l'expression de *flh* débute avec celle des gènes zygotiques. A la blastula, *flh* est exprimé sur toute la marge puis cette expression est restreinte à la face dorsale. Pendant la gastrulation, les transcrits *flh* sont présents dans l'écusson embryonnaire et le territoire notochordal qui en dérive. Au début de la somitogenèse, cette expression disparaît antérieurement et n'est maintenue qu'à l'extrémité caudale de la notochorde, au niveau de la charnière chordo neurale (Talbot et al., 1995). Chez le poisson zèbre, les mutants *flh* ne possèdent pas de notochorde (Halpern et al., 1995; Talbot et al., 1995) (Fig.5). L'analyse des



II-Figure 5: Les gènes *flh* et *ntl* sont indispensables au développement des structures axiales.

Simples mutants *flh* (A), simple mutant *ntl* (B) et double mutant *flh;ntl* (C) présentés à 30 hpf. Expression du marqueur de la plaque du plancher, *shh*, (D-G) et du marqueur des somites, *myoD*, (H-K) chez ces différents mutants.

Les mutants *flh* (A) ne développent pas de notochorde et à la place les somites fusionnent le long de la ligne médiane (I). De plus, la plaque du plancher des mutants *flh* présente des interruptions (E). *flh* serait requis pour promouvoir le développement de la notochorde en empêchant les cellules de l'axe d'adopter une identité musculaire (L).

Les mutants *ntl* (B) ne développent pas de notochorde mais les somites ne fusionnent pas le long de la ligne médiane (J) et leur plaque du plancher est élargie (F) *ntl* serait requis pour promouvoir le développement de la notochorde en empêchant les cellules de l'axe d'adopter une identité de plaque du plancher (L).

Les doubles mutants *ntl;flh* présente un phénotype plus proche de celui des simples mutants *ntl* indiquant que *ntl* est épistatique sur *flh* (L).

Figure adaptée de Halpern et al., 1997

autres territoires axiaux indique que la plaque du plancher se développe mais qu'elle est discontinue au niveau du tronc et de la queue. Le gène *flh* est donc requis spécifiquement pour le développement de la notochorde (Talbot et al., 1995). Bien que les mutants *flh* ne possèdent aucune notochorde, des cellules sauvages sont capables de se différencier en cellules notochordales dans un environnement mutant. Dans l'expérience inverse, des cellules *flh* transplantées dans un environnement sauvage se différencient principalement en cellules musculaires (Halpern et al., 1995). En début de gastrulation, les mutants *flh* initient l'expression des marqueurs notochordaux mais celle-ci n'est pas maintenue et les cellules de l'axe expriment à la place des marqueurs musculaires (Halpern et al., 1995). L'ensemble de ces résultats suggère que Flh est requis de façon cellule autonome afin de promouvoir le développement de la notochorde en empêchant les cellules de l'axe d'adopter une identité musculaire.

Chez le poisson zèbre, un autre gène cible de la voie Nodal, exprimé précocement, dans les précurseurs notochordaux, joue un rôle important dans le développement des structures axiales. Il s'agit du gène *notail* (*ntl*), homologue du gène *brachyury* (*Xbra*) de xénope, qui code pour un facteur de transcription à boîte T (Schulte-Merker et al., 1994b). Sa fonction dans le développement du mésoderme et sa dynamique d'expression sont conservées chez les vertébrés (Conlon et al., 1996; Herrmann et al., 1990; Schulte-Merker et al., 1994a; Schulte-Merker et al., 1992; Smith et al., 1991; Wilkinson et al., 1990). Initialement exprimé en fin de blastula dans les cellules marginales à l'origine du feuillet mésendodermique, son expression se restreint à la notochorde et au mésoderme de la partie postérieure des embryons pendant la gastrulation. Des données de surexpression chez le xénope et d'analyse phénotypique de mutant chez la souris indiquent que ce gène fonctionne dans la spécification précoce du mésoderme postérieur et axial (notochorde) (Cunliffe and Smith, 1992; Herrmann et al., 1990) De plus, chez le poisson zèbre, ce facteur intervient dans la régulation des mouvements de convergence-extension pendant la gastrulation qui sont à l'origine de l'élongation de la partie caudale de l'embryon (Glickman et al., 2003). Chez le poisson zèbre, les mutants *ntl* ne développent ni notochorde, ni mésoderme postérieur (Schulte-Merker et al., 1994b) (Fig.5). Au niveau des structures axiales, la notochorde n'est pas le seul tissu à être affecté, l'hypochorde ne se développe pas et, de façon surprenante, les embryons *ntl* présentent un excès de cellules de la plaque du plancher (Halpern et al., 1997; Rissi et al., 1995). Il a été proposé que l'activité du gène *ntl* au niveau de l'axe serait de promouvoir le développement de la notochorde au détriment de celui de la plaque du plancher.

Bien que les mutants *ntl* et *flh* soient tous les deux dépourvus de notochorde leur phénotype au niveau de l'axe est différent (Fig.5). La plaque du plancher est étendue dans les mutants *ntl* alors qu'elle est interrompue dans les mutants *flh*. De plus, les somites sont fusionnés le long de la ligne médiane et ne forment qu'une seule masse sous le tube neural uniquement dans les mutants *flh*. Chez les mutants *ntl*, des cellules mésenchymateuses sont présentes sous le tube neural ventral, à la place de la notochorde. Ces observations suggèrent que ces facteurs interviennent dans le développement de la notochorde par des mécanismes différents. Afin, d'identifier les relations épistatiques liant ces deux gènes les doubles mutants *ntl;flh* ont été générés (Halpern et al., 1997). Dans ces doubles mutants, la plaque du plancher est élargie et les somites ne sont pas fusionnés, à l'exception de certaines régions postérieures de l'axe. Le phénotype de *ntl* semble prévaloir sur celui de *flh* indiquant que *ntl* est épistatique sur *flh*.

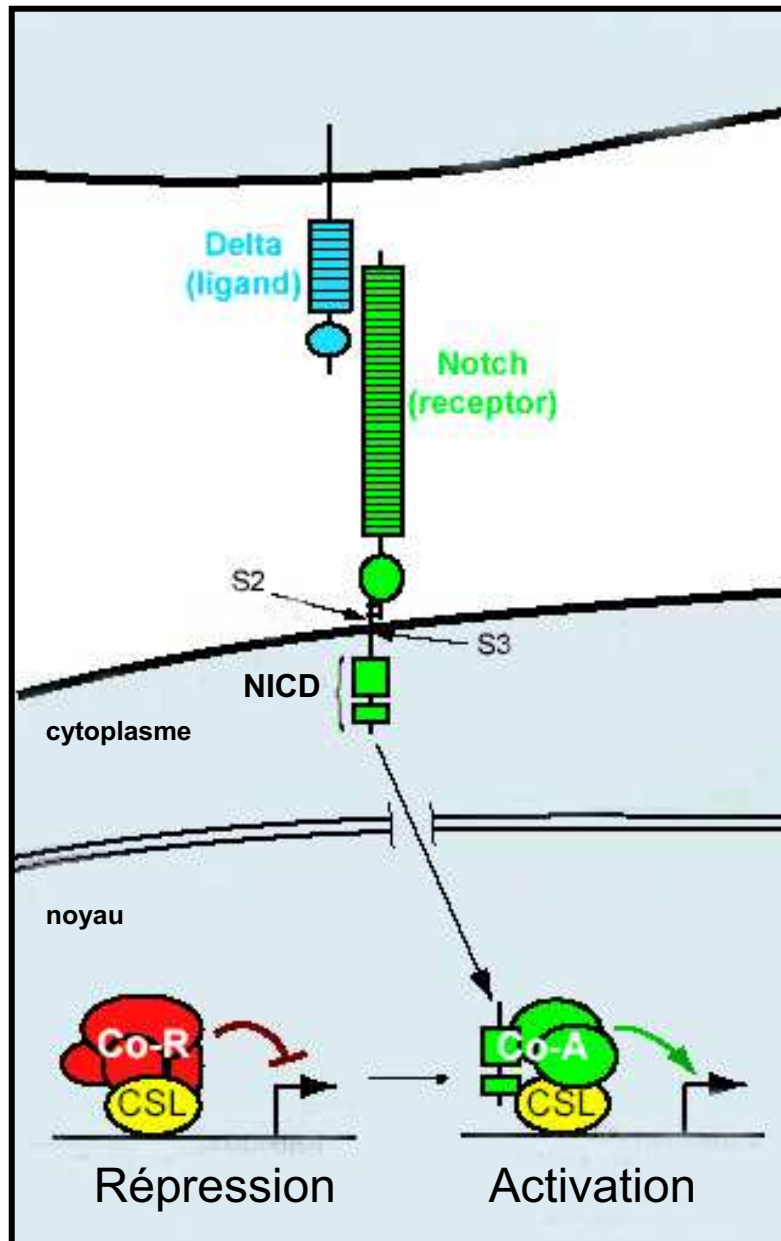
1.6. Détermination de l'identité des précurseurs de l'axe : la voie de signalisation Notch

Chez le poisson zèbre, la voie de signalisation Notch est impliquée dans le développement des structures axiales. Plus précisément, son activité permettrait aux cellules d'adopter une identité particulière (hypochorde, plaque du plancher ou notochorde) au sein d'un ensemble de précurseurs pluripotents.

I.6.a. La voie de signalisation Notch :

Elle a été identifiée génétiquement, il y a près d'un siècle, chez la drosophile grâce au mutant *notch* qui présentait des entailles (« notches ») au niveau des ailes (Ehebauer et al., 2006; Lai, 2004).

Cette voie de signalisation, contrairement à celle des TGF β dont le signal peut diffuser à longue distance, nécessite la mise en contact directe des cellules (Fig. 6). Cette propriété repose sur la nature moléculaire de ses ligands et récepteurs qui sont des protéines transmembranaires de type I. Les ligands pour le récepteur Notch, au nombre de trois, constituent la famille DSL : Delta, Serrate et Lag2. L'interaction de ces ligands avec le récepteur Notch entraîne le clivage enzymatique de la partie intracellulaire de Notch connue sous l'abréviation de NICD (pour Notch IntraCellular Domain). Le NICD ainsi généré est transporté vers le noyau où il s'associe aux facteurs de transcription de la famille CSL (CBF1, Su (H) et Lag1) et active la transcription de gènes cibles.



II-Figure 6: La voie de signalisation Notch

Le ligand Delta et le récepteur Notch sont des protéines transmembranaires. L'interaction entre Delta et Notch induit deux clivages protéolytiques du récepteur Notch (S2 et S3) qui relarguent la partie intracellulaire du récepteur, appelée NICD (Notch IntraCellulaire Domain). Le NICD est transloqué dans le noyau où il s'associe aux facteurs de transcription de la famille CSL et à des co-Activateurs (co-A en vert). En absence de NICD, les CSL sont associés à des co-Répresseurs (co-R en rouge).

Figure adaptée de *Lai et al., 2004*

I.6.b. Rôle dans le développement de l'hypochorde :

L'implication de la voie Notch dans le développement de l'hypochorde vient de l'analyse des embryons mutants *deltaA*. Ces mutants présentent une diminution importante du nombre de cellules de l'hypochorde et, à un moindre niveau, de celles de la plaque du plancher. A l'inverse, les cellules de la notochorde sont en excès chez les mutants *deltaA*. La surexpression de l'ARN *deltaA* conduit au phénotype opposé. Les cellules de la notochorde sont absentes et celles de l'hypochorde sont en excès (Appel et al., 1999). Ces résultats montrent que l'activité Notch favorise le développement des cellules de l'hypochorde au détriment de celles de la notochorde.

Le gène *her4* code pour un facteur de transcription de la famille *hairy-Enhancer of split* (gènes cible de la voie Notch) et marque spécifiquement les précurseurs de l'hypochorde, dès le stade gastrula. Au début de la gastrulation, ces précurseurs co-expriment les gènes *her4* et *ntl*. Ils migrent antérieurement et en s'éloignant du territoire notochordal, les précurseurs de l'hypochorde cessent d'exprimer le gène *ntl* au bénéfice du gène *notch5*. L'expression ectopique de NICD (forme constitutivement active du récepteur Notch) induit l'expression de *her4* et réprime celle de *ntl* de façon cellule autonome (Latimer et al., 2002).

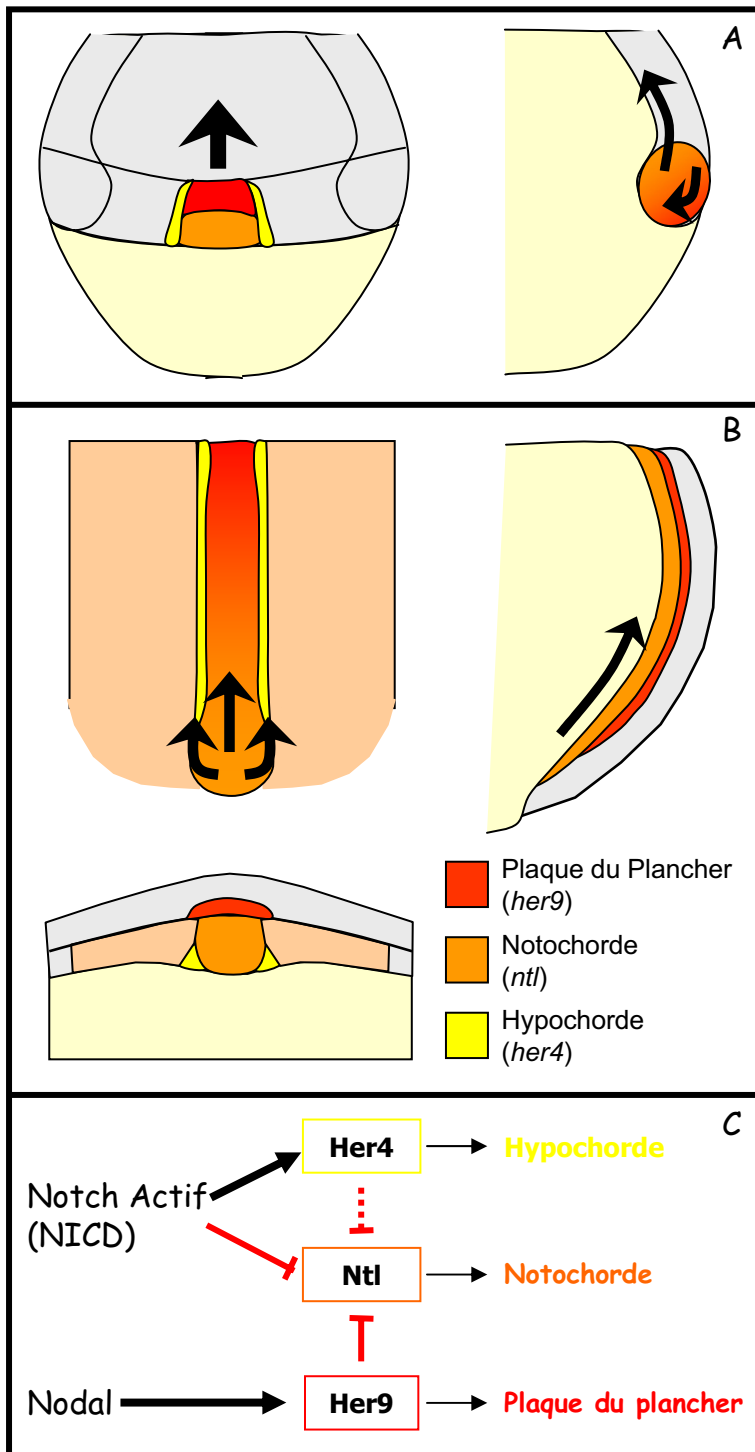
En résumé, la voie Notch, via l'induction de *her4* et la répression de *ntl*, permettrait aux cellules d'adopter une identité hypochordale au détriment d'un devenir notochordal (Fig.7).

I.6.c. Rôle dans le développement de la plaque du plancher :

La voie Notch, indispensable à la spécification de l'hypochorde, semble aussi jouer un rôle dans le développement de la plaque du plancher.

Chez les mutants *deltaA* le nombre de cellules de la plaque du plancher est légèrement diminué (Appel et al., 1999). Plus récemment, l'inactivation de cette voie à différents moments de la gastrulation a montré qu'elle n'est pas requise pour l'induction de la plaque du plancher mais pour son maintien (Latimer and Appel, 2006).

Le gène *her9*, un autre membre de la famille *hairy-Enhancer of split*, est un marqueur des précurseurs de la plaque du plancher et de l'hypochorde. Au stade *shield*, ces précurseurs co-expriment *her9* et *ntl*, puis pendant la gastrulation, seule l'expression de *her9* est maintenue. Le facteur Her9 semble être directement responsable de la répression de l'expression de *ntl*. Ces résultats suggèrent que le facteur Her9 induit une identité de plaque du plancher à partir de cellules destinées à donner de la notochorde. Contrairement à *her4*, l'expression de *her9*



II-Figure 7: La voie de signalisation Notch est impliquée dans la détermination de l'identité des structures de l'axe.

Organisation des précurseurs des structures axiales au début de la gastrulation (A). Développement de ces territoires au cours de la gastrulation (B). Les précurseurs de l'hypochoorde co-expriment initialement les gènes *ntl* et *her4*, puis seule l'expression de *her4* est maintenue pendant de la gastrulation. De même les précurseurs de la plaque du plancher co-expriment les gènes *ntl* et *her9* au début de la gastrulation, puis seule l'expression de *her9* est maintenue.

La voie Notch permet aux cellules de l'axe d'adopter une identité hypochoordale via la répression de l'expression de *ntl* et l'induction de celle de *her4* (C). La détermination de l'identité de la plaque du plancher dépend du facteur Her9 (dont l'expression est induite par la voie Nodal) qui réprime l'expression de *ntl* (C). La voie Notch est requise pour le maintien des précurseurs de la plaque du plancher au cours du développement embryonnaire.

n'est pas régulée par la voie Notch mais semble dépendre de la voie Nodal. En effet, les mutants *cyc (nodal)*, qui ne développent pas de plaque du plancher, sont dépourvus des transcrits *her9*. La surexpression de *her9* chez ces mutants restaure le développement de la plaque du plancher (Latimer et al., 2005). En conclusion, les voies Notch et Nodal participeraient à la spécification des cellules de la plaque du plancher à partir de précurseurs destinés à donner de la notochorde, via l'induction de *her9* et la répression de *ntl* (Fig. 7).

Chez le xénope, un rôle pour la voie Notch dans le développement des structures de l'axe a été rapporté (Lopez et al., 2003). L'utilisation de la voie Notch pour choisir une identité axiale particulière (notochorde, hypochorde, ou plaque du plancher) au sein d'un ensemble de précurseurs pluripotents pourrait donc être un mécanisme conservé chez les vertébrés.

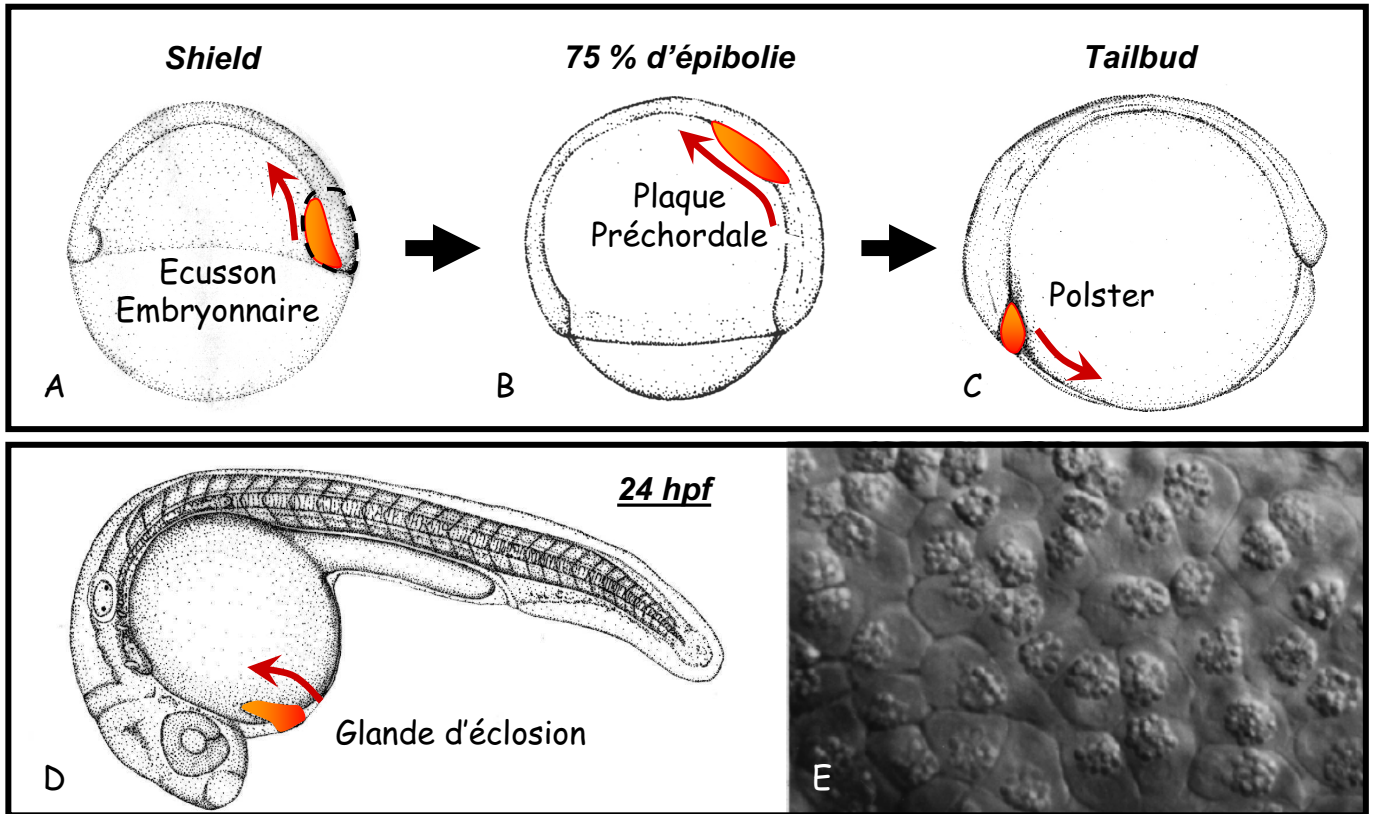
1.7. La morphogenèse et la différenciation des structures axiales

1.7.a. De la plaque préchordale à la glande d'éclosion:

La plaque préchordale est induite dans les cellules de la marge dorsale en réponse à une forte stimulation de la voie Nodal. Chez la plupart des espèces de poissons, dès qu'elle est spécifiée, la plaque préchordale migre antérieurement et se différencie consécutivement pour donner le polster (ou *pillow*), puis la glande d'éclosion (Inohaya et al., 1997; Inohaya et al., 1995; Kimmel et al., 1995) (Fig. 8). Pendant la gastrulation, les premières cellules internalisées, qui forment le mésendoderme axial, migrent activement en direction du pôle animal. A la fin de la gastrulation, ces cellules de la plaque préchordale migrent sous la plaque neurale et s'accumulent juste en amont du cerveau antérieur pour former le polster. Pendant la segmentation, ces cellules passent d'une position antérieure à une position ventrale et forment la glande d'éclosion à la surface de la réserve vitelline. A 30 hpf, les cellules de la glande d'éclosion sont facilement reconnaissables car elles présentent des granules proéminentes chargées en enzymes d'éclosion, telles que la Cathepsine L. Cette accumulation de vésicules de sécrétion constitue l'étape finale de la différenciation de la glande d'éclosion.

- ***Migration antérieure des cellules de la plaque préchordale :***

Dès qu'elles sont internalisées, les cellules de la plaque préchordale migrent antérieurement. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans cette migration. On distingue la voie de signalisation JAK/STAT, la voie PDGF/PI3K et la voie Wnt non-canonique.



II-Figure 8: De la plaque pérchordale à la glande d'éclosion.

Les cellules de la plaque préchordale sont originaires de la partie hypoblastique de l'écusson embryonnaire au stade *shield* (A). Pendant la gastrulation, ces cellules migrent en direction du pôle animal (B). Au début de la somitogenèse, elles migrent sous la plaque neurale et s'accumulent en amont de l'encéphale pour former le polster (C). A 24 hpf, ces cellules ont migrées à la surface de la réserve vitelline pour donner la glande d'éclosion (D). A fort grossissement, les cellules de la glande d'éclosion présentent des granules proéminentes chargées en enzymes (E).

Figure adaptée de *Kimmel et al.*, 1995

Le facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) est requis de façon cellulaire autonome pour la migration antérieure du mésendoderme axial (Yamashita et al., 2002). Avant la gastrulation, l'accumulation de β catenin dans les noyaux de la marge dorsale conduit à l'activation de STAT3. Ce facteur de transcription active l'expression du gène *liv1*, qui code pour un transporteur de zinc, et conduit à l'accumulation nucléaire du facteur de transcription en doigt de zinc Snail1 (Yamashita et al., 2004). Chez de nombreuses espèces, Snail est impliqué dans les processus de transitions Epithélio-Mésenchymateuses (TEM). Néanmoins, sa fonction dans la migration antérieure des cellules de la plaque préchordale reste à élucider.

La voie PDGF/PI3K est aussi requise pour la migration antérieure des cellules du mésendoderme axial mais son activité affecte des aspects différents. Les cellules de la plaque préchordale sont des cellules polarisées qui développent des filopodes orientés dans le sens de leur migration. La voie PDGF serait responsable de la formation de ces filopodes orientés (Montero et al., 2003).

Le rôle de la voie Wnt non-canonique (ou PCP pour Planar Cell Polarity) dans la régulation des mouvements de convergence-extension pendant la gastrulation, a été largement étudié (Myers et al., 2002; Tada et al., 2002; Wallingford et al., 2002). Plus récemment, sa fonction dans la migration antérieure du mésendoderme axial, a pu être élucidée. Pour cela, le mouvement et la morphologie des cellules préchordales des mutants *silberblick/wnt11* ont été suivis par imagerie confocale de haute résolution (Ulrich et al., 2003). En absence de *wnt11*, la migration des cellules préchordales est ralentie et les filopodes de ces cellules ne sont pas orientés. Wnt11 serait nécessaire à l'orientation des processus cellulaires des cellules de la plaque préchordale, facilitant et stabilisant, ainsi, leur mouvement migratoire.

- ***Différenciation de la plaque préchordale :***

Peu d'informations sont disponibles quant aux mécanismes moléculaires responsables de la différenciation de la plaque préchordale. Seules deux molécules ont été mises en évidence, il s'agit de *zKLF4* (*Krüppel-Like Factor-4*) et *xbp1* (*xbox-binding protein-1*). Ces deux gènes sont exprimés dans la plaque préchordale, le polster et la glande d'éclosion au cours du développement embryonnaire (Bennett et al., 2007; Kawahara and Dawid, 2000).

zKLF4 code pour un facteur de transcription en doigt de zinc. Il est requis pour la différenciation précoce de la plaque préchordale en glande d'éclosion (Gardiner et al., 2005). *xbp1* est un gène cible de la voie Nodal, isolé lors d'un crible différentiel utilisant des puces à ADN, et il code pour un facteur de transcription de type bZIP. Son activité est requise dans la

différenciation terminale de la glande d'éclosion caractérisée par la formation de larges vésicules de sécrétion (Bennett et al., 2007).

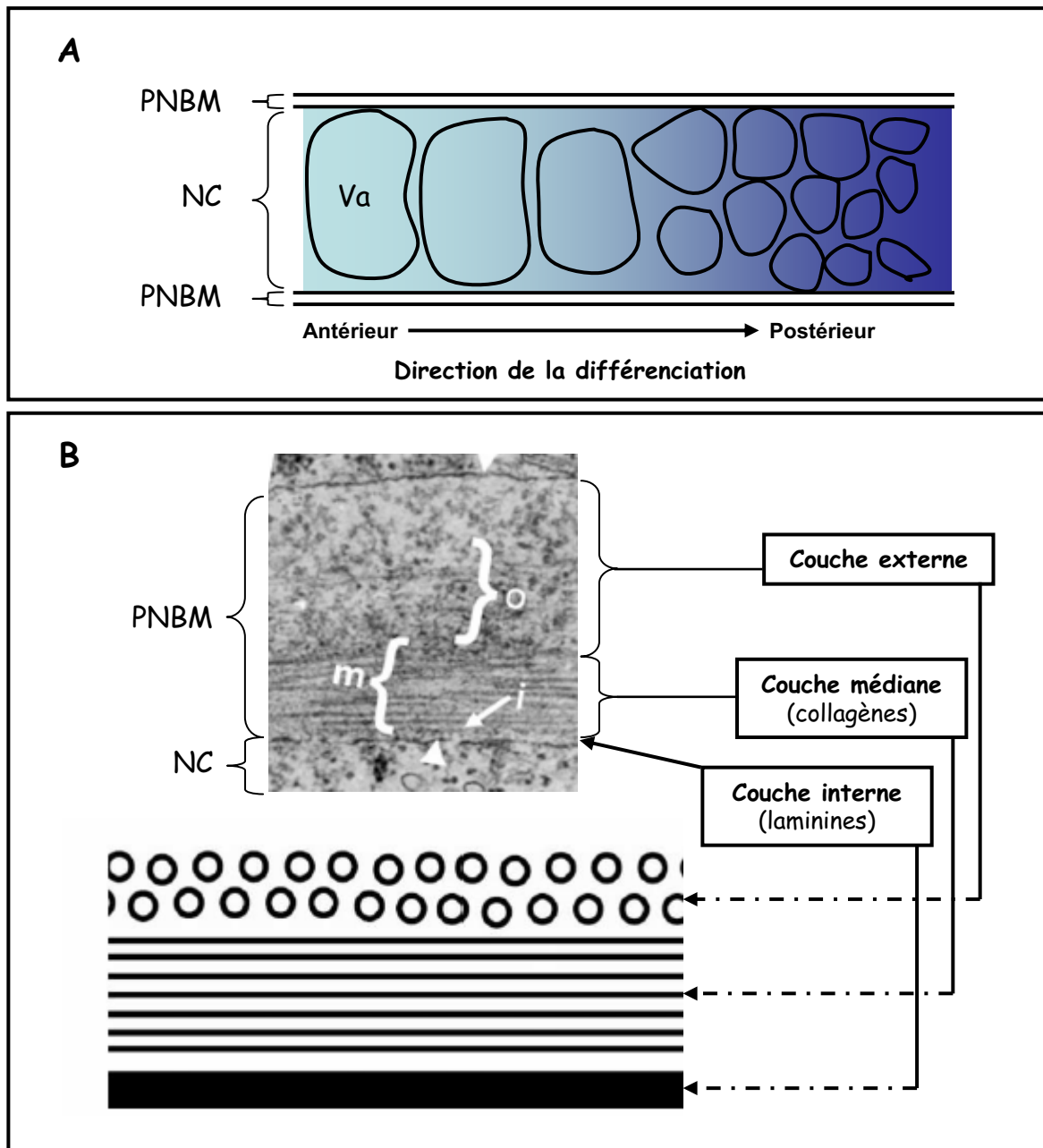
I.7.b. Du chordamésoderme à la notochorde :

Le chordamésoderme est spécifié au niveau de l'écusson embryonnaire par des doses intermédiaires de Nodal. Pendant la gastrulation, ce tissu est le siège de changements cellulaires et moléculaires importants qui vont conduire à la formation d'une notochorde différenciée.

- ***L'élongation de la notochorde le long de l'axe AP :***

Pendant la gastrulation, le mésoderme axial s'allonge le long de l'axe AP. L'internalisation des précurseurs de la notochorde suit celle du mésoderme préchordal, et initialement, ils contribuent à l'élongation de l'axe AP par un mouvement de migration en direction du pôle animal. En milieu de gastrulation, les cellules du chordamésoderme s'engagent dans les mouvements de convergence-extension. Ces mouvements sont caractérisés par deux aspects majeurs qui semblent être interdépendants. Premièrement, les cellules du mésoderme latéral migrent vers la face dorsale et s'accumulent le long de la ligne médiane (c'est la convergence dorsale). Deuxièmement, les cellules du mésoderme axial se polarisent et s'intercalent les unes par rapport aux autres dans le sens médio-latéral (c'est l'extension AP). C'est cette intercalation médio-latérale qui est responsable de l'allongement du chordamésoderme le long de l'axe AP.

Au niveau moléculaire, la voie Wnt/PCP joue un rôle fondamental dans la régulation des mouvements de convergence-extension (Myers et al., 2002; Tada et al., 2002; Wallingford et al., 2002). Chez les embryons mutants pour cette voie, les cellules du mésoderme dorsal, improprement polarisées, ne s'intercalent pas les unes par rapport aux autres. En conséquence, le mésoderme axial ne s'allonge pas le long de l'axe AP (Heisenberg et al., 2000; Jessen et al., 2002; Kilian et al., 2003; Topczewski et al., 2001). En dehors de la voie Wnt/PCP, d'autres molécules contribuent à l'élongation du chordamésoderme. Parmi elles, on distingue les protéines G trimériques $G_{\alpha 12/13}$ et le facteur de transcription Ntl (Glickman et al., 2003; Lin et al., 2005). Contrairement à la voie Wnt/PCP, en absence de *ntl*, seule la convergence dorsale des tissus est bloquée. L'extension AP par intercalation médio-latérale de cellules dépendant du mouvement de convergence, ces résultats suggèrent que d'autres mécanismes cellulaires contribuent à l'allongement du chordamésoderme. Au niveau de l'axe dorsal,



II-Figure 9: Différenciation de la notochorde

A. Représentation schématique d'une notochorde en cours de différenciation.

Les précurseurs notochordaux (ou chordamésoderme) se différencient dans le sens antéro-postérieur. Les cellules se vacuolisent et forment une seule couche cellulaire. L'expression des gènes spécifiques du chordamésoderme disparaît progressivement (gradient bleu). Une membrane basale péri-notochordale se forme autour des cellules. NC: notochorde, PNBM: membrane basale péri-notochordale, Va: Vacuole.

B. Structure de la membrane basale péri-notochordale (PNBM).

Une représentation schématique des couches composant la PNBM est montrée sous une photo d'une coupe sagittale de cette région réalisée au microscope électronique à transmission. La couche interne de la PNBM, essentiellement composée de laminines, est entourée de deux couches fibreuses orientées perpendiculairement l'une par rapport à l'autre. Les fibres de la couche médiane sont parallèles à la surface des cellules de la notochorde tandis que celles de la couche externe sont orthogonales.

Figure adaptée de *Scott and Stemple, 2005* et *Stemple, 2005*

l'analyse par imagerie confocale a montré que les cellules se divisent préférentiellement selon l'axe AP. Cette orientation AP des divisions cellulaires, qui dépend à nouveau de voie Wnt/PCP, participe à l'élongation de l'axe dorsal (Gong et al., 2004).

En résumé, bien que la voie Wnt/PCP joue un rôle majeur dans la régulation des mouvements cellulaires pendant la gastrulation, l'allongement et la morphogenèse du chordamésoderme met en jeu des mécanismes cellulaires et moléculaires complexes et variés.

- ***Différenciation structurale de la notochorde :***

Pendant la segmentation, les cellules du chordamésoderme vont se différencier et acquérir toutes les caractéristiques qui permettront à la notochorde mature d'assurer sa fonction de soutien. En effet, les cellules se vacuolisent et s'entourent d'une épaisse membrane, la membrane basale péri-notochordale (Fig. 9). A l'intérieur de la vacuole, la pression hydrostatique exerce une poussée sur la membrane péri-notochordale et c'est cette pression qui permet à la notochorde d'acquérir sa rigidité. Dans le même temps, de nombreux marqueurs spécifiques du chordamésoderme tels que les transcrits *flh*, *ntl*, *shh*, *ehh* et *col2a1* disparaissent des cellules notochordales en cours de différenciation. Cette disparition se fait dans le sens antéro-postérieur et reflète la direction de différenciation de la notochorde. La transition du chordamésoderme vers une notochorde différenciée nécessite de nombreux locis qui ont été mis en évidence grâce à un crible génétique (Odenthal et al., 1996; Stemple et al., 1996). Parmi eux, deux familles de gènes ont été identifiées et leurs fonctions affectent les aspects structuraux de la notochorde. Il s'agit des gènes codant pour les laminines et pour les coatomers (pour revues : Scott and Stemple, 2005; Stemple, 2005).

Les laminines, composées de trois chaînes (α , β , et γ), sont des constituants abondants des membranes basales. Au niveau de la notochorde, on les retrouve dans la couche interne de la membrane basale péri-notochordale. Lorsque les gènes de cette famille sont mutés, les cellules de la notochorde continuent d'exprimer les marqueurs du chordamésoderme, elles ne se vacuolisent pas et la membrane basale péri-notochordale est absente. Chez le poisson zèbre, les laminines sont donc indispensables à la différenciation de la notochorde (Parsons et al., 2002; Pollard et al., 2006).

Les coatomers sont des sous-unités constitutives des vésicules COP I qui jouent un rôle prépondérant dans l'activité de sécrétion des cellules. Chez le poisson zèbre, en leur absence, les cellules de notochorde ne se vacuolisent pas, l'expression des marqueurs du chordamésoderme persiste et le développement de la membrane basale péri-notochordale est violemment affecté. Ces protéines, tout comme les laminines, sont primordiales pour

l'acquisition des caractéristiques structurales de la notochorde. De plus, les coatomers sont requis de façon cellule autonome dans la différenciation de la notochorde, suggérant qu'ils seraient responsables de la sécrétion de la membrane basale péri-notochordale par les cellules de la notochorde (Coutinho et al., 2004).

I.7.c. Différenciation de la plaque du plancher :

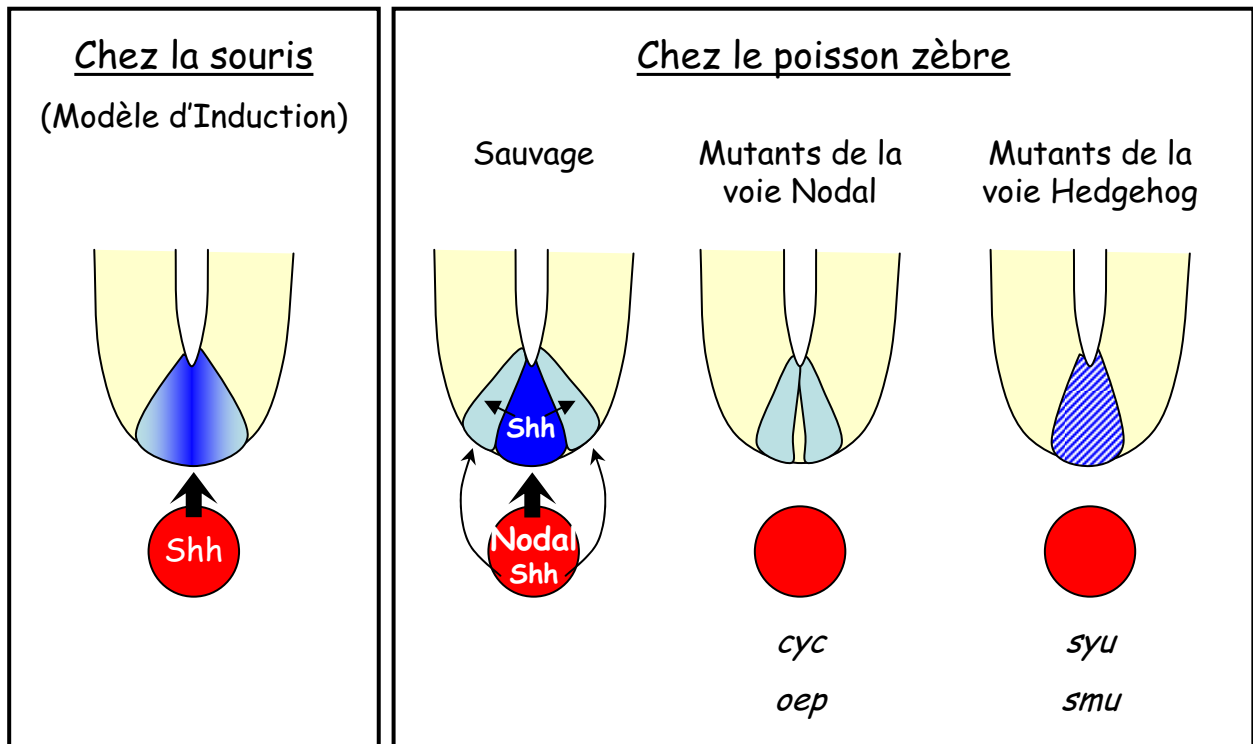
La plupart des études réalisées sur la plaque du plancher concerne son origine et sa spécification ou sa fonction de centre organisateur pour les tissus neuraux environnants (pour revues : Placzek and Briscoe, 2005; Strahle et al., 2004). En revanche, sa différenciation a été peu documentée.

Chez le poisson zèbre, la plaque du plancher occupe trois à quatre cellules de large dans le tube neural ventral et peut être subdivisée en deux parties : la plaque du plancher médiane (MFP) et la plaque du plancher latérale (LFP). L'analyse comparative de marqueurs de ces deux structures suggère qu'elles se développent à partir de mécanismes différents (Odenthal et al., 2000).

Alors que la spécification de la MFP, tout comme celle de la notochorde, dépend de l'activité précoce de la voie Nodal (Feldman et al., 1998; Rebagliati et al., 1998b; Sampath et al., 1998; Zhang et al., 1998), la différenciation de la LFP requiert la voie Hedgehog. En effet, les mutants *sonic-you/syu*, pour lesquels le gène *shh* est muté, ne différencient aucune LFP (Schauerte et al., 1998). Le même phénotype est observé dans les mutants *smoothened/smu*, où la transduction du signal Shh est bloquée (Varga et al. 2001). Par ailleurs, bien que la MFP soit correctement spécifiée chez les mutants *syu*, l'expression des marqueurs de cette structure devient discontinue à des stades plus tardifs (36 hpf) (Albert et al., 2003). Ces résultats indiquent que chez le poisson zèbre, la voie Hedgehog, est indispensable à la différenciation de la LFP et qu'elle participe au maintien de la MFP.

Chez les mutants de la voie Nodal qui ne développent aucune MFP, la LFP est néanmoins présente indiquant que sa différenciation ne nécessite pas la présence de la MFP. Chez le poisson zèbre, Shh est sécrété par la MFP et la notochorde (Krauss et al., 1993). La présence d'une LFP malgré l'absence d'une MFP, chez les mutants de la voie Nodal, pourrait être le résultat de l'activité de Shh sécrété à partir de la notochorde.

En résumé, la différenciation de la LFP requiert la voie de signalisation Hedgehog et se développe indépendamment de la présence de la MFP. Récemment, la voie Notch a aussi été



II-Figure 10: Génétique de la différenciation de la plaque du plancher chez les vertébrés.

A. Chez la souris

Chez la souris, la molécule Sonic Hedgehog (Shh) sécrétée par la notochorde (en rouge) induirait la plaque du plancher dans le tube neural sus-jacent (en dégradé de bleu).

B. Chez le poisson zèbre

Chez le poisson zèbre, la plaque du plancher est constituée de la plaque du plancher médiane (MFP: en bleu foncé) et de la plaque du plancher latérale (LFP: en bleu clair). Nodal, exprimé dans la ligne médiane pendant la gastrulation, est responsable de la différenciation de la MFP. Les mutants *cyclops/cyc* (ligand de la voie Nodal) et *one eyed pinhead/oep* (corecepteur de la voie Nodal) ne développent pas de MFP alors qu'une notochorde sécrétant Shh est présente. Shh marque à la fois la notochorde et la MFP et est requis pour la différenciation de la LFP et le maintien de la MFP. Chez les mutants *sonic you/syu* (shh, ligand de la voie Hedgehog) et *smoothened/smu* (protéine transmembranaire essentielle à la transduction du signal Hedgehog), la LFP est absente, et la MFP est discontinuée tardivement (36hpf).

Figure adaptée de *Strähle et al. 2004*

impliquée dans le développement de la LFP. En effet, les mutants déficients pour cette voie de signalisation ne développent pas de LFP (Schafer et al., 2007).

I.7.d. Différenciation de l'hypochorde :

En ce qui concerne la différenciation de l'hypochorde, les seules informations disponibles reposent sur son analyse histologique au cours du développement embryonnaire (Eriksson and Lofberg, 2000). L'hypochorde joue un rôle fondamental dans la différenciation de l'aorte dorsal et son développement se fait en étroite association avec celui des angioblastes à l'origine de l'aorte dorsale (Cleaver and Krieg, 1998; Eriksson and Lofberg, 2000).

L'hypochorde est une structure cylindrique d'une cellule de diamètre qui s'étend le long de l'axe AP, entre la notochorde et l'aorte dorsale. Cette structure ne devient reconnaissable qu'assez tardivement, pendant la somitogenèse au stade 9 somites. A ce stade, elle est constituée d'une seule cellule de large occupant la partie médiane de l'endoderme. Bien que les précurseurs de l'hypochorde soient intégrés à l'endoderme, ces cellules en sont clairement distinguables. Elles sont plus larges et présentent un cytoplasme plus clair au microscope photonique. De plus, leur partie dorsale est partiellement recouverte d'une lame basale, contrairement aux cellules endodermiques voisines. A 15-16 somites, ces cellules se détachent de l'endoderme et l'hypochorde, en tant que structure individualisée, devient apparente et s'entoure d'une lame basale. L'analyse de son ultra-structure montre un cytoplasme riche en réticulums endoplasmiques granuleux, en appareils de golgi et en vésicules membranaires indiquant une forte activité de synthèse et de sécrétion protéique. L'hypochorde persiste jusqu'à 3 jours de développement puis disparaît progressivement de la partie antérieure vers la partie postérieure de l'embryon, probablement par apoptose. Chez le xénope et la salamandre, la différenciation de l'hypochorde au cours du développement embryonnaire est semblable suggérant des mécanismes de développement conservés (Cleaver et al., 2000; Lofberg and Collazo, 1997).

II. La famille de facteurs de transcription Fox

II.1. Identification de la famille de facteurs de transcription à domaine fork head :

La famille de gènes *Fork head box (Fox)* est une large famille de gènes codant pour des facteurs de transcription. Le premier membre de cette famille, le gène *forkhead/fkh*, a été décrit chez la drosophile *D. melanogaster* et doit son nom au phénotype résultant de sa mutation, caractérisé par une transformation homéotique des segments ectodermiques antérieurs et postérieurs, à l'origine du stomodeum et proctodeum respectivement, en têtes ectopiques (Weigel et al., 1989). L'analyse initiale de sa séquence protéique ne révéla la présence d'aucun domaine protéique connu. A la même époque, une famille de facteurs de transcription fut isolée chez le rat à partir d'extraits nucléaires de foie : la famille Hepatocyte Nuclear Factor 3 (HNF3) et permit l'identification d'un nouveau domaine de liaison à l'ADN de 165 acides aminés (Costa et al., 1989; Lai et al., 1990). L'analyse comparative des séquences protéiques des membres de cette famille avec celle de la protéine Fkh révéla la présence, chez la drosophile, d'une séquence de 110 acides aminés partageant 92 % d'homologie avec le domaine de liaison à l'ADN de HNF3 (Weigel and Jackle, 1990). Ce domaine fut appelé, le domaine Fork head.

II.2. Classification et nomenclature des membres de la famille Fox :

Depuis l'identification du motif Fork head, plusieurs centaines de membres appartenant à la famille Fox ont été mis en évidence. En 2000, par souci d'homogénéité, la nomenclature de l'ensemble des facteurs de transcription contenant un domaine Fork head, parmi lesquels on distingue la famille HNF3, fut standardisée et le nom générique de Fox, pour Forkhead Box, fut adopté (Kaestner et al., 2000 et www.biology.pomona.edu/fox.html). Les membres de cette famille ont été classés en fonction d'homologie de séquences et 17 sous-groupes ont ainsi pu être définis. Chaque sous-groupe est représenté par une lettre accolée au nom Fox, définissant les familles FoxA à FoxQ. Chaque membre d'un sous groupe est représenté par un chiffre accolé au nom du sous-groupe.

Dans le reste de cette introduction, je me concentrerai uniquement sur le sous-groupe FoxA.

II.3. Le domaine Fork head :

La co-cristallisation du complexe ADN/domaine Fkh a permis de résoudre la structure tertiaire du domaine Fkh (Clark et al., 1993) (Fig. 11 A). Ce dernier, composé de trois hélices

α (H1, H2 et H3), trois feuillets β (S1 et S2) et de deux larges boucles (W1 et W2), se lie à l'ADN sous la forme de monomère. Sa partie N terminale, très compacte, est riche en hélices α et présente une structure de type « Helix-Turn-Helix » permettant de présenter l'hélice H3 au grand sillon de l'ADN. Sa partie C terminale est riche en feuillets β et se termine par un domaine « coil » libre, capable d'établir des contacts avec l'ADN. L'ensemble forme un domaine en forme de papillon appelé “winged helix” présentant des similarités remarquables avec le domaine globulaire de l'histone de liaison H1 (aussi connu sous le nom d'histone H5) qui est impliqué dans la condensation de la chromatine. Ces similarités suggèrent que le domaine Fkh joue un rôle dans le remodelage de la chromatine.

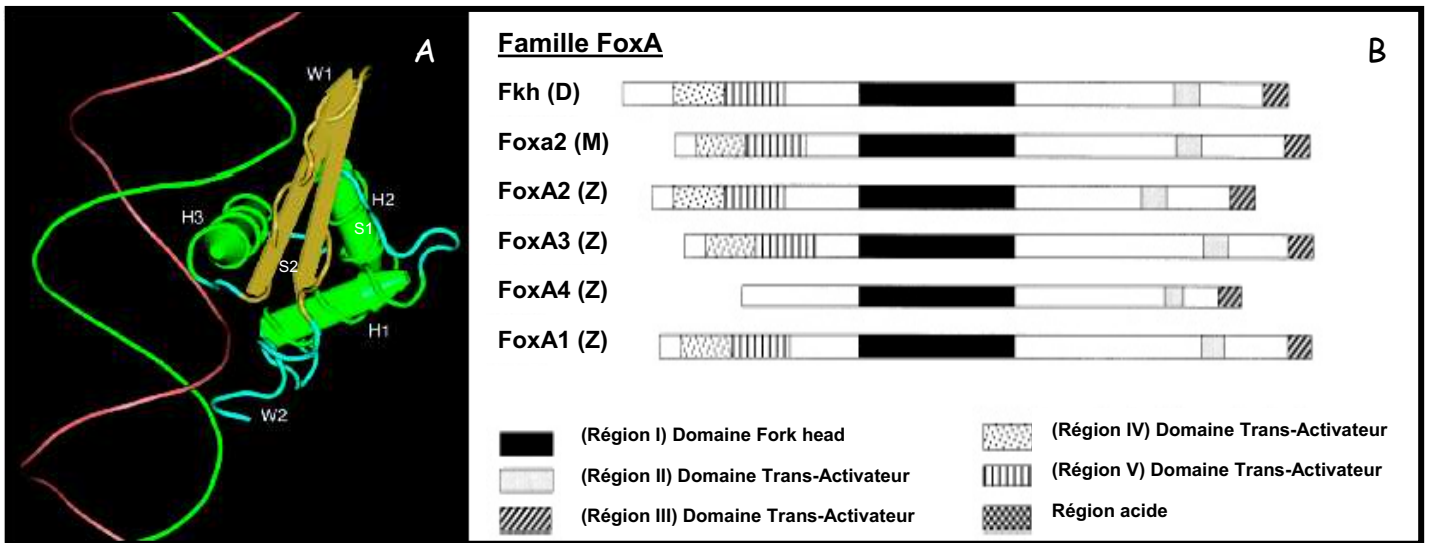
II.4. Les autres domaines protéiques conservés au sein de la famille FoxA :

En dehors du domaine Fkh (région I), les protéines de la famille FoxA possèdent 4 régions conservées (régions II à IV) chez les vertébrés (Pani et al., 1992; Qian and Costa, 1995) (Fig. 11 B). Les régions II et III sont situées à l'extrémité C terminale de la protéine et constituent un domaine trans-activateur (TA) de transcription capable de fonctionner indépendamment de sa position au sein de la protéine. Ce domaine a aussi la capacité d'interagir avec les histones H3 et H4 des nucléosomes et participerait donc au remodelage de la chromatine. Les deux dernières régions, IV et V, occupent la partie N terminale de la protéine et possèdent des propriétés trans-activatrices dépendantes de la présence du premier domaine. Enfin, le motif Fork head est flanqué de deux régions conservées formant un signal de localisation nucléaire (NLS) bipartite.

II.5. Activité des Facteurs de Transcription du sous-groupe FoxA :

L'identification de domaines TA conservés ainsi que l'analyse de l'activité de la protéine FoxA2, fusionnée à des domaines activateurs (VP16) ou répresseur (EnR) de transcription, suggèrent que les facteurs de la sous-famille FoxA fonctionnent comme des activateurs de transcription (Pani et al., 1992; Qian and Costa, 1995; Suri et al., 2004). Cependant, une étude récente, réalisée chez le xénope, a montré qu'un autre membre de cette sous-famille, le facteur FoxA4, pouvait fonctionner comme répresseur de transcription (Martynova et al., 2004).

La synthèse d'un système de reconstitution de la chromatine *in vitro*, par Cirillo et ces collègues à la fin des années 90, a permis de tester le rôle du facteur Foxa2 dans le remodelage de la chromatine. Ils ont démontré que le facteur Foxa2 est capable de se lier à la chromatine condensée au niveau du même site de liaison que celui de l'histone H1. Cette liaison déplace l'histone H1 de la chromatine, produisant une décondensation locale de la



II-Figure 11: Structure des protéines de la famille FoxA

A. Structure tridimensionnel du complexe ADN/domaine Fork head

Abréviations: H1,H2 et H3: Hélices α 1,2 et 3 (vert) ; W1 et W2: Bloucles 1 et 2; S1 et S2: feuillets β 1 et 2 (marron)

B. Structure des protéines du sous-groupe FoxA

En dehors du domaine Fork head (région I), les membres de la famille FoxA possèdent 4 régions transactivatrices (régions II à V). Seul la protéine FoxA4 ne possède pas les domaines IV et V situé dans la région N terminale. Abréviations: D: drosophile, M:souris, Z: poisson zèbre.

Figure adaptée de *Friedman et Kaestner, 2006* et *Odenthal et Nusslein Volhard, 1998*

chromatine. Cette ouverture de la chromatine résulte d'une interaction entre la partie C terminale de Foxa2 (contenant les régions conservées II et III) et les histones H3 et H4, qui produit une déstabilisation des contacts inter-nucléosomes. Un nouveau mode de fonctionnement des facteurs de transcription de la famille FoxA a ainsi été mis en évidence. Ils n'agiraient pas directement sur l'activité transcriptionnelle mais en amont, sur le remodelage de la chromatine afin de la rendre accessible à la machinerie transcriptionnelle. Les facteurs FoxA ont ainsi été qualifiés de facteurs de transcription « pionniers » (Cirillo et al., 2002; Cirillo et al., 1998).

Ces observations peuvent expliquer pourquoi, selon les cas, ces protéines sont capables de réguler l'activité des gènes positivement ou négativement.

II.6. Conservation des domaines d'expression des gènes de la famille FoxA chez les vertébrés :

En dehors des homologies de séquences observées au niveau protéique, les domaines d'expression des gènes de la famille *foxA* sont largement conservés chez les vertébrés.

Chez la souris, la famille *foxa*, initialement appelée *HNF3*, est composée de trois membres : *foxa1/HNF3 α* , *foxa2/HNF3 β* et *foxa3/HNF3 γ* (Ang et al., 1993; Monaghan et al., 1993). Le gène *foxa2* est le premier à être exprimé, suivi de *foxa1*. Ces deux gènes sont partiellement co-exprimés dans la partie antérieure de la ligne primitive, le nœud, et les structures qui en dérivent : la notochorde, la plaque du plancher et l'endoderme définitif. De plus, les transcrits *foxa2* sont présents dans l'endoderme viscéral, tissu extra embryonnaire impliqué dans la morphogenèse de la ligne primitive. Le gène *foxa3*, membre le plus divergeant de cette sous-famille, débute son expression tardivement et n'est exprimé que dans l'endoderme.

Chez le xénope, on distingue trois membres : *foxA1*, *foxA2* et *foxA4* (aussi connu sous le nom de *pintallavis*) (Bolce et al., 1993; Dirksen and Jamrich, 1992; Knochel et al., 1992; Lef et al., 1996; Ruiz i Altaba et al., 1993; Ruiz i Altaba and Jessell, 1992). Aucun homologue du gène *foxa3* n'est présent chez le xénope. En revanche, le gène *foxA4* ne possède pas d'homologue murin. La combinaison des patrons d'expression des gènes *foxA2* et *foxA4* récapitule celui du gène *foxa2* chez la souris (Ruiz i Altaba et al., 1993). *foxA4* est le premier membre de cette famille à être détecté. Il débute son expression à la blastula dans la zone marginale dorsale à partir de laquelle se forme la lèvre blastoporale. Son expression se poursuit pendant la gastrulation dans la notochorde jusqu'en début de neurulation, stade auquel *foxA4* n'est plus exprimé. Au même moment, le gène *foxA2* est largement présent dans la plaque du plancher et l'endoderme, mais son expression est absente de la notochorde. Enfin, le gène *foxA1* est

exprimé dans la notochorde transitoirement puis de façon plus stable dans la plaque du plancher, l'hypochorde et l'endoderme.

Chez le poulet, seule l'expression du gène *foxA2* a été rapportée (Ruiz i Altaba et al., 1995). Il est exprimé précocement dans le nœud de Hensen situé dans la partie antérieure de la ligne primitive puis son expression apparaît dans la notochorde et les cellules de la plaque du plancher.

En résumé, les gènes appartenant à la famille *foxA* sont exprimés dans l'endoderme et les structures axiales qui dérivent du nœud chez la souris et le poulet et de la lèvre blastoporale dorsale chez le xénope. La conservation de ces domaines d'expression suggère qu'ils puissent jouer un rôle important dans le développement de l'endoderme et des structures axiales.

II.7. Régulation de l'expression des gènes de la famille FoxA chez les vertébrés :

Chez le xénope, les gènes *foxA1* et *foxA4* sont induits dans des calottes animales traités avec l'Activine et cela en présence d'un inhibiteur de synthèse protéique, la cycloheximide (Knochel et al., 1992; Ruiz i Altaba and Jessell, 1992). Ces résultats indiquent que *foxA1* et *foxA4* sont des gènes cibles directement activé par la voie Nodal/Activine. Des séquences régulatrices répondant à l'Activine ont été identifiées en amont du promoteur de *foxA4* ainsi que dans la région correspondant au premier intron de ce gène, et sont responsables de l'activation de son expression (Howell and Hill, 1997; Kaufmann et al., 1996). En revanche, l'expression de *foxA4* est réprimée par la voie BMP, via la liaison du répresseur de transcription Xvent1 dans la région située en amont du promoteur (Kaufmann et al., 1996, Friedle, 1998 #208).

Chez la souris, l'expression de *foxA2* dans la région antérieure de la ligne primitive semble dépendre du facteur de transcription FoxH1 qui est un cofacteur des Smad impliqué dans la transduction du signal Nodal (Hoodless et al., 2001). L'analyse de la région promotrice de *foxA2* a permis d'identifier une séquence régulatrice responsable de son expression dans le nœud et la notochorde. Cependant cette séquence ne possède aucun site de liaison pour des facteurs de transcription répondant à la voie Nodal (Nishizaki et al., 2001) mais son activité semble dépendre des facteurs de transcription de la famille Tead (Sawada et al., 2005).

Chez le poisson zèbre, les mutants de la voie Nodal (p. ex. *oep*) sont dépourvus de l'expression de *foxA2* (Gritsman et al., 1999) suggérant que *foxA2* est un gène cible de la voie Nodal. Récemment, un crible utilisant des puces à ADN et visant à identifier de nouvelles

cibles de la voie Nodal, a confirmé cette hypothèse et a permis de mettre en évidence le gène *foxA3* (Bennett et al., 2007).

En résumé, l'induction de l'expression des gènes de la famille FoxA semble dépendre de la voie Nodal chez les vertébrés.

II.8. Fonctions connues des membres de la famille FoxA chez les vertébrés :

Afin d'étudier le rôle de la famille *foxa*, des mutations dirigées contre les gènes *foxa1*, *foxa2* et *foxa3* ont été générées par recombinaisons homologues chez la souris (Ang and Rossant, 1994; Kaestner et al., 1998; Kaestner et al., 1999; Shih et al., 1999; Weinstein et al., 1994). L'absence des gènes *foxa1* et *foxa3* n'affecte pas le développement des embryons, mais celle du gène *foxa2* conduit à une létalité embryonnaire. Chez les mutants *foxa2*, la morphogénèse de la ligne primitive est fortement perturbée et les embryons ne développent aucune structure axiale (nœud, notochorde et plaque du plancher). Chez ces embryons, l'absence de structures axiales perturbe le développement des tissus adjacents tels que les somites, qui fusionnent le long de la ligne médiane, et le tube neural, dont la régionalisation dorso-ventral est fortement perturbée. De plus, bien que l'endoderme définitif soit présent et différencié, sa morphogénèse est fortement affectée.

Chez le xénope, jusqu'à présent aucune expérience d'inactivation des protéines de la famille FoxA n'a été réalisée et les seules informations disponibles sur leur rôle dans le développement embryonnaire reposent sur des expériences de gain de fonction. L'ensemble des études menées suggère un rôle important, et non redondant, des facteurs FoxA2 et FoxA4 dans le développement des structures de la ligne médiane. La simple surexpression de *foxA4* n'affecte pas le développement de la notochorde mais induit la formation de cellules de la plaque du plancher ectopiques dans le cerveau moyen (Ruiz i Altaba et al., 1993). De plus, sa surexpression en combinaison avec *Xbra* (homologue du gène *ntl* de poisson zèbre), permet la formation de notochorde dans les axes secondaires induits par *Xbra* (O'Reilly et al., 1995). De façon surprenante, l'expression ectopique de *foxA2* a des effets opposés à ceux de *foxA4*. Tandis que *foxA4* semble promouvoir le développement du mésoderme dorsal, l'expression ectopique de *foxA2* inhibe sa formation (Suri et al., 2004). La surexpression de *foxA1* perturbe le développement de l'axe dorsal postérieur (Knochel et al., 1992).

Bien que leur fonction puisse diverger, les membres de la famille FoxA sont impliqués dans le développement des structures axiales chez la souris et le xénope.

II.9. La famille FoxA chez le poisson zèbre:

II.9.a. Notions générales :

Dans les années 1990, 4 gènes appartenant à la famille FoxA, ont été isolés chez le poisson zèbre: *foxA1*, *foxA2*, *foxA3* et *foxA4* (Dirksen and Jamrich, 1995; Odenthal and Nusslein-Volhard, 1998; Strahle et al., 1993). Comme chez les autres espèces de vertébrés, chez le poisson zèbre, les membres de cette famille partagent des similarités à la fois dans leur séquence protéique et leurs territoires d'expression.

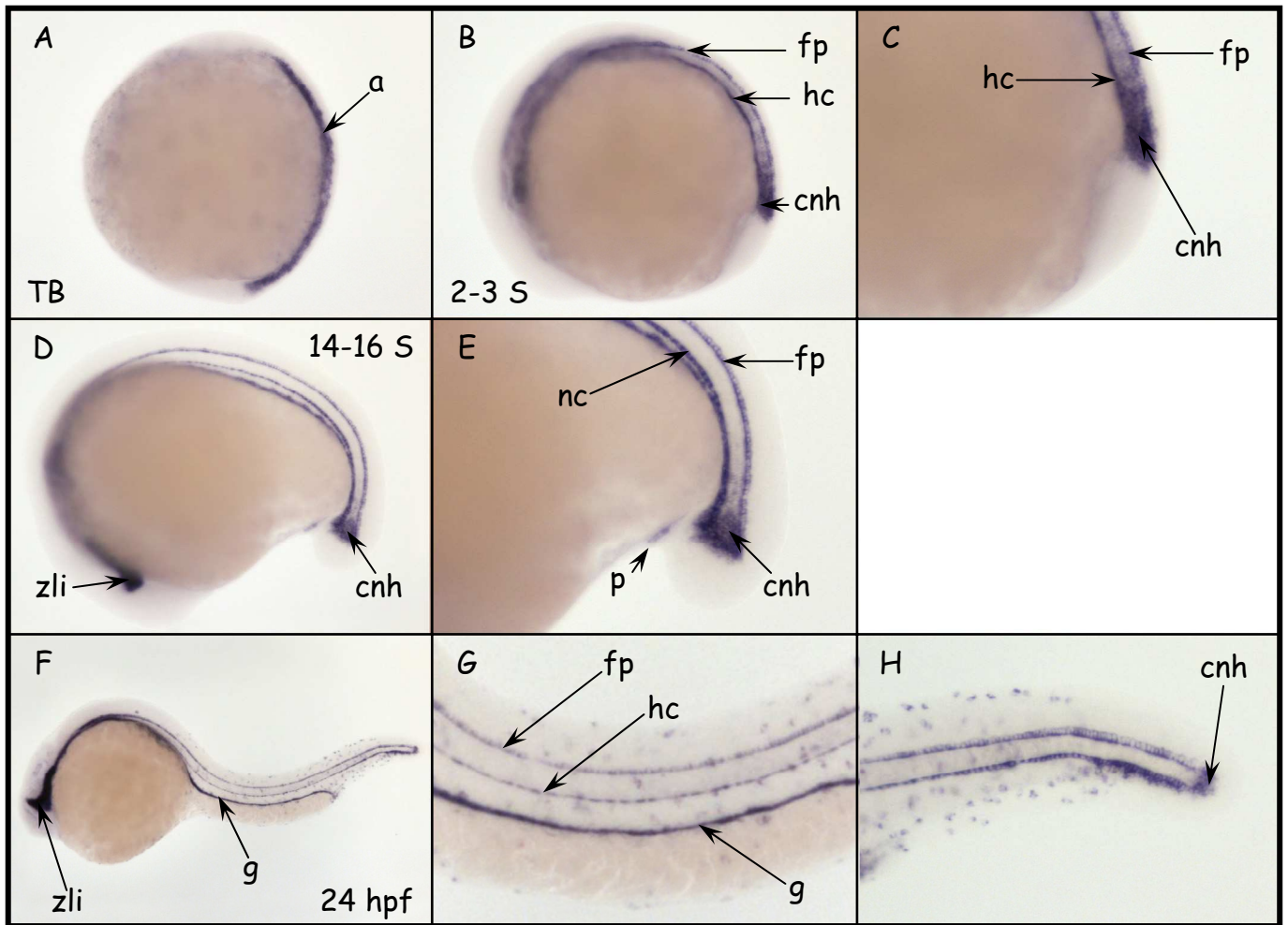
Au niveau protéique, les facteurs FoxA sont caractérisés par la présence de résidus conservés à des positions spécifiques à l'intérieur du domaine Fork head. Toutes les protéines de cette famille possèdent les 4 régions trans-activatrices conservées (II à V) décrites précédemment, à l'exception de FoxA4. Ce dernier ne présente que les régions II et III, situées à son extrémité C terminale. (Fig. 11 B)

Au niveau de leurs territoires d'expression, les gènes de la famille *foxA* sont exprimés dans l'endoderme et les structures axiales qui dérivent de l'écusson embryonnaire : la plaque préchordale, la notochorde, la plaque du plancher et l'hypochorde. Aucun membre de cette famille ne présente d'expression maternelle.

II.9.b. Expression des gènes de la famille *foxA* au cours du développement embryonnaire :

Le gène *foxA1* débute son expression tardivement, en fin de gastrulation, dans les précurseurs de la notochorde. Après la gastrulation, cette expression n'est pas maintenue et les transcrits *foxA1* apparaissent dans la plaque du plancher et l'hypochorde où ils persistent jusqu'à 24 hpf (Fig.12).

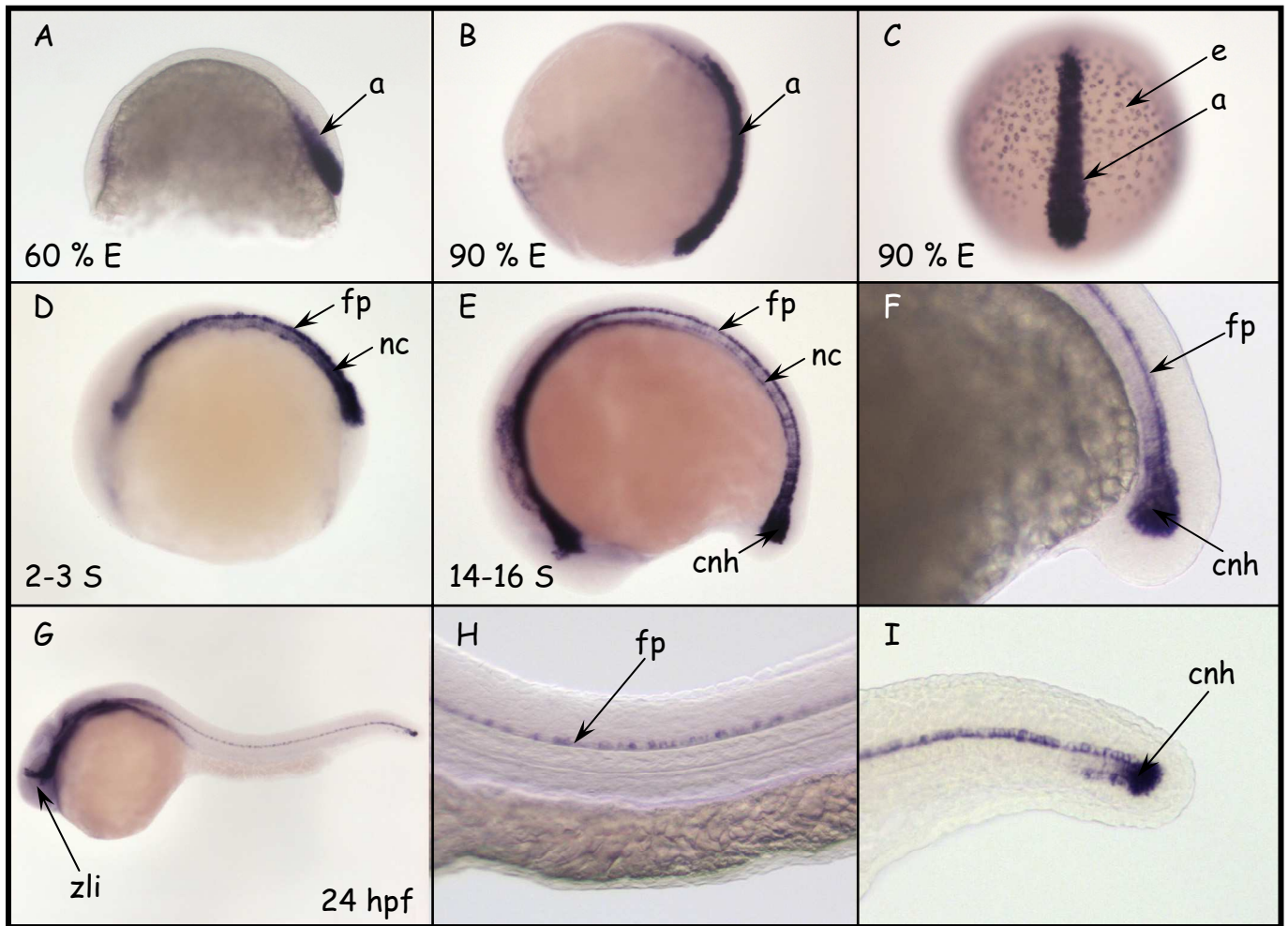
L'expression du gène *foxA2* apparaît en début de gastrulation, tandis que celle de *foxA3* débute dès le stade blastula à la marge dorsale, de façon similaire à l'expression du gène *gooseoid* (Seiliez et al., 2006). Au stade *shield*, les transcrits des deux gènes s'accumulent dans les cellules hypoblastiques de l'écusson embryonnaire à l'origine de la plaque préchordale. En plus de ce domaine, *foxA3* est présent dans la couche vitelline syncytiale (YSL) (Fig. 13 et 14). Pendant la gastrulation, l'expression de ces deux gènes s'étend le long de la ligne médiane. Bien qu'ils soient tous les deux exprimés dans l'axe, leurs territoires d'expression ne sont pas identiques le long de l'axe AP. Les transcrits *foxA3* sont fortement présents dans la plaque préchordale et diminuent progressivement en direction de la marge. A



II-Figure 12 : Patron d'expression de *foxA1*

Analyse du patron d'expression de *foxA1* pendant la somitogenèse (A-E) et à 24 hpf (G-I). Les stades analysés sont indiqués dans le coin des images. Abréviations: a:axe, fp: plaque du plancher, hc:hypochorde, cnh:charnière chordo-neurale, zli: zona limitans intrathalamica, p: proctodeum, g: gut, E: épibolie, S:somites

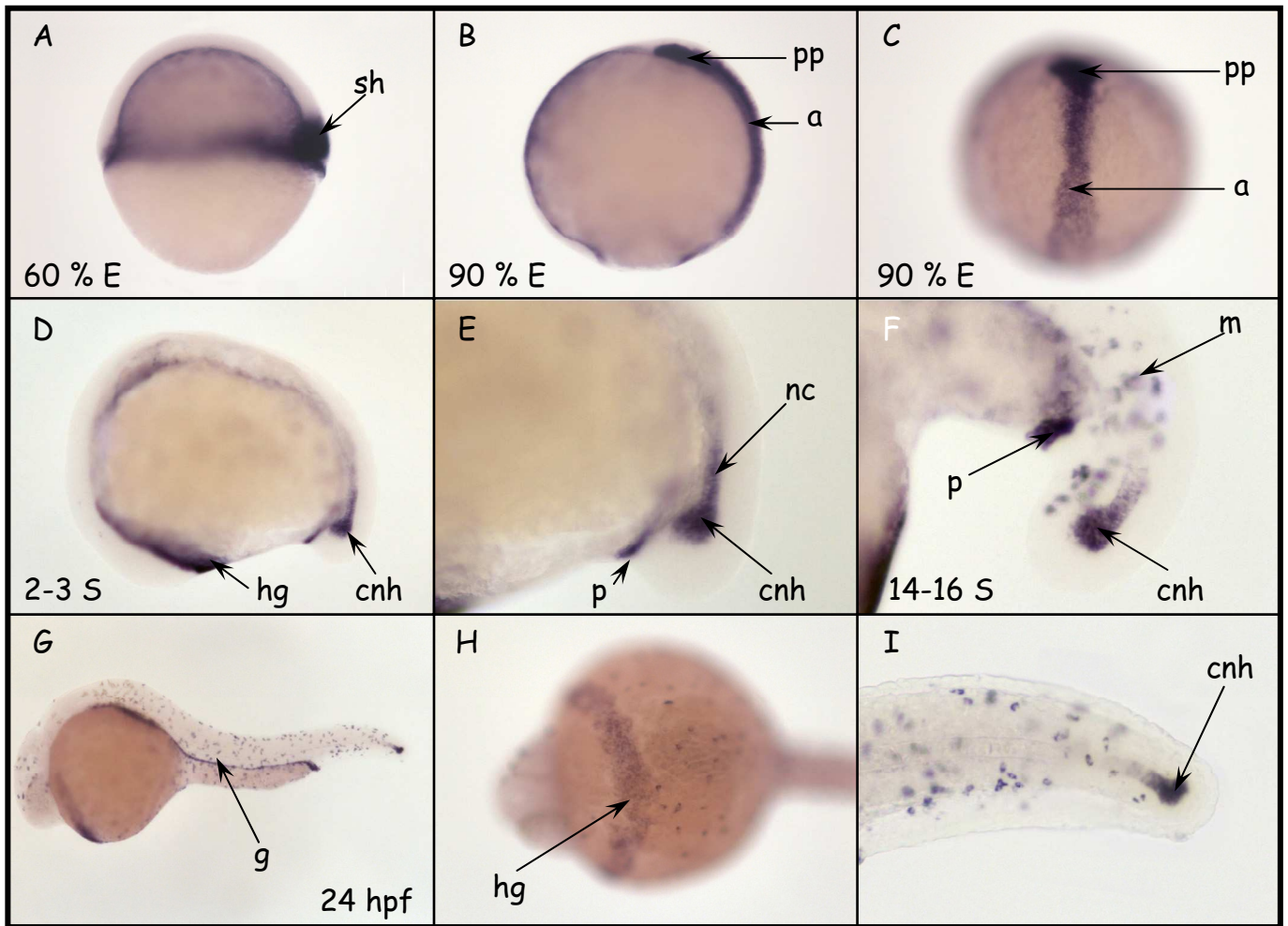
Tous les embryons sont présentés en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (A) ou côté antérieur à gauche et face dorsale en haut (B-H). Les images en C, E, G et H sont des grossissements des embryons présentés en B, D et F respectivement.



II-Figure 13 : Patron d'expression de *foxA2*

Analyse du patron d'expression de *foxA2* pendant la gastrulation (A-C), la somitogenèse (D-F) et à 24 hpf (G-I). Les stades analysés sont indiqués dans le coin des images. Abréviations: a:axe, fp:plaque du plancher, nc:notochorde, cnh:charnière chordo-neurale, zli:zona limitans intrathalamica, E: épibolie, S:somites

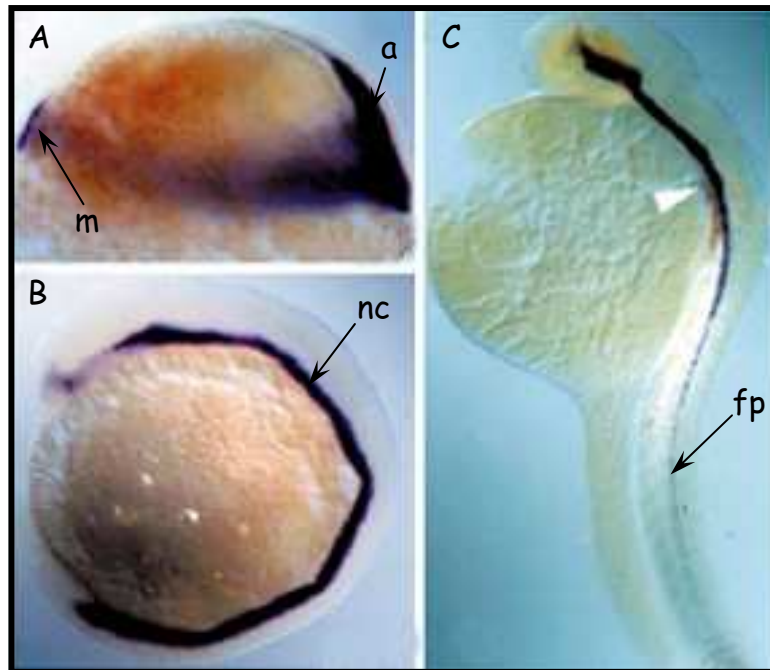
Les embryons sont présentés soit en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (A-B) ou côté antérieur à gauche et face dorsale en haut (D-I); soit en vue dorsale, pôle animal en haut (C). Les images en F, H et I sont des grossissements des embryons présentés en E et G respectivement.



II-Figure 14 : Patron d'expression de *foxA3*

Analyse du patron d'expression de *foxA3* pendant la gastrulation (A-C), la somitogenèse (D-F) et à 24 hpf (G-I). Les stades analysés sont indiqués dans le coin des images. Abréviations: sh: écusson embryonnaire, a:axe, pp:plaque préchordale, cnh:charnière chordo-neurale, nc:notochorde, p: proctodeum, m: cellules à mucus, E: épibolie, S:somites

Les embryons sont présentés soit en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (A-B) ou côté antérieur à gauche et face dorsale en haut (D, E, F, G et I); soit en vue dorsale, pôle animal en haut (C); soit en vue ventrale, côté antérieur à gauche. Les images en E, H et I sont des grossissements des embryons présentés en D et G respectivement.



II-Figure 15 : Patron d'expression de *foxA4*

Analyse du patron d'expression de *foxA4* au stade *shield* (A), au stade 5 somites (B) et à 24 hpf (C). Les stades analysés sont indiqués dans le coin des images. Abréviations: a:axe, m: marge, nc:notochorde, fp: plaque du plancher.

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite.

Figure adaptée de *Odenthal et Nüsslein-Volhard, 1998*

l'inverse, les transcrits *foxA2* disparaissent rapidement du territoire préchordal et marquent de façon homogène le chordamésoderme. Pendant la somitogenèse, l'expression notochordale des deux gènes disparaît et à 24 hpf elle n'est maintenue que dans la partie caudale de la notochorde et la charnière chordo neurale. Dans le même temps, l'expression de *foxA2* débute dans la plaque du plancher où elle est maintenue jusqu'à 24 hpf. A ce stade, le gène *foxA3* est exprimé dans la glande d'éclosion qui s'est différenciée à partir de la plaque préchordale. L'analyse comparative des patrons d'expression des gènes *foxA2* et *foxA3* indique ils sont partiellement redondants dans certains tissus tels que la notochorde et la charnière chordo neurale.

Enfin, le dernier membre de cette famille, le gène *foxA4* débute son expression à la marge dorsale au stade blastula (Odenthal and Nusslein-Volhard, 1998). Au début de la gastrulation, ce gène n'est pas exclusivement exprimé dans les cellules involutives de l'écusson embryonnaire mais dans toutes les cellules involutives de la marge (Fig. 15). Pendant la gastrulation, l'expression de *foxA4* s'étend le long de la ligne médiane. Elle est rapidement exclue de la plaque préchordale et n'est maintenue que dans le chordamésoderme. Après la gastrulation, son expression notochordale persiste uniquement dans la partie caudale, située à proximité de la charnière chordo neurale, et elle apparaît dans la plaque du plancher où elle est maintenue jusqu'à 24 hpf. Le gène *foxA4* possède une dynamique d'expression dans les structures axiales très similaire à celles des gènes *foxA2* et *foxA3*. Pendant les stades blastula et gastrula son patron d'expression est semblable à celui de *foxA3* puis au cours de la somitogenèse, il ressemble d'avantage à celui de *foxA2*.

Comme chez les mammifères et les amphibiens, en plus des territoires axiaux, les gènes *foxA1*, *foxA2*, *foxA3* et *foxA4* sont transcrits dans l'endoderme. Pendant la gastrulation, seul *foxA2* est présent dans ce territoire. A 24 hpf, en revanche, tous les gènes de la famille *foxA* sont exprimés dans l'intestin.

En résumé, tous les membres de la famille *foxA* chez le poisson zèbre sont exprimés dans les structures axiales.

II.9.c. Fonctions connues des gènes de la famille *foxA* au cours du développement de l'embryon de poisson zèbre :

Chez le poisson zèbre, les seuls gènes de cette famille dont la fonction au cours du développement embryonnaire a été étudiée sont les gènes *foxA2* et *foxA3*. Ces études reposent

sur l'analyse de mutants et de perte de fonction par injection de morpholinos (Norton et al., 2005; Seiliez et al., 2006).

Chez le poisson zèbre, les mutants *monorail* portent une mutation dans le gène *foxA2* (Norton et al., 2005). Alors que ce gène est absolument nécessaire à l'induction des structures axiales chez la souris, l'analyse du phénotype des mutants *monorail* montre qu'il n'est pas indispensable à leur développement chez le poisson zèbre. Les structures de l'axe sont correctement induites et les mutants *monorail* possèdent, à 24 hpf, une glande d'éclosion, une notochorde, une plaque du plancher et une hypochorde. Cependant, la différenciation de la plaque du plancher est perturbée. En absence de *foxA2*, cette structure est interrompue dans sa partie antérieure, au niveau du cerveau moyen, et apparaît plus étroite le long de la corde spinale. De plus, les cellules nerveuses situées à proximité de la plaque du plancher ne sont pas correctement spécifiées.

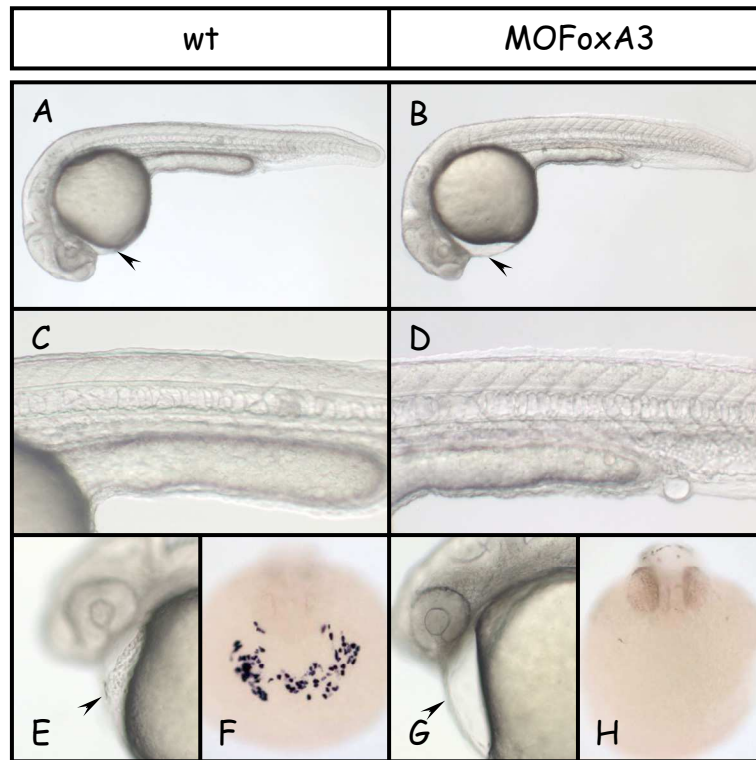
Le seul autre facteur de cette famille ayant fait l'objet d'une étude fonctionnelle est FoxA3. Sa perte de fonction ne perturbe pas le développement des structures axiales indiquant que ce facteur n'est pas indispensable au développement des structures axiales. Cependant, l'inactivation de FoxA3 en combinaison avec celle de Gsc empêche le développement des structures antérieures indiquant des activités redondantes de ces deux molécules dans le développement de la tête (Seiliez et al., 2006).

Alors que les gènes de la famille *foxA* sont fortement exprimés dans les structures axiales, leur perte de fonction individuelle n'a que peu d'effet sur le développement de ces tissus.

III. But de mon étude

La conservation à la fois des séquences protéiques et des territoires d'expression des facteurs de la famille FoxA suggère qu'ils jouent un rôle important dans le développement des structures axiales. Néanmoins, chez le poisson zèbre, la simple perte de fonction de *ces* facteurs affecte peu le développement de ces tissus. Sachant que les gènes de la famille *foxA* sont exprimés de façon partiellement redondante dans la notochorde, la plaque du plancher et la charnière chordo-neurale, il est possible que leurs activités se compensent mutuellement. Au cours de mon travail de thèse, j'ai étudié les activités des facteurs de transcription FoxA pendant la formation des dérivés de la ligne médiane.

Pour cela j'ai analysé l'effet de leur inactivation individuelle ou en combinaison. Ces expériences ont montré que les facteurs FoxA1, FoxA2 et FoxA3 fonctionnent de façon redondante afin de maintenir l'identité des précurseurs des structures axiales et de promouvoir leur différenciation ultérieure. Au stade gastrula, l'absence des protéines de la famille FoxA générant un phénotype semblable à celui des mutants *flh*, j'ai comparé la fonction de ces différents facteurs de transcription. Par des expériences de pertes de fonction, j'ai démontré qu'ils possèdent des activités partiellement redondantes au cours du développement du mésoderme axial.



II-Figure 16 : L'inactivation de FoxA3 abolit le développement de la glande d'éclosion.

(A, C, E et F) Embryons sauvages à 24 hpf. (B, D, G et H) Embryons où le facteur foxA3 a été inactivé par injection d'une combinaison de deux morpholinos, MOg1et MOg3, à une concentration de 1000 μ M chacun, à 24 hpf.

La perte de FoxA3 n'affecte pas le développement des structures axiales du tronc et de la queue (comparer D à C). En revanche, les morphants FoxA3 ne développent pas de glande d'éclosion reconnaissable morphologiquement (flèche en B et G, à comparer avec A et E) et aucune expression du marqueur *hgg1* n'est détectée (comparer H à F).

Les embryons sont présentés en vue latérale, extrémité antérieure à gauche et face dorsale en haut (A, B, C, D, E et G), ou en vue dorsale (F et H)

Partie II : Résultats

I. Le facteur FoxA3 est indispensable à la différenciation de la plaque préchordale :

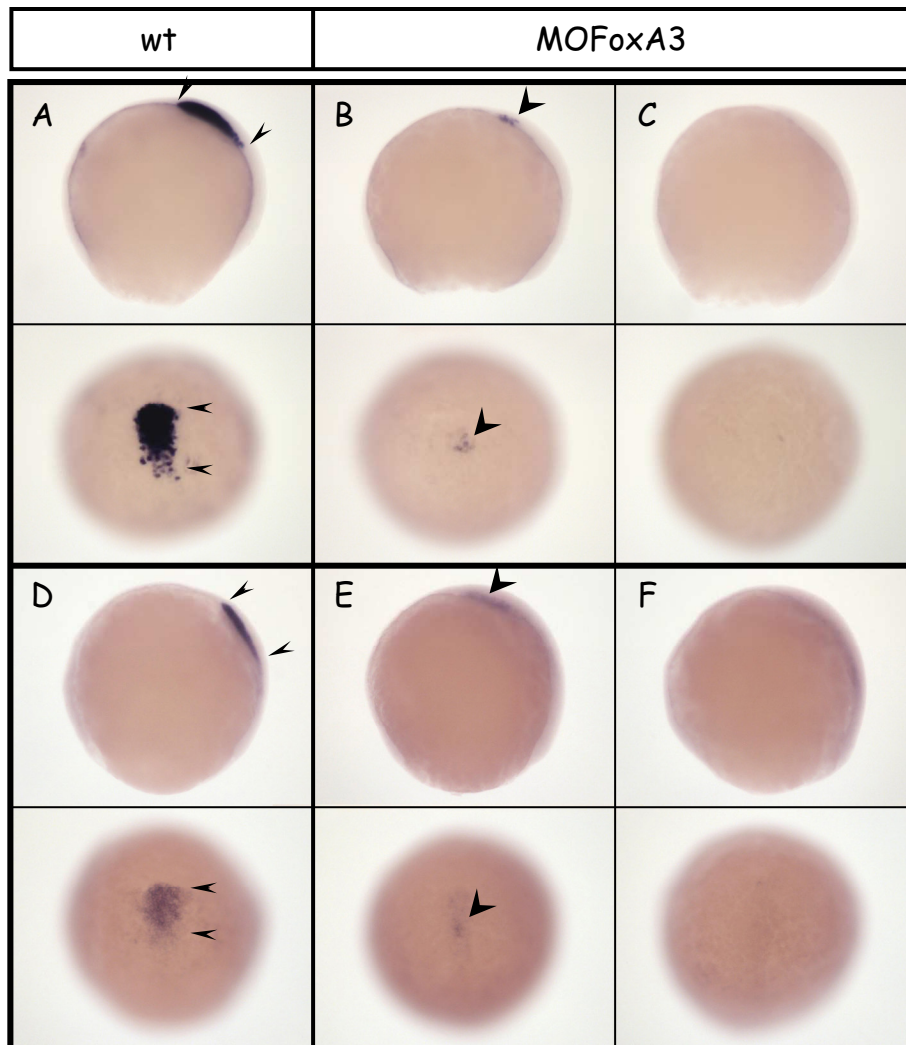
Alors que le rôle du facteur FoxA2 dans le développement embryonnaire du poisson zèbre est bien décrit dans la littérature, très peu d'informations sont disponibles quant à celui de FoxA3. Afin d'identifier le rôle de ce facteur de transcription dans le développement des structures axiales, j'ai analysé l'effet de sa perte de fonction par des injections de morpholinos.

1.1. L'inactivation de FoxA3 abolit le développement de la glande d'éclosion.

Pour inactiver le facteur FoxA3, j'ai utilisé deux morpholinos, MOg1 et MOg3 (*cf* Matériel et Méthodes), que j'ai injecté en combinaison et à fortes concentrations (2x1000 µM) dans la réserve vitelline des embryons au stade 1 à 2 cellules. Je référerai à ces embryons sous le nom de : MOFoxA3.

A 30 hpf (heures post-fertilisation), les embryons MOFoxA3 sont semblables aux embryons sauvages. Leurs structures axiales (notochorde, plaque du plancher et hypochorde) sont reconnaissables morphologiquement et semblent être correctement développées (Fig.16 : C et D). Cependant, ces morphants (embryons injectés avec des morpholinos) ne présentent aucune glande d'éclosion à la surface de la réserve vitelline (Fig.16 : E et G). Le gène *hgg1* code pour la Cathepsin L qui est une enzyme sécrétée par la glande d'éclosion. Ce gène est exprimé dès le stade gastrula et constitue un marqueur précoce de la différenciation de la glande d'éclosion. (Thisse et al., 1994; Vogel et al. 1997). L'analyse de son expression par hybridation *in situ*, confirme l'absence d'une glande d'éclosion différenciée dans les morphants FoxA3 à 30 hpf (Fig.16 : F et H). Le facteur de transcription FoxA3 est donc indispensable au développement de la glande d'éclosion.

Dans de rares cas (8 % n=311), en plus de l'absence de glande d'éclosion, les MOFoxA3 présentent une interruption prématurée de la notochorde. Pour plus de clarté, dans ce chapitre, je ne traiterai que de l'analyse du phénotype majeur des morphants FoxA3, l'absence de glande d'éclosion. Je reviendrai plus tard sur ces observations phénotypiques.



II-Figure 17 : L'inactivation de FoxA3 affecte la différenciation de la plaque préchordale.

Expression, à 80 % d'épibolie, des marqueurs de la différenciation de la plaque préchordale, *hgg1* (A-C) et *rdh8* (D-F) chez les morphants Fox3 (MOg1g3, 2x1000 µM) (B, C, E et F) par rapport aux embryons sauvages (A et D)

A 80 % d'épibolie, l'inactivation de FoxA3 abolit l'expression de *hgg1* (C) et *rdh8* (F). Dans certains cas, seules quelques cellules préchordales persistent (têtes de flèche en B et E)

Pour chaque condition, les embryons sont présentés en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (image du haut) et en vue dorsale (image du bas).

1.2. FoxA3 est indispensable à la différenciation de la plaque préchordale mais pas à son induction.

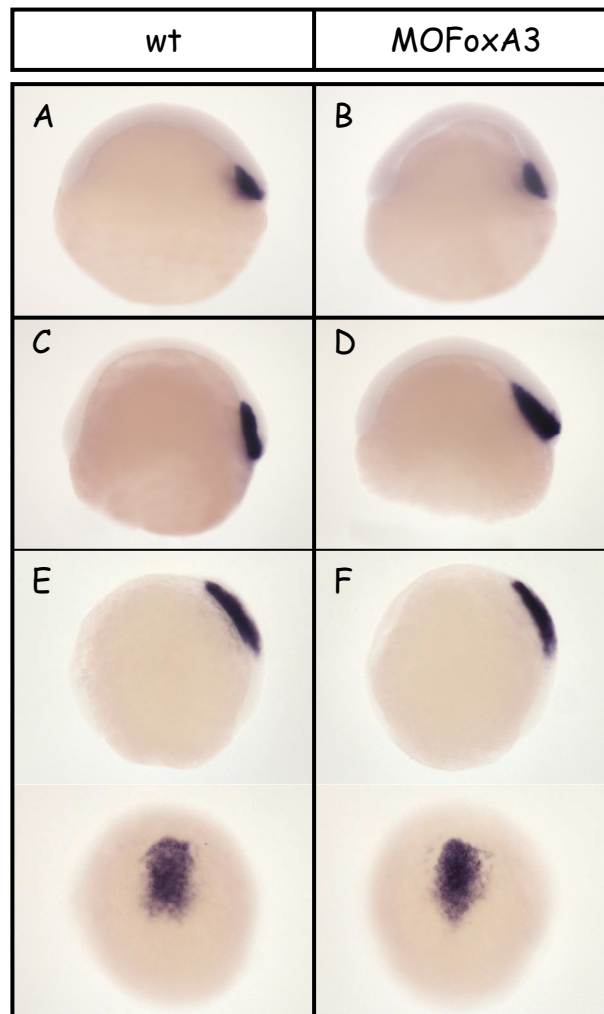
Afin de déterminer à quel stade embryonnaire l'inactivation de FoxA3 affecte le développement de cette structure, des hybridations *in situ* ont été réalisées pendant la gastrulation. A 80 % d'épibolie, l'expression du gène *hgg1* est absente dans la plupart des morphants FoxA3 (Fig. 17 C). Rarement, on observe des embryons avec quelques cellules exprimant *hgg1* à l'extrémité antérieure de la plaque préchordale (Fig. 17 : B). Ces embryons correspondent, vraisemblablement, à une perte de fonction incomplète de FoxA3. L'analyse d'un autre marqueur précoce, le gène *rétinol déshydrogénase 8 (rdh8)*, confirme l'absence d'une plaque préchordale différenciée à 80 % d'épibolie dans les morphants FoxA3 (Fig. 17 : E à F).

La glande d'éclosion se différencie à partir de la partie antérieure du mésoderme axial, la plaque préchordale. Pour savoir si le phénotype des MOFoxA3 est le résultat d'une non différenciation de la plaque préchordale ou reflète, simplement, l'absence de ce tissu, l'expression du marqueur préchordal *goosecoid* a été analysée. Comme je l'ai déjà mentionné dans l'introduction, le gène *gsc* est exprimé précocement dans la plaque préchordale en réponse à une forte stimulation par la voie Nodal. En début de gastrulation, son expression dans les morphants FoxA3 est indistinguishable de celle des embryons sauvages indiquant que la plaque préchordale est correctement induite (Fig. 18 : C et D). De même, l'inactivation de FoxA3 n'affecte pas l'expression du gène *nog1* dans ce territoire, au stade *shield* (Fig. 18 : A et B). Plus tard, à 80 % d'épibolie, l'expression du gène *gsc* dans les embryons MOFoxA3 reste identique à celle des embryons sauvages, malgré l'absence d'un marquage *hgg1* dans ces mêmes morphants (Fig. 18 : E et F).

En conclusion, chez les embryons MOFoxA3 la plaque préchordale est correctement induite et maintenue au cours de la gastrulation. Par conséquent, l'absence d'une glande d'éclosion différenciée, suite à l'inactivation de FoxA3, n'est pas le résultat de l'absence de la plaque préchordale mais reflète plutôt son incapacité à se différencier ultérieurement.

1.3. L'expression de marqueurs spécifiques de la plaque préchordale est perturbée chez les morphants FoxA3.

Bien que leur rôle dans le développement de la plaque préchordale n'ait pas été élucidé, de nombreux gènes sont exprimés dans ce territoire axial antérieur, pendant la gastrulation. Parmi eux, on distingue des membres des voies de signalisation BMP et Wnt. Chez les morphants FoxA3, l'incapacité de la plaque préchordale à se différencier en glande d'éclosion

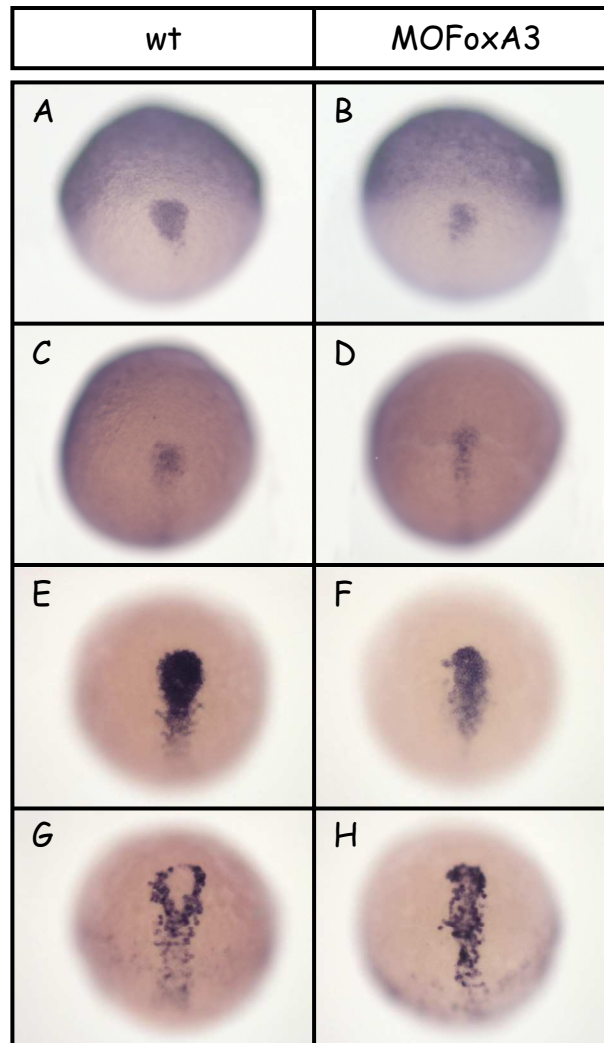


II-Figure 18 : La plaque préchordale est induite en absence de FoxA3.

Expression des marqueurs précoces de la plaque préchordale, *nog1* (A et B) et *gsc* (C-F) chez les embryons sauvages (A, C et E) et les morphants Fox3 (MOg1g3, 2x1000 μ M) (B, D et F), au stade *shield* (A-D) ou à 80 % d'épibolie (E et F).

Quelque soit le stade analysé, l'expression de *nog1* et *gsc* n'est pas affectée par l'inactivation de FoxA3 (comparer B,D et F avec A,C et E)

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite excepté pour les images du bas en E et F où les embryons sont présentés en vue dorsale.

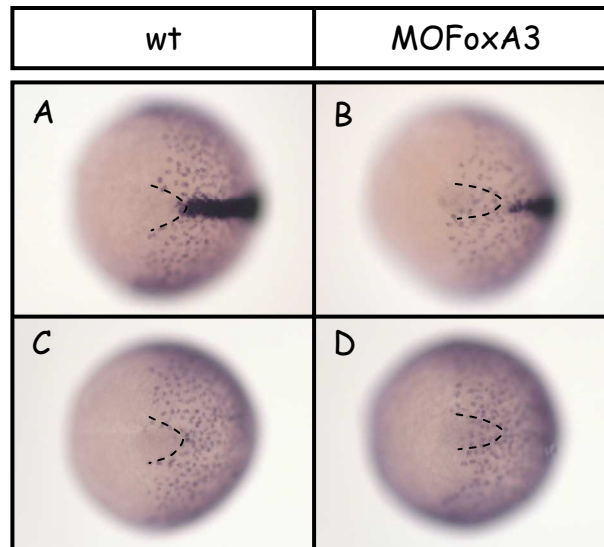


II-Figure 19: L'expression de marqueurs spécifiques de plaque préchordale est perturbée en absence de FoxA3.

Expression à 80 % d'épibolie des membres de la voie BMP, *BAMBI* (A-B) et *bmp4* (C-D), et des inhibiteurs de la voie Wnt, *frzB* (E-F) et *dkk1* (G-H), au niveau de la plaque préchordale chez les embryons sauvages (A, C, E et G) et les morphants FoxA3 (MOg1g3, 2x1000 µM) (B, D, F et H).

L'expression de *bmp4* (B), *BAMBI* (D) et *FzB* (F) dans la plaque préchordale diminue légèrement en absence de FoxA3. Le territoire d'expression de *dkk1*, qui marque les bords latéraux de la plaque préchordale chez les embryons sauvages (G) est fusionné le long de la ligne médiane chez les morphants FoxA3 (H)

Tous les embryons sont présentés en vue dorsale, pôle animal en haut.



II-Figure 20 : L'endoderme s'étend dans le territoire préchordal en absence de FoxA3.

Expression à 80 % d'épibolie des marqueurs de l'endoderme *foxA2* (A-B) et *sox17* (C-D) chez les embryons sauvages (A et C) et les morphants FoxA3 (MOg1g3, 2x1000 µM) (B et D).

Alors que le territoire préchordal (délimité par les pointillés) est dépourvu de cellules endodermiques chez les embryons sauvages (A et C), l'expression des marqueurs *foxA2* et *sox17* est présente dans ce domaine chez les morphants FoxA3 (B et D)

Tous les embryons sont présentés en vue animale, face dorsal à droite.

pourrait être le résultat d'un mauvais programme d'expression génique. Pour tester cette hypothèse, l'expression de membres des voies de signalisation BMP et Wnt a été analysée par des hybridations *in situ*.

Les gènes codant pour le ligand BMP4 et pour son antagoniste BAMBI, sont exprimés dans le mésoderme ventral à 80 % d'épibolie ainsi que dans le territoire préchordal (Fig. 19 : A et C). Bien que l'expression de ces gènes dans le mésoderme ventral ne soit pas affectée, leur activité dans la plaque préchordale est légèrement diminuée (Fig. 19 : B et D).

Les gènes *dkk1* et *frzB* codent pour des inhibiteurs de la voie Wnt (Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997; Glinka et al., 1998; Seiliez et al., 2006). Ces deux gènes sont exprimés différemment au sein du territoire préchordal. *frzB* est spécifiquement exprimé dans la plaque préchordale alors que *dkk1* marque ses bords latéraux (Fig. 19 : E et G). Dans les morphants FoxA3, les domaines d'expression de ces deux gènes sont affectés et semblent se superposer. Le territoire exprimant *frzB* apparaît plus étroit tandis que celui de *dkk1* est fusionné le long de la ligne médiane (Fig. 19 : F et H).

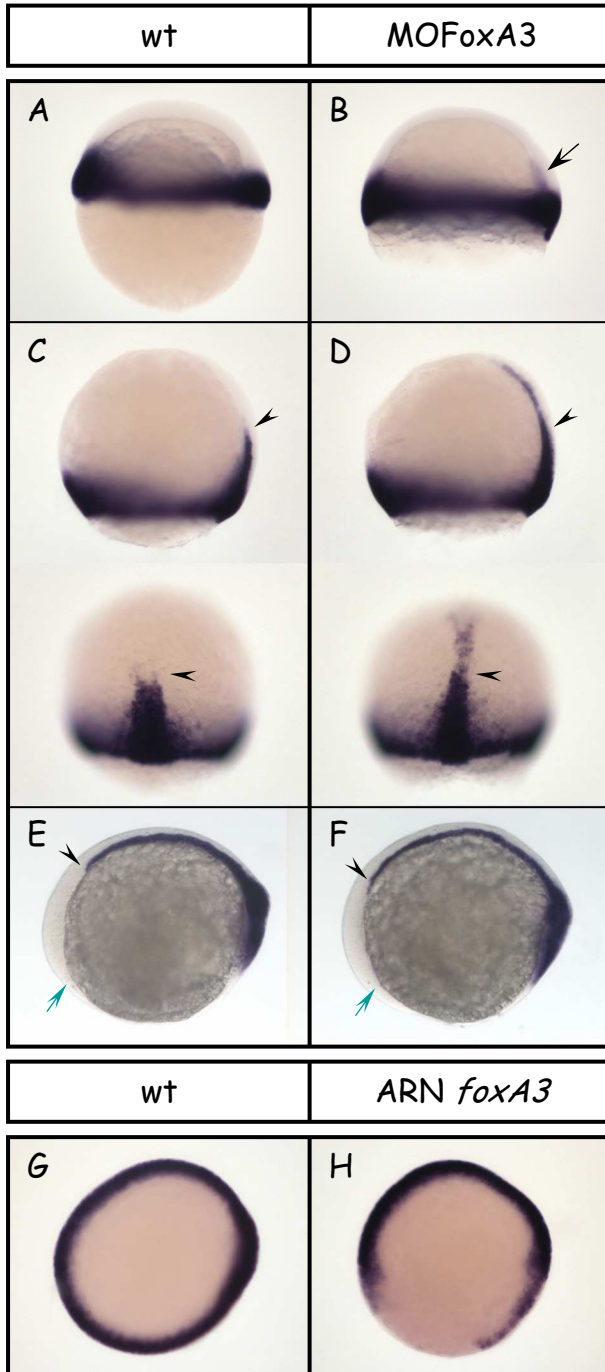
Dans les morphants FoxA3, la plaque préchordale est présente mais son programme d'expression génique est incorrect suggérant que l'activité de signalisation de cette structure est perturbée.

1.4. L'inactivation de FoxA3 perturbe le développement de l'endoderme adjacent à la plaque préchordale.

La plaque préchordale est présente dans les morphants FoxA3 mais son identité moléculaire est altérée et sa différenciation ultérieure en glande d'éclosion est abolie. Dans les embryons sauvages, pendant la gastrulation, la plaque préchordale est bordée latéralement par les cellules endodermiques. Afin de déterminer si ce territoire endodermique est affecté dans les morphants FoxA3, il a été analysé par hybridation *in situ* via l'utilisation des marqueurs moléculaires *sox17* et *foxA2*.

A 80 % d'épibolie, alors que les cellules endodermiques sont normalement exclues du territoire préchordal, elles y sont présentes chez les morphants FoxA3 (Fig. 20).

L'inactivation du facteur FoxA3 perturbe non seulement la différenciation de la plaque préchordale mais aussi les limites de l'endoderme adjacent qui s'étend dorsalement dans le territoire préchordal.



II-Figure 21 :

L'expression de *ntl* est maintenue dans la plaque préchordale en absence de FoxA3, pendant la gastrulation.

Expression du gène *ntl* au stade *shield* (A-B), à 80 % d'épibolie (C-D), et au stade 2 somites (E-F) chez les embryons sauvages (A, C et E) et les morphants FoxA3 (MOg1g3, 2x1000 μ M) (B, D et F). Les têtes de flèches en D et F marquent la limite antérieure du territoire notochordal présomptif.

En absence de FoxA3, l'expression du gène *ntl* est maintenue dans la plaque préchordale pendant la gastrulation (flèche en B) alors que son expression ne s'étend pas au-delà du territoire notochordal chez les embryons sauvages (C et D). Au stade 2 somites, l'expression de *ntl* chez les morphants FoxA3 (F) est identique à celle des embryons sauvages (E) et aucune expression n'est visible dans le polster (flèche verte).

(A-F) Embryons présentés en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (A,B et images du haut en C et D), ou pôle antérieur à gauche et face dorsale en haut (E et F). Embryons présentés en vue dorsale sur les images du bas, en C et D.

FoxA3 inhibe l'expression de *ntl*.

Expression de *ntl* chez les embryons sauvages (G) et chez les embryons injectés avec 25 ng/ μ L de l'ARN FoxA3 (H) au stade shield.

La sur-expression de *foxA3* inhibe l'expression de *ntl* à la marge (comparer H avec G)

(G-H) Embryons présentés en vue animale, face dorsale à droite.

1.5. L'expression du gène *ntl* est maintenue dans la plaque préchordale des morphants FoxA3 :

Au cours du développement embryonnaire, la marge dorsale, à partir de laquelle se développe le territoire préchordal, exprime à la fois le gène *gsc* et le gène *ntl*. Ce n'est qu'en début de gastrulation que le gène *ntl* disparaît du territoire préchordal pour n'être maintenu que dans les précurseurs de la notochorde.

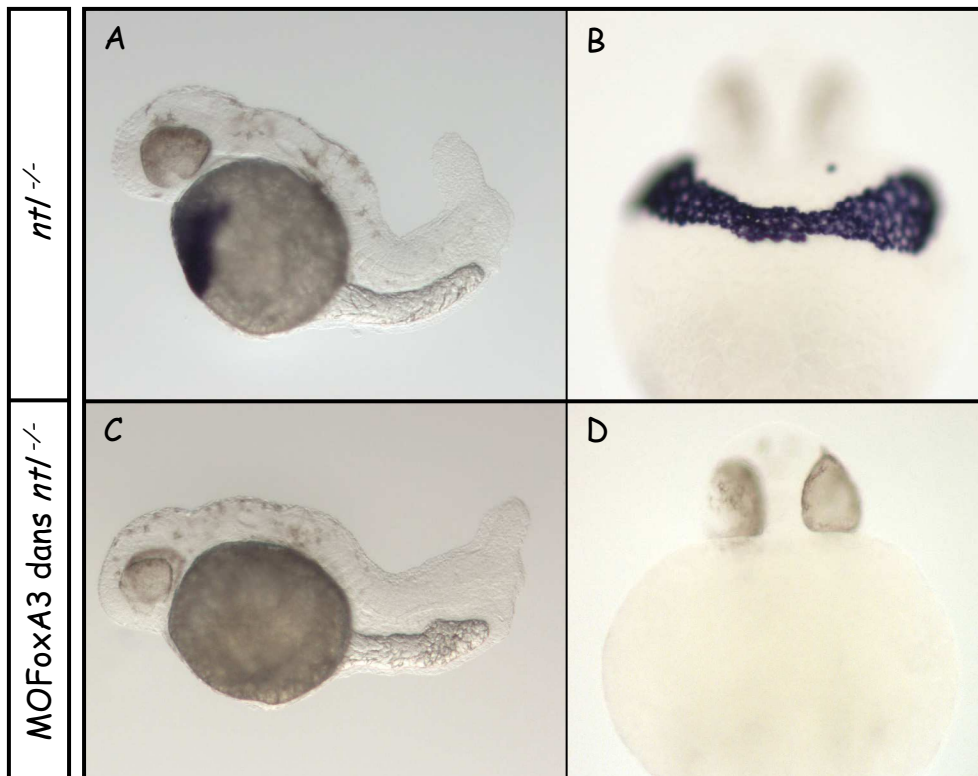
Dans les morphants FoxA3, à 80 % d'épibolie, l'expression du gène *ntl* est maintenue dans la plaque préchordale (Fig. 21 D). Ce phénotype est visible dès le début de la gastrulation (Fig. 21 B). En revanche, en début de somitogenèse, l'expression de *ntl* dans les embryons MOFoxA3 est identique à celle des embryons sauvages et le polster, qui dérive de la plaque préchordale, est dépourvu de son expression (Fig. 21 : E et F). Ces résultats montrent que la disparition de l'expression du gène *ntl* dans la plaque préchordale est retardée en absence du facteur FoxA3.

Le gène *foxA3* est exprimé précocement dans la plaque préchordale. Le maintien de l'expression de *ntl* dans ce tissu pourrait être une conséquence directe de l'absence du facteur FoxA3 qui agirait comme un répresseur de transcription. Si FoxA3 est un régulateur négatif de l'expression du gène *ntl*, alors sa sur-expression devrait inhiber l'expression de *ntl*. Cette hypothèse a été testée en réalisant des injections d'ARN *foxA3* dans des embryons au stade 1 à 2 cellules. Les embryons ont été fixés au stade *shield* et l'expression de *ntl* a été analysée par hybridation *in situ*. A ce stade, *ntl* est exprimé sur toute la marge des embryons sauvages. En revanche, chez les embryons sur-exprimant *foxA3*, on observe des zones marginales dépourvues de l'expression de *ntl*. La localisation dorso-ventrale de ces zones est aléatoire et reflète probablement une distribution hétérogène des ARN *foxA3* (Fig. 21 : G et H).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggèrent que FoxA3 réprime, de façon directe ou indirecte, l'expression du gène *ntl* dans la plaque préchordale.

1.6. Le maintien de l'expression du gène *ntl* n'est pas responsable de l'absence de glande d'éclosion chez les morphants FoxA3.

Les résultats précédents suggèrent un rôle pour le facteur de transcription FoxA3 dans la répression précoce de l'expression de *ntl* au niveau de la plaque préchordale. Chez les vertébrés, le facteur de transcription Ntl est indispensable au développement de la notochorde dont les précurseurs sont situés postérieurement à la plaque préchordale le long de la ligne médiane. On peut supposer que l'expression ectopique de *ntl* dans la plaque préchordale affecte son identité moléculaire et cellulaire et qu'en conséquence, elle devient incapable de



II-Figure 22 : L'absence de la glande d'éclosion chez les morphants FoxA3 n'est pas restaurée par l'inactivation de *ntl*.

Expression à 30 hpf du marqueur de la glande d'éclosion, *hgg1*, chez les mutants *ntl*^{-/-} non injectés (A et B) ou injectés avec les morpholinos MOg1 et MOg3 (2x1000 µM) afin d'inactiver le facteur FoxA3 (C et D).

Les mutants *ntl*^{-/-} possèdent une glande d'éclosion à 30hpf. Comme chez les simples morphants FoxA3, l'inactivation de FoxA3 chez les mutants *ntl*^{-/-} abolit le développement de la glande d'éclosion.

Les embryons sont présentés en vue latérale, extrémité antérieure à gauche et face dorsale en haut (A et C), ou en vue frontale (B et D).

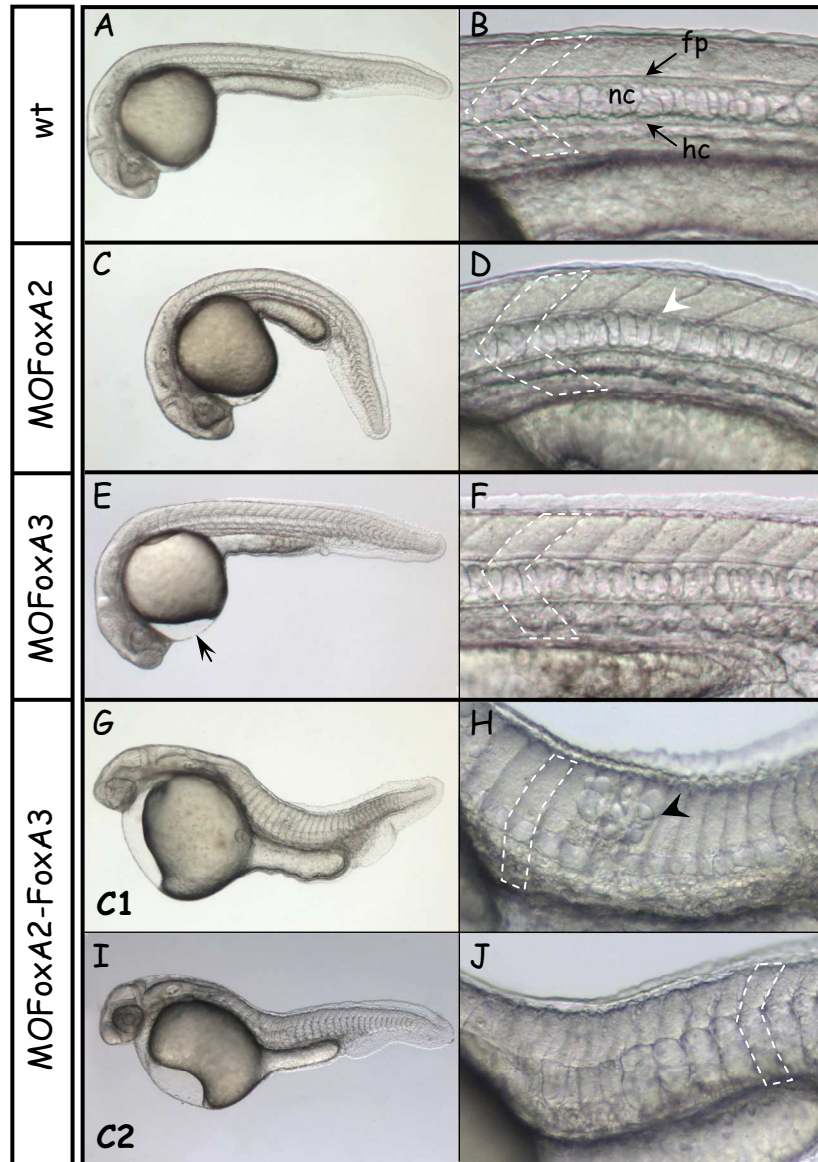
se différencier en glande d'éclosion. Pour tester cette hypothèse, j'ai tenté de restaurer le développement de la glande d'éclosion dans les morphants FoxA3 en inactivant le gène *ntl*. Pour cela, j'ai injecté les morpholinos MOg1 et MOg3 (à une concentration de 1000 µM chacun) dans des mutants *ntl*.

La glande d'éclosion est correctement développée chez les mutants *ntl*, cependant la perte de fonction de FoxA3 abolit son développement dans les mutants *ntl*, tout comme elle le fait chez les embryons sauvages (Fig. 22). L'absence de Ntl est incapable de restaurer le développement d'une glande d'éclosion différenciée en absence de FoxA3.

En conclusion, l'incapacité des morphants FoxA3 à différencier une glande d'éclosion à partir de la plaque préchordale ne résulte pas du maintien de l'expression de *ntl* dans cette structure.

1.7. Conclusions :

La glande d'éclosion ne se développe pas en absence du facteur FoxA3. Au cours de la gastrulation, l'analyse de différents marqueurs montre que ce phénotype ne résulte pas d'un défaut dans l'induction de la plaque préchordale mais de l'absence de différenciation de cette structure. Néanmoins, bien que la plaque préchordale soit correctement induite, son programme d'expression génique est altéré. En particulier, l'expression du gène *ntl* est anormalement maintenue dans le territoire préchordal et suggère que le facteur FoxA3, exprimé dans ce territoire, serait responsable de la répression précoce de *ntl*. L'inactivation du gène *ntl* n'est pas en mesure de restaurer le développement de la glande d'éclosion chez les morphants FoxA3. Par conséquent, l'absence d'une glande d'éclosion différenciée chez les morphants Fox3 ne résulte pas du maintien de l'expression de *ntl* dans la plaque préchordale pendant la gastrulation. En conclusion, le facteur FoxA3 est indispensable à la différenciation de la glande d'éclosion mais le mécanisme par lequel il agit reste à élucider.



II-Figure 23 : L'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 abolit le développement des structures axiales.

Embryons sauvages à 24 hpf (A et B). Embryons injectés avec le morpholino MO_{b1} (1000 μ M) (C et D, morphants FoxA2), avec les deux morpholinos MO_{g1}et MO_{g3} (2x1000 μ M) (E et F, morphants FoxA3) ou avec les trois morpholinos MO_{b1}, MO_{g1}et MO_{g3} (3x1000 μ M) (G-J, morphants FoxA2-FoxA3) à 24 hpf.

Le développement de la plaque du plancher est altéré (flèche blanche en D) chez les morphants FoxA2 qui présentent une courbure ventrale (C). Les morphants FoxA3 ne développent pas de glande d'éclosion (flèche en E) mais le reste des structures axiales n'est pas affecté (F). L'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 a des effets catastrophiques sur le développement des structures axiales (G-J) qui sont interrompues (C1; G et H) ou absentes (C2; I et J). Les cellules de notochorde qui persistent chez les doubles morphants sont fortement désorganisées et envahissent le tube neural sus-jacent (flèche en H). En absence de structures axiales, les somites des doubles morphants ont perdu leur forme en chevron caractéristique (pointillés blancs)

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, extrémité antérieure à gauche et face dorsale en haut. Pour chaque embryon, un agrandissement de la région du tronc est présentée (B, D, G, H et J). fp: plaque du plancher, nc: notochorde, hc: hypochorde.

II. Les facteurs FoxA2 et FoxA3 fonctionnent de façon redondante dans le développement des structures axiales

L'expression des gènes *foxA2* et *foxA3* dans les structures axiales est conservée chez les vertébrés suggérant que ces facteurs jouent un rôle important dans leur développement. Cependant, nous avons vu que leur simple inactivation n'a que peu d'effet sur les structures de la ligne médiane. L'inactivation de *foxA2* affecte la différenciation de la plaque du plancher, celle de FoxA3, la différenciation de la plaque préchordale. Les territoires d'expression de ces deux gènes sont partiellement redondants, notamment au niveau de la notochorde et de la charnière chordo-neurale. L'absence de FoxA2 dans ces tissus pourrait donc être compensée par la présence de FoxA3, et inversement. Cela expliquerait pourquoi le développement des structures axiales n'est pas d'avantage affecté. Pour tester cette hypothèse, j'ai analysé l'effet de l'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3.

II.1. L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 abolit le développement de l'ensemble des structures axiales à 30 hpf :

II.1.a. Analyse morphologique à 30 hpf :

Afin d'inactiver FoxA2 et FoxA3, j'ai utilisé une combinaison de 3 morpholinos : MOB1 pour FoxA2, MOG1 et MOG3 pour FoxA3. Ces morpholinos ont été injectés seuls ou en combinaison, chacun à une forte concentration (1000 μ M) dans la réserve vitelline d'embryons au stade 1 à 2 cellules. Je référerai à ces embryons sous le nom de : MOFoxA2 pour les embryons injectés avec le morpholino MOB1; MOFoxA3 pour ceux injectés avec la combinaison MOG1 et MOG3; et MOFoxA2-FoxA3 pour les embryons injectés avec les 3 morpholinos MOB1, MOG1 et MOG3.

Tout d'abord, j'ai vérifié que le morpholino MOB1 était efficace et provoquait le même phénotype que celui du mutant *monorail*. Les embryons MOFoxA2 sont courbés ventralement (95 % n=202 ; Fig. 23 : C et D). Cette courbure est identique à celle des mutants *monorail* et est associée à une absence de plaque du plancher différenciée. Le reste des structures axiales n'est pas affecté dans les morphants FoxA2 tout comme dans les mutants *monorail*.

Comme je l'ai mentionné au chapitre précédent, l'inactivation de FoxA3 affecte la différenciation de la glande d'éclosion. Les structures axiales des morphants FoxA3 sont, dans la plupart des cas, correctement développées (92% n=311; Fig. 23 : E et F). Pour une

faible proportion d'entre eux (8 % n=311, résultats non montrés) j'ai observé une interruption de la notochorde.

La perte simultanée de FoxA2 et FoxA3, en revanche, a des effets catastrophiques sur le développement des structures axiales. En effet, en plus de l'absence de la glande d'éclosion due à l'inactivation de FoxA3, le développement de la notochorde est fortement perturbé voir aboli chez les embryons MOFoxA2-FoxA3. Les morpholinos ayant une activité dose-dépendante, les populations de morphants générées sont rarement homogènes et on observe des variations dans la force des phénotypes. Pour rendre compte de ces différences, j'ai distingué deux classes phénotypiques (C1 et C2). Les embryons MOFoxA2-FoxA3 appartenant à la classe C1, présentent une notochorde dans la région du tronc mais celle-ci est absente dans la queue, c'est à dire dans le territoire postérieur à l'anus (62 % n=434 ; Fig.23 : G et H). Dans la partie antérieure qui possède une notochorde, on observe de larges cellules désorganisées dans le tube neural. Leur aspect suggère qu'il s'agit de cellules notochordales. Chez les embryons appartenant à la classe C2, l'effet de la perte de fonction de FoxA2 et FoxA3 est nettement plus fort et ces embryons ne présentent aucune cellule de notochorde reconnaissable (35% n=434; Fig.23 : I et J). L'obtention de deux classes phénotypiques indique que le développement de la notochorde est affecté différemment le long de l'axe AP. Alors que sa partie postérieure est absente chez tous les morphants FoxA2-FoxA3, sa partie antérieure n'est affectée que dans 35 % des cas. L'aspect général des morphants FoxA2-FoxA3 est aussi modifié. Les embryons ont un axe AP plus court et leurs somites ne possèdent pas leur forme caractéristique en chevron. Ces défauts sont probablement une conséquence de l'absence de notochorde.

En conclusion, les gènes *foxA2* et *foxA3* sont indispensables au développement de la notochorde et leurs fonctions semblent être redondantes. En effet, l'absence d'un seul de ces facteurs ne suffit pas pour affecter significativement le développement de la notochorde indiquant que FoxA2 et FoxA3 se compensent mutuellement. En ce qui concerne les 8 % d'embryons MOFoxA3 qui présentent des défauts notochordaux, on peut supposer que, dans ces cas précis, l'inactivation de FoxA3 était telle qu'elle n'a pas pu être compensée par l'activité de FoxA2.

II.1.b. Analyse moléculaire à 30 hpf :

Pour confirmer les résultats obtenus précédemment, et déterminer si le phénotype résultant de la perte de fonction des facteurs FoxA2 et FoxA3 affecte spécifiquement la notochorde ou

concerne l'ensemble des structures de l'axe, ces tissus ont été analysés par des hybridations *in situ*.

Par souci d'homogénéité, quelque soit le marqueur testé, les résultats ont été quantifiés suivant le même protocole. Pour cela, j'ai classé les embryons en 3 catégories phénotypiques en fonction de la position AP où les structures sont interrompues. La classe C1 désigne les embryons pour lesquels les structures axiales sont interrompues après l'anus. Les embryons de classe C2 présentent des structures axiales qui s'arrêtent avant l'anus. Enfin, les embryons de classe C3 ne possèdent aucune structure axiale. L'ensemble des résultats est présenté dans la Table 1.

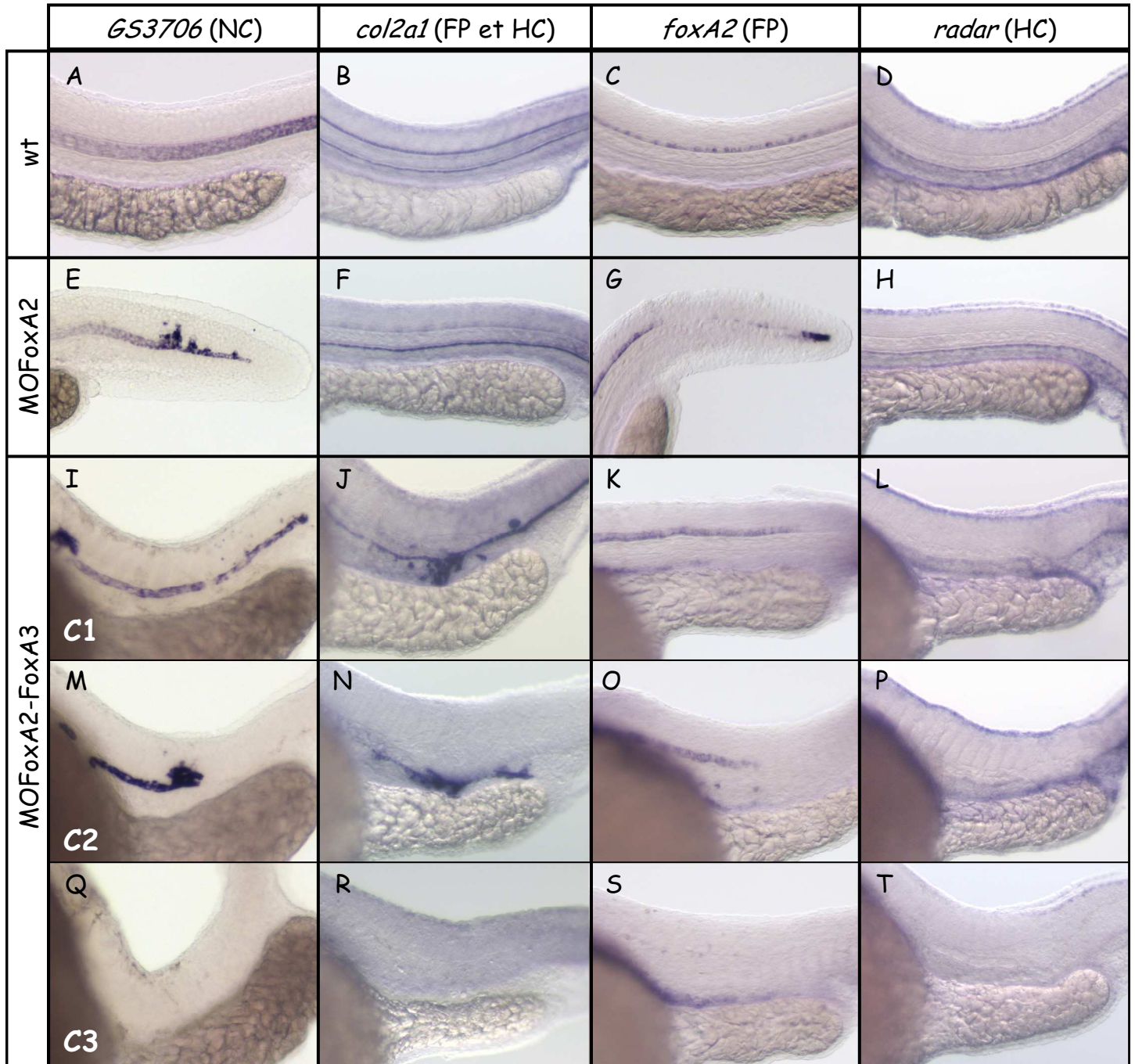
- ***L'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 abolit le développement de la notochorde.***

Le marqueur *GS3706* est un gène dont la fonction n'est pas connue et qui est exprimé spécifiquement dans la notochorde dès la somitogenèse.

Ce marquage confirme la présence d'une notochorde correctement développée dans les simples morphants FoxA2 et FoxA3 (résultats non montrés). En revanche, elle est progressivement éliminée chez les doubles morphants FoxA2-FoxA3, sa partie postérieure étant plus fréquemment affectée que sa partie antérieure. Alors que la quasi-totalité des embryons ne possède pas de notochorde en aval de l'anus, seuls 55 % d'entre eux ne développent pas, non plus, de notochorde au niveau du tronc (C2, Table1A et Fig. 24 M). Enfin, 10 % ne présentent aucune notochorde sur toute la longueur de l'axe AP (C3, Table1A et Fig. 24 Q).

Chez les embryons MOFoxA2-FoxA3, la longueur AP de la notochorde n'est pas le seul paramètre affecté. La forme et l'organisation des cellules notochordales sont aussi perturbées. D'une façon générale, la notochorde semble moins épaisse et ses cellules peuvent être localement désorganisées. En effet, par endroits, elles semblent perdre leur cohésion et envahissent les tissus voisins, notamment le tube neural sus-jacent (Fig. 25 B).

Chez les embryons sauvages, le gène *shh*, initialement exprimé dans la notochorde, disparaît progressivement de ce tissu et à 30 hpf son expression n'est maintenue qu'à l'extrémité caudale de la notochorde. Dans le même temps, l'expression de *shh* apparaît dans la plaque du plancher. Cette dynamique d'expression reflète l'état de différenciation des structures axiales. Chez les simples morphants FoxA2 et FoxA3, l'expression de *shh* est identique à celle des embryons sauvages (résultats non montrés). En revanche, sa dynamique est fortement perturbée en absence de FoxA2 et FoxA3. En effet, chez les embryons MOFoxA2-FoxA3,



II-Figure 24: L'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 abolit le développement de l'ensemble des structures axiales.

Expression à 30 hpf, de différents marqueurs des structures axiales: *GS3706* (A, E, I, M et Q), *col2a1* (B, F, J, N et R), *foxA2* (C, G, K, O et S), et *radar* (D, H, L, P et T) chez les embryons sauvages (A-D), les simples morphants FoxA2 (E-H) et les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (I-T). Pour chaque marqueur, la(les) structure(s) mise(s) en évidence est(sont) indiquée(s) entre parenthèses. NC: notochorde, FP: plaque du plancher, HC: hypochorde.

Alors que l'inactivation de FoxA2 affecte essentiellement le développement de la plaque du plancher (F et G), la perte simultanée de FoxA2-FoxA3 abolit progressivement le développement de l'ensemble des structures axiales le long de l'axe AP. Ces structures sont interrompues après l'anus (C1; I-L), avant l'anus (C2; M-P) ou sont entièrement absentes (C3; Q-T)

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, extrémité antérieure à gauche et face dorsale en haut.

Table 1

1	MO injectés	concentrations (µM)	marqueurs	structures	n	phénotypes (%)			
						wt	C1	C2	C3
A	MO b1g1g3	3x1000	GS 3706	NC	94	2	33	55	10
	MO b1g1g3	3x1000	col2a1	FP et HC	52	0	52	42	6
	MO b1g1g3	3x1000	foxA2	FP	43	0	9	77	14
	MO b1g1g4	3x1000	fspodin2	FP	39	0	0	87	13
	MO b1g1g3	3x1000	radar	HC	51	2		49	49
	MO b1g1g3	3x1000	dermo1	HC	?	0		0	100
B	MO b1g1g3	3x500	GS 3706	NC	106	2	66	28	4
	MO b1g1g3	3x500	col2a1	FP et HC	73	8	76	12	4
	MO b1g1g3	3x500	FoxA2	FP	72	1	46	50	3
	MO b1g1g3	3x500	Fspodin2	FP	79	3	6	72	19
	MO b1g1g3	3x500	radar	HC	76	13		69	18
	MO b1g1g3	3x500	dermo1	HC	76	4	76		20

C1: arrêt des structures axiales après l'anus
 C2: arrêt des structures axiales avant l'anus
 C3: pas de structures axiales

l'expression de *shh* est maintenue dans la notochorde et son expression dans la plaque du plancher n'est pas initiée (Fig.26 : A et B). Pour m'assurer de la nature notochordale du marquage *shh* chez les doubles morphants à 30 hpf, j'ai comparé son expression à celle de marqueurs spécifiques de la notochorde (*GS3706*) ou de la plaque du plancher (*fspondin2*). Pour cela, j'ai réalisé des doubles hybridations *in situ* fluorescentes (FISH) en utilisant les couples de sondes *GS3706/shh* ou *fspondin2/shh*. Chez les embryons sauvages, *shh* est co-exprimé avec le gène *fspondin2* dans la plaque du plancher et est exclu de la notochorde qui exprime *GS3706* (Fig.26 : C et E). Chez les doubles morphants, *shh* est co-exprimé avec le marqueur *GS3706* alors que son expression est absente de la plaque du plancher marquée par les transcrits *fspondin2* (Fig.26 : D et F). L'absence de FoxA2 et FoxA3 perturbe la dynamique d'expression de *shh* dans les structures de l'axe indiquant que la différenciation de ces tissus est incorrecte.

En conclusion, FoxA2 et FoxA3 sont indispensables au développement de la notochorde le long de l'axe AP. De plus, en absence de ces facteurs de transcription, les cellules notochordales résiduelles sont improprement différenciées et leur morphogénèse est fortement altérée.

- ***L'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 abolit le développement de la plaque du plancher et de l'hypochorde.***

Pour analyser les autres tissus de l'axe, j'ai utilisé une combinaison de sondes marquant : soit la plaque du plancher (*fspondin2* et *foxA2*), soit l'hypochorde (*dermo1* et *radar*), soit ces deux tissus simultanément (*col2a1*) (Fig.9 et table1A).

Chez les simples morphants FoxA3, l'analyse de l'ensemble de ces marqueurs indique que l'hypochorde et la plaque du plancher sont correctement développées (résultats non montrés). Ces résultats confirment que la simple inactivation de FoxA3 n'a pas d'effet sur le développement des structures axiales, à l'exception de la glande d'éclosion.

Chez les morphants FoxA2, l'expression des marqueurs de l'hypochorde, *radar* et *dermo1*, est indistinguable de celle des embryons sauvages (Fig. 9H et résultats non montrés). En revanche, celle des marqueurs de la plaque du plancher, *fspondin2* et *foxA2*, est discontinuée le long de l'axe AP, voire absente dans l'extrémité caudale des embryons MOFoxA2 (Fig. 24 G et résultats non montrés). L'expression du gène *col2a1* est à peine visible dans la plaque du plancher alors qu'elle marque correctement l'hypochorde (Fig. 24 F). Ces résultats sont en accord avec le phénotype connu des mutants *monorail* qui possèdent une plaque du plancher dont la différenciation est altérée (Norton et al., 2005).

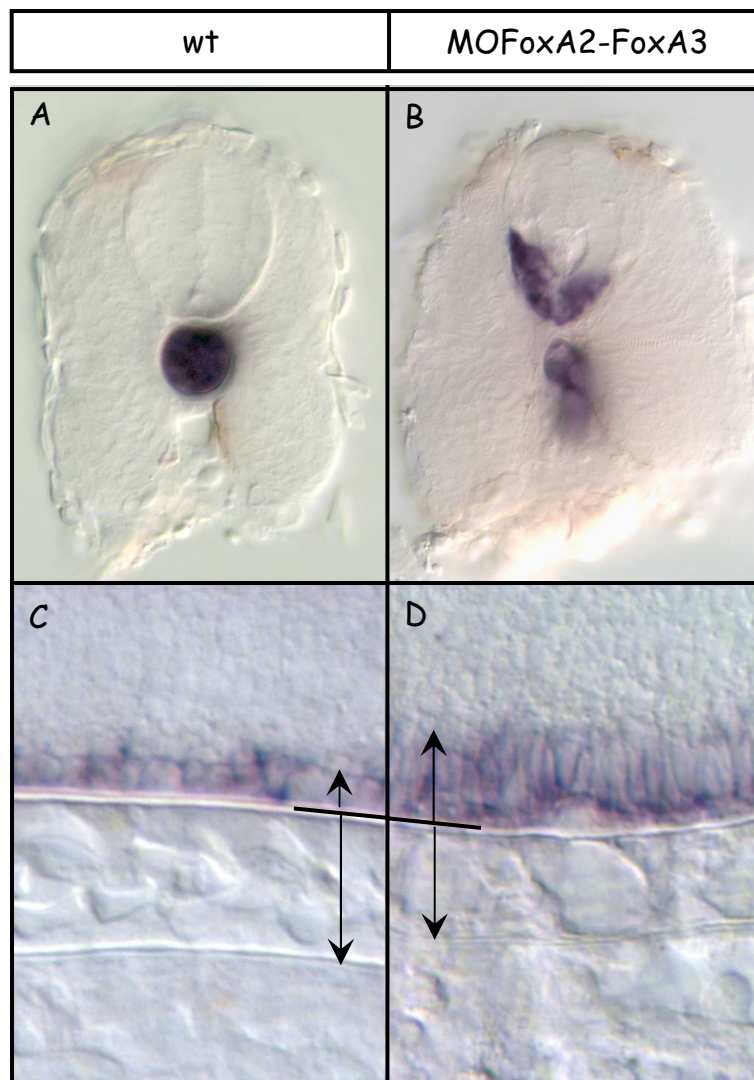
La double inactivation de FoxA2 et FoxA3 affecte considérablement le développement de la plaque du plancher et de l'hypochorde, et cela d'une façon jamais observée chez les simples morphants (Fig.24 et table1A). De plus, tout comme la notochorde, les parties postérieures de ces structures semblent être d'avantage affectées par l'absence de FoxA2 et FoxA3 que leur partie antérieure.

Chez la plupart des embryons MOFoxA2-FoxA3, la plaque du plancher ne se développe pas au-delà de l'anus, comme le révèle l'absence des transcrits *foxA2* et *fspondin2* dans cette région (C2, Fig.24 O et table1A). Pour 15 % des doubles morphants, cette structure est entièrement absente (C3, Fig.24 S et table1A). De plus, la forme des cellules de la plaque du plancher qui persistent chez les embryons MOFoxA2-FoxA3, est fortement modifiée. Au lieu d'être cubique, ces cellules adoptent une forme prismatique. Elles sont plus étroites du côté basal et plus allongées dans le sens apico-basal que les cellules de la plaque du plancher sauvages (Fig. 25 C et D).

En ce qui concerne l'hypochorde, les résultats obtenus sont moins clairs que pour la notochorde et la plaque du plancher, faute de marqueurs spécifiques. En effet, les gènes *dermo1* et *radar*, marquent non seulement l'hypochorde mais aussi les tissus sous jacents, le sclérotome et le système vasculaire respectivement. Compte tenu de ces limitations techniques, je n'ai pas distingué les classes C1 et C2 dans mon analyse. Chez les embryons MOFoxA2-FoxA3, l'expression de *dermo1* et *radar* dans l'hypochorde est soit interrompue, soit entièrement absente dans plus de la moitié des cas (Fig.24 : L, P et T ; Table 1A). La comparaison de ces marquages avec celui du gène *col2a1*, exprimé dans l'hypochorde et la plaque du plancher, a confirmé ces observations (Fig. 24 J, N et R).

Par ailleurs, la comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour la notochorde indique, qu'en absence de FoxA2 et FoxA3, la plaque du plancher et l'hypochorde ont tendance à être interrompues à un niveau antérieur à celui de la notochorde (comparer le pourcentage d'embryons appartenant aux classes C2 et C3 selon les marqueurs, Table 1A). Ces observations suggèrent que le développement de la plaque du plancher et de l'hypochorde le long de l'axe AP est plus sensible à l'inactivation de FoxA2 et FoxA3 que celui de la notochorde.

En conclusion, le développement de la plaque du plancher et de l'hypochorde, tout comme celui de la notochorde, requiert la présence des facteurs FoxA2 et FoxA3.

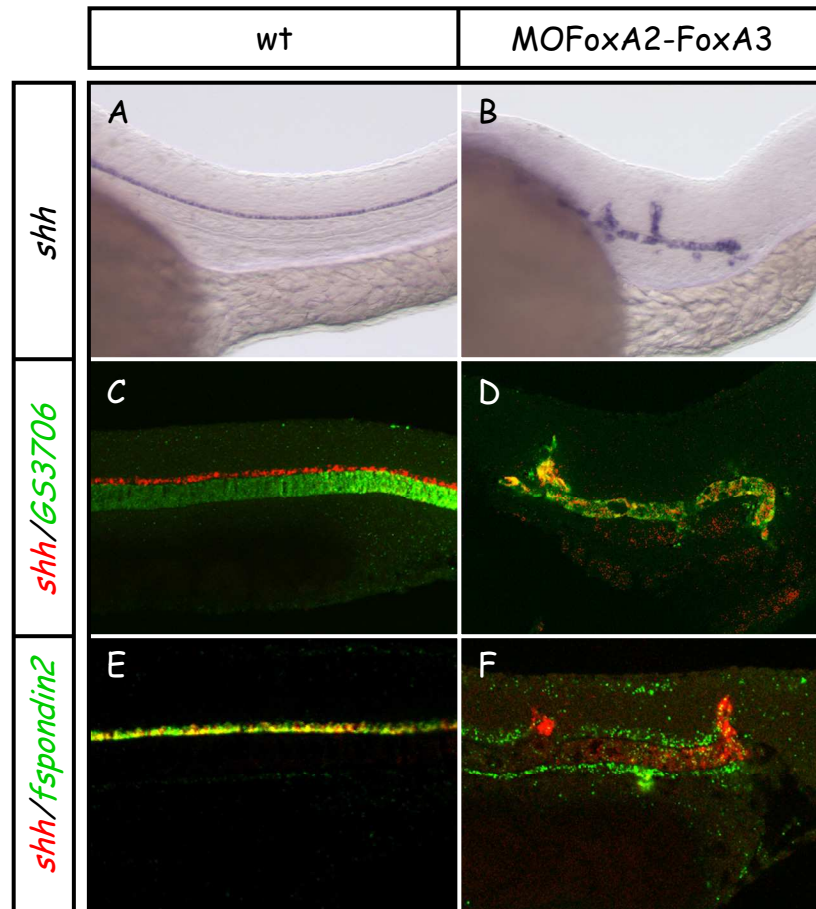


II-Figure 25 : L'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 affecte l'organisation et la morphogenèse des cellules de la notochorde et de la plaque du plancher.

Mise en évidence de l'aspect de la notochorde, marquée avec la sonde *GS3706*, en coupe transversale chez l'embryon sauvage (A) ou le double morphant FoxA2-FoxA3 (B). En absence de FoxA2 et FoxA3, les cellules de la notochorde se désorganisent localement et envahissent le tube neural sus-jacent (B).

Mise en évidence de la forme des cellules de la plaque du plancher, marquées avec la sonde *foxA2*, en vue latérale chez l'embryon sauvage (C) ou le double morphant FoxA2-FoxA3 (D). En absence de FoxA2 et FoxA3, les cellules de la plaque du plancher sont plus allongées (comparer les flèches hautes en C et D). Elles ont perdu leur forme cubique caractéristique (C) et présentent une forme prismatique (D). De plus, la notochorde est moins épaisse chez les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (comparer les flèches basses en C et D).

Les images sont orientées face dorsale en haut (A-D) et pôle antérieur à gauche (C et D).



II-Figure 26 : La perte simultanée de FoxA2 et FoxA3 modifie l'expression du gène *shh* à 30 hpf.

Analyse de l'expression de *shh* à 30 hpf, chez les embryons sauvages (A, C et E) ou les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (B, D et F) par une simple hybridation in situ (A et B), ou par des doubles hybridation in situ fluorescentes (FISH) réalisées avec les couples de sondes *shh*/*GS3706* (C et D) ou *shh*/*fspondin2* (E et F). Les sondes utilisées et les couleurs qui leur ont été attribuées sont indiquées dans les encadrés à gauche.

A 30hpf, chez les embryons sauvages, *shh* est exprimé dans la plaque du plancher avec le marqueur *fspondin2* (E) et son expression a disparu de la notochorde qui exprime le marqueur GS3706 (C). A l'inverse, chez les doubles morphants FoxA2-FoxA3, *shh* co-localise avec le marqueur notochordal GS3706 mais pas avec le marqueur *fspondin2*.

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, côté antérieur à gauche et face dorsale en haut.

- ***L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 affectent le développement des structures axiales le long de l'axe AP, de façon dose-dépendante:***

Au cours de mon analyse, j'ai remarqué que les parties postérieures des structures axiales sont plus souvent affectées que leurs parties antérieures suggérant qu'elles sont plus sensibles à une diminution de l'activité de FoxA2 et FoxA3. Pour analyser l'effet dose-dépendant de ces facteurs sur le développement des structures axiales le long de l'axe AP, j'ai injecté les morpholinos MO1g1g3 à des concentrations moins importantes (3x500 µM, table 1B).

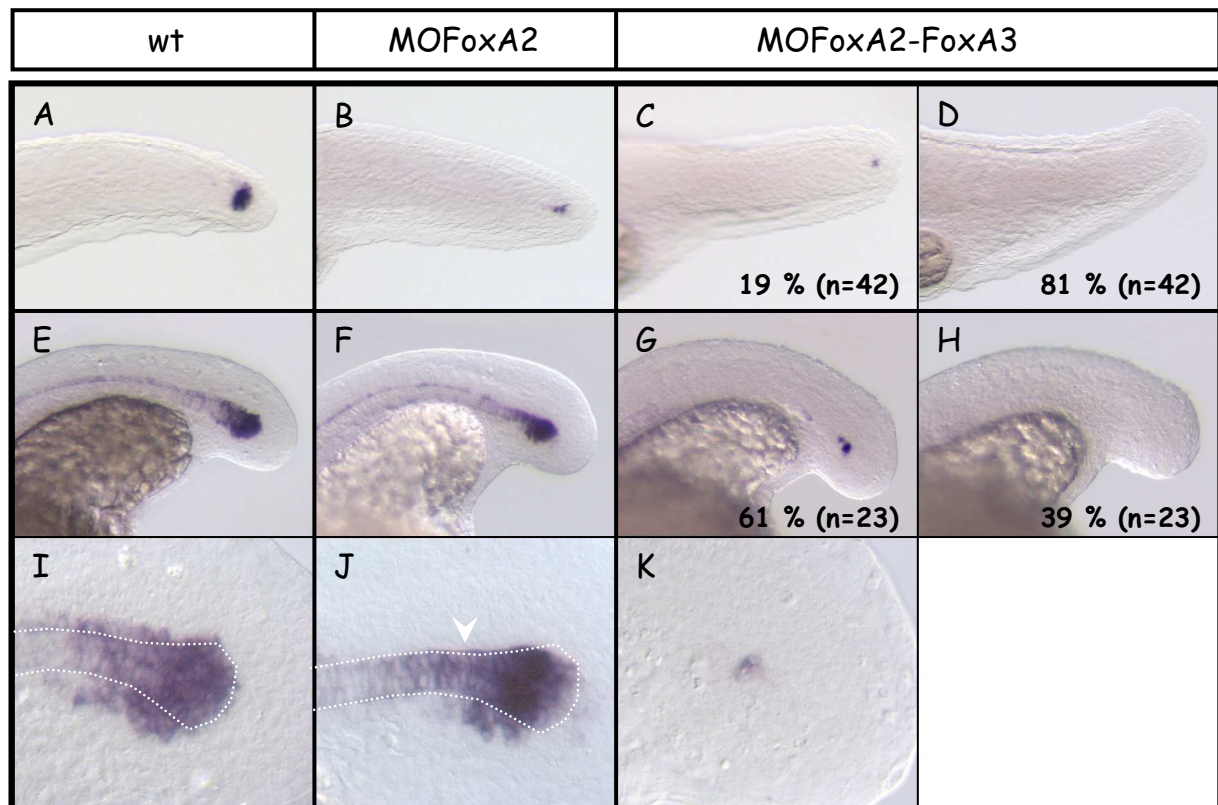
D'une façon générale, l'injection de doses plus faibles de morpholinos (3x500 µM) diminue la quantité d'embryons appartenant aux classes C2 et C3 et augmente le nombre d'embryons de la classe C1 (comparer table 1A et B).

L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 élimine progressivement et de façon dose-dépendante, le développement des structures axiales, de leur extrémité postérieure vers leur extrémité antérieure. Si la perte de ces facteurs affecte moins la partie rostrale des tissus de l'axe, c'est qu'il existe probablement d'autres molécules capables de promouvoir leur développement dans cette région.

- ***La charnière chordo-neurale est absente dans les doubles morphants FoxA2-FoxA3.***

La notochorde, la plaque du plancher et l'hypochorde du tronc et de la queue se développent à partir d'une population de précurseurs communs constituant la charnière chordo-neurale (CNH). La perte des facteurs FoxA2 et FoxA3 interrompt le développement de ces trois structures le long de l'axe AP. On peut supposer que ce phénotype est la conséquence d'un défaut dans la formation de la CNH à l'origine de ces tissus.

J'ai testé cette hypothèse en analysant l'expression du marqueur *flh* à 30 hpf. A ce stade, le gène *flh* est exprimé dans l'épiphyse et dans la CNH. Chez les simples morphants FoxA3, son expression dans la CNH n'est pas affectée alors qu'elle est légèrement diminuée chez les embryons MOFoxA2 (Fig.27 B et résultats non montrés). L'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 amplifie considérablement ce phénotype. En effet, 81 % des doubles morphants ne présentent aucune expression de *flh* à l'extrémité caudale alors que son expression dans l'épiphyse n'est pas affectée (Fig.27 D). Parmi les marqueurs analysés précédemment, *foxA2* et *dermo1* sont aussi exprimés dans la CNH chez les embryons sauvages. En absence de FoxA2 et FoxA3, cette expression disparaît (résultats non montrés). Pour savoir si ce phénotype est déjà présent au stade où le développement des structures axiales dépend de la présence de la CNH, j'ai analysé l'expression des marqueurs *foxA2* et *dermo1* en milieu de

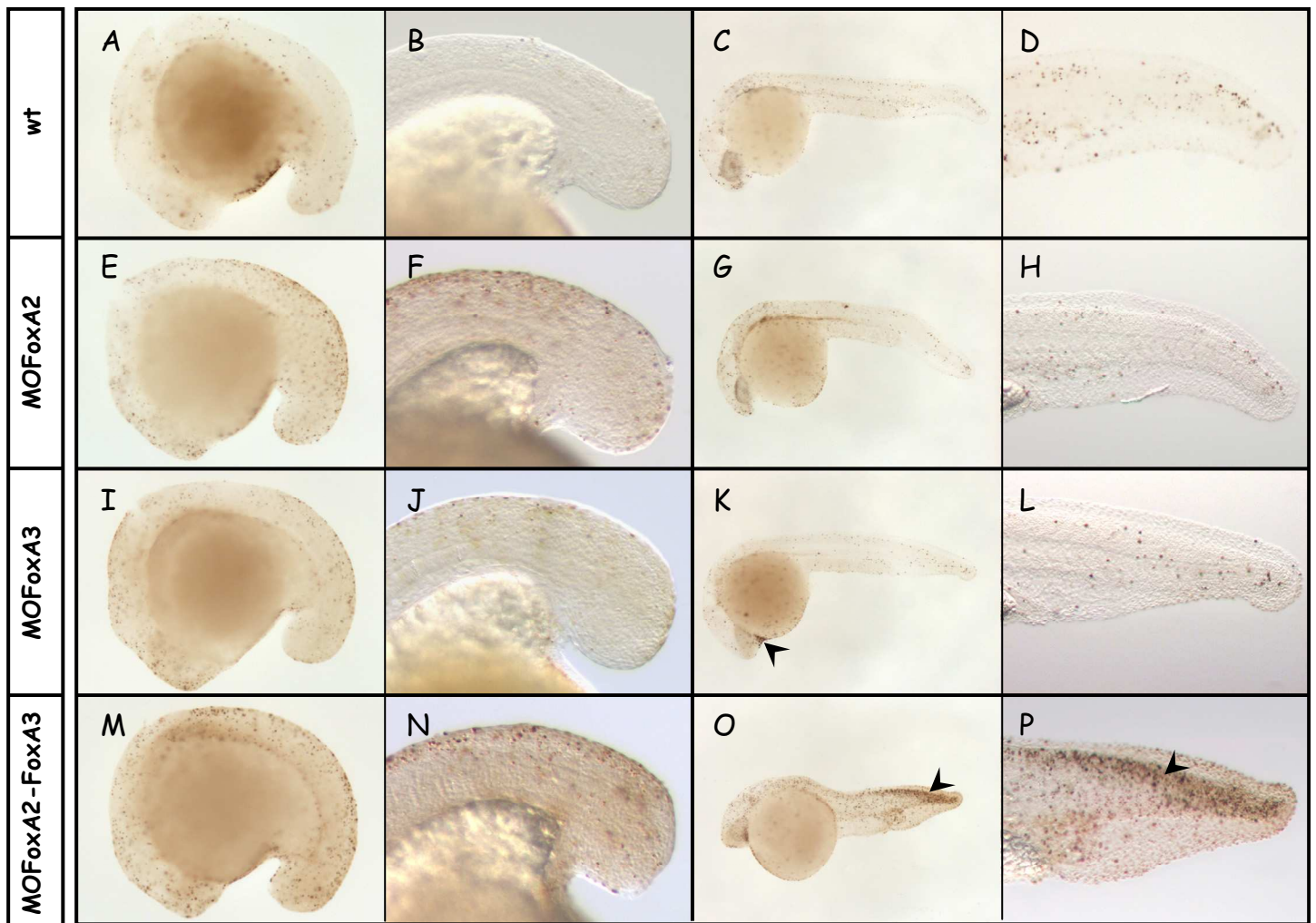


II-Figure 27 : L'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 abolit le développement de la Charnière Chordo-Neurale (CNH) dès la somitogénèse.

Expression des gènes *flh* à 30 hpf (A-D), et *foxA2* à 18 somites (E-K) dans la région de la CNH chez les embryons sauvages (A, E et I), les simples morphants FoxA2 (B, F et J) et les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (C, D, G, H et K). Les pourcentages en bas à droite des images C,D, G et H indiquent la quantité d'embryons ayant un phénotype similaire à celui présenté sur l'image correspondante et n désigne le nombre d'embryon analysé.

En absence de FoxA2, la taille de la CNH diminue à 30 hpf (B) alors que cette structure ne semble pas être affectée à 18 somites (comparer les pointillés en I et J). Chez les morphants FoxA2, seules les cellules de la plaque du plancher postérieures sont absentes (flèche en J). La double inactivation de FoxA2-FoxA3 amplifie ce phénotype et la plupart des embryons ne développent pas de CNH à 30 hpf (D). Ce phénotype est déjà présent au stade 18 somites (H). Pour les doubles morphants les moins affectés, seules quelques cellules de CNH persistent à l'extrémité caudale (C, G et K).

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, côté antérieur à gauche et face dorsale en haut. Les images en I,J et K sont des grossissements de la région caudale des embryons présentés en E, F et G.



II-Figure 28 : L'absence de structures axiales dans les doubles morphants FoxA2-FoxA3 ne résulte pas d'une importante mort cellulaire.

Mise en évidence des cellules en apoptose par TUNEL chez les embryons sauvages (A-D), les simples morphants FoxA2 (E-H), les simples morphants FoxA3 (I-L), et les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (M-P) au stade 14-16 somites (A, B, E, F, I, J, M et N) et à 30 hpf (C, D, G, H, K, L, O et P) .

Quelque soient les conditions testées, aucune apoptose importante n'est observée au niveau des structure axiales. Seules deux zones présentant une activité apoptotique importante sont visibles: la région correspondant au territoire de la glande d'éclosion chez les simples morphants FoxA3 (flèche en K), et le tube neural postérieur chez les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (flèches en O et P).

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, côté antérieur à gauche et face dorsale en haut. Les images en B, F, J, N, D, H, L et P sont des grossissements de la région caudale des embryons présentés en A, E, I, M, C, G, K et O.

somitogenèse pendant l'élongation de la queue. A ce stade, la taille de la CNH des embryons MOFoxA3 et MOFoxA2 est semblable à celle des embryons sauvages. Seule l'expression de *foxA2* dans les cellules de la plaque du plancher situées à proximité de la CNH est perdue chez les simples morphants FoxA2 (Fig.27 F et J). L'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 amplifie fortement ce phénotype. Chez 61 % des embryons FoxA2-FoxA3, la CNH est réduite à quelques cellules exprimant *foxA2*, et elle est entièrement absente chez les 39 % d'embryons restants (Fig. 27 G, K et H). Le marqueur *dermo1* est plus sensible à la perte de FoxA2 et FoxA3 puisque la totalité des embryons ne présentent aucune expression de ce gène dans la CNH (résultats non montrés).

En conclusion, l'inactivation de FoxA2 et FoxA3 abolit le développement de la charnière chordo-neurale et cela dès le milieu de la somitogenèse. Il est donc possible que la perte des structures axiales dans le tronc et la queue résulte de cette absence de CNH.

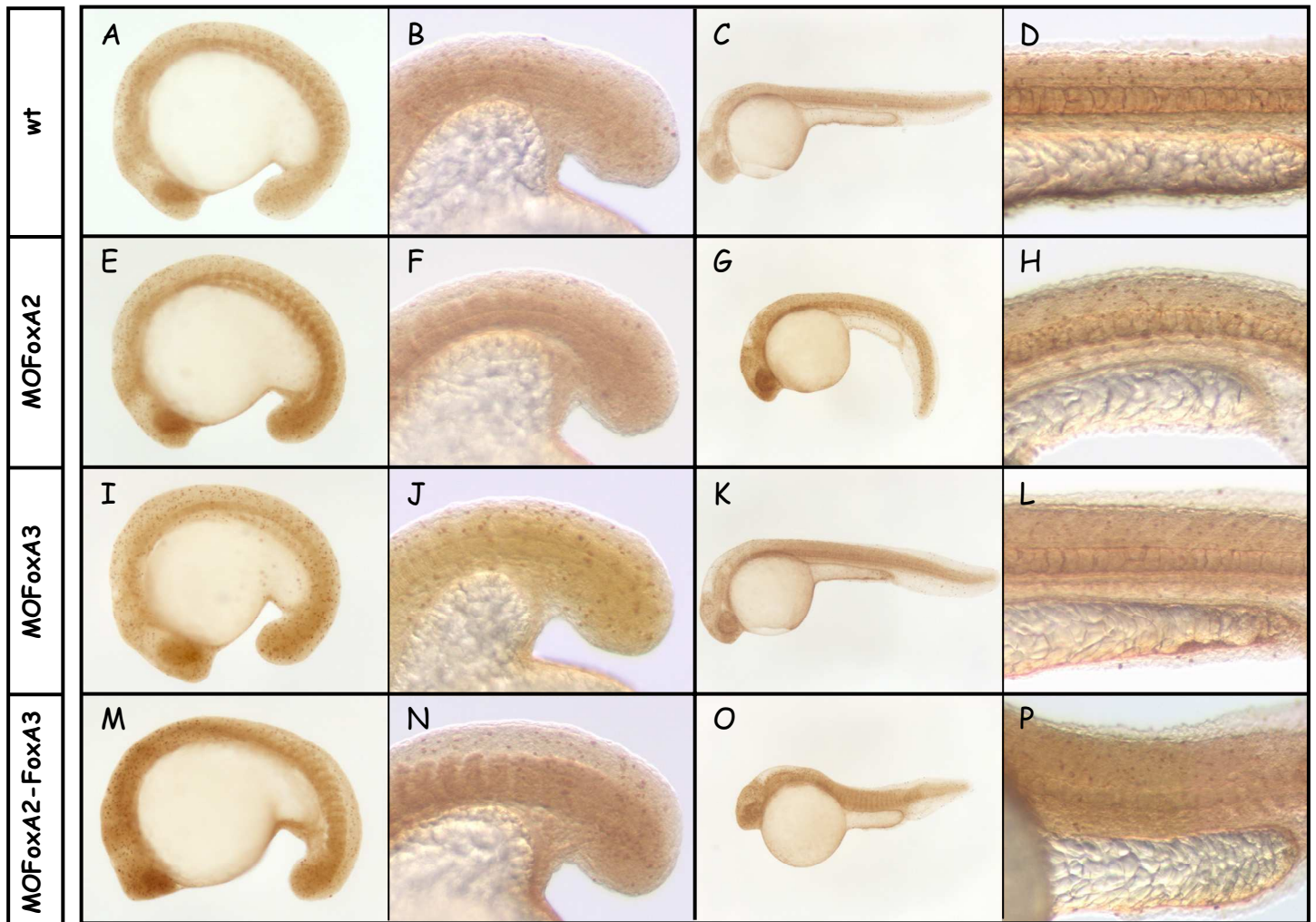
II.1.c. Analyse de l'apoptose et de la prolifération cellulaire :

- ***L'absence de structures axiales dans les doubles morphants FoxA2-FoxA3 ne résulte pas d'une mort cellulaire massive.***

Pour expliquer le phénotype des embryons MOFoxA2-FoxA3, l'hypothèse la plus simple est que les cellules des structures axiales et/ou celles de la CNH, meurent par apoptose. J'ai donc analysé l'activité apoptotique des cellules en absence de FoxA2, de FoxA3, ou de ces deux facteurs, par TUNEL. Cette étude a été réalisée sur des embryons de différents stades, couvrant le début de la gastrulation jusqu'à 30 h de développement.

Du début de la gastrulation (au stade *shield*) jusqu'au début de la somitogenèse (stade 1 à 2 somites), on distingue très peu de cellules en apoptose et ces dernières sont réparties de façon aléatoire dans l'embryon sauvage. Aucune modification remarquable n'est visible après la simple ou la double inactivation des facteurs FoxA2 et FoxA3 (résultats non montrés). En particulier, l'écusson embryonnaire, la CNH néoformée et l'axe dorsal des doubles morphants ne présentent pas un nombre plus important de cellules en apoptose.

Plus tard, pendant l'élongation de la queue (à 16 somites et à 30 hpf, Fig. 28), aucune zone de l'axe ne présente de mort cellulaire significative quelque soient les conditions testées. A 30 hpf, cependant, les doubles morphants FoxA2-FoxA3 montrent une forte activité apoptotique dans la partie dorsale du tube neural postérieur (Fig. 28 : O et P), Cette activité est déjà initiée à 16 somites (Fig 28 : M et N). La partie caudale des doubles morphants FoxA2-FoxA3 est dépourvue de structures axiales. La notochorde est une source importante de facteurs anti-



II-Figure 29 : L'absence de structures axiales dans les doubles morphants FoxA2-FoxA3 ne résulte pas d'une diminution importante de l'activité proliférative des cellules.

Mise en évidence des cellules mitotiques par des immunomarquages réalisés avec l'anticorps anti-phosphohistone H3 chez les embryons sauvages (A-D), les simples morphants FoxA2 (E-H), les simples morphants FoxA3 (I-L), et les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (M-P) au stade 14-16 somites (A, B, E, F, I, J, M et N) et à 30 hpf (C, D, G, H, K, L, O et P).

Quelle que soient les conditions testées, aucune diminution remarquable de la prolifération cellulaire n'est observable.

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, extrémité antérieure à gauche et face dorsale en haut. Les images en B, F, J, N, D, H, L et P sont des grossissements de la région caudale des embryons présentés en A, E, I, M, C, G, K et O.

apoptotiques, tels que Shh (Charrier et al., 2001; Charrier et al., 1999). Il est donc raisonnable de penser que cette apoptose massive est une conséquence indirecte de l'absence de notochorde plutôt qu'un effet spécifique dû à la perte de fonction de FoxA2 et FoxA3. De plus, le même phénotype apoptotique est observé chez les morphants Flh, qui ne possèdent pas de notochorde (résultats non montrés).

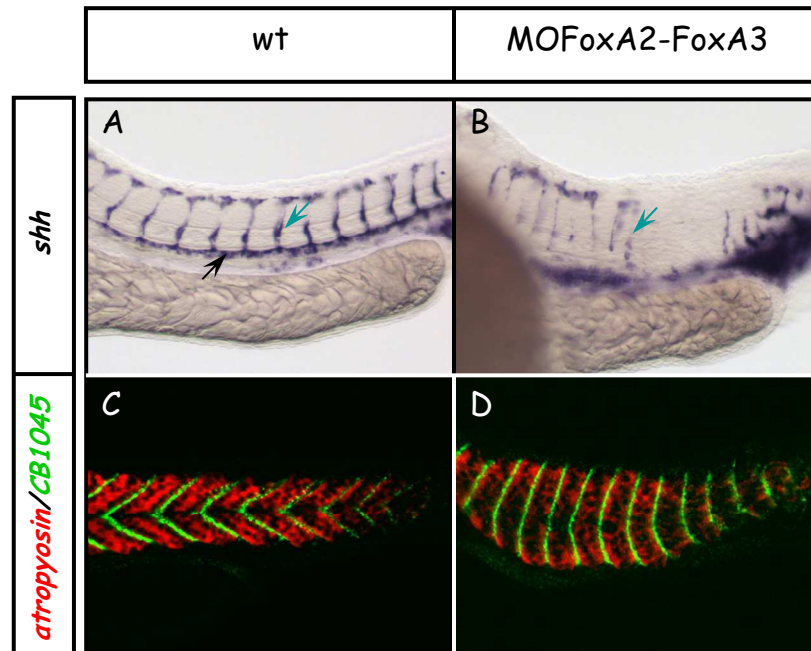
En conclusion, l'absence de structures axiales dans les doubles morphants FoxA2-FoxA3 ne résulte pas d'une mort cellulaire importante.

- ***L'absence de structures axiales dans les doubles morphants FoxA2-FoxA3 n'est pas la conséquence d'une diminution de la prolifération cellulaire.***

Une autre alternative pour expliquer la perte des structures axiales chez les doubles morphants FoxA2-FoxA3 à 30 hpf serait une diminution de la prolifération des cellules axiales et/ou de la charnière chordo-neurale. Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé des immunomarquages à l'aide d'un anticorps anti-phosphohistone H3 sur des embryons entiers. Comme précédemment, cette analyse a été réalisée à la fois sur des embryons sauvages et les embryons MOFoxA2, MOFoxA3 et MOFoxA2-FoxA3, et cela du début de la gastrulation jusqu'à 30 h de développement.

Du début de la gastrulation (au stade *shield*) jusqu'au début de la somitogenèse (1 à 2 somites), la plupart des cellules embryonnaires ont une forte activité proliférative et je n'ai observé aucune différence significative quelque soient les conditions testées (résultats non montrés). Il est intéressant de noter que chez les embryons sauvages, les cellules de la marge dorsale et de la ligne médiane ne prolifèrent pas d'avantage que celles du reste de l'embryon. Sur des embryons plus âgés, de 16 somites ou 30 hpf, je n'ai observé aucune zone présentant une diminution importante de la prolifération cellulaire quelque soient les conditions testées (Fig. 29).

D'une façon générale, les embryons immunomarqués à l'aide de l'anticorps anti-phosphohistone H3 présentent un bruit de fond important. Compte tenu de cette limitation technique et de la forte activité proliférative des cellules embryonnaires, il est possible que de faibles modifications de cette activité au niveau des cellules de l'axe n'aient pu être détectées. En conclusion, l'absence des facteurs FoxA2 et FoxA3 ne semblent pas provoquer de diminution notable de la prolifération cellulaire dans les cellules axiales qui pourrait être à l'origine de l'absence de ces structures à 30 hpf.



II-Figure 30 : Le développement du système vasculaire et des somites est fortement perturbé chez les morphants FoxA2-FoxA3.

Expression à 30 hpf, du marqueur *aquaporin* chez les embryons sauvages (A) ou les morphants FoxA2-FoxA3 (B). L'aorte dorsale (flèche noire) est absente et le développement de vaisseaux inter-segmentaires (flèche verte) est fortement perturbé en absence des facteurs FoxA2 et FoxA3.

Mise en évidence de la forme des somites à 30 hpf, les embryons sauvages (C) ou les morphants FoxA2-FoxA3 (D) par double FISH avec le couple de sondes fluorescentes *CB1045/atropomyosin*. En absence de FoxA2 et FoxA3, les somites perdent leur forme en chevron caractéristique.

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, pôle antérieur à gauche et face dorsale en haut.

II.2. L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 affecte le développement des structures voisines de l'axe :

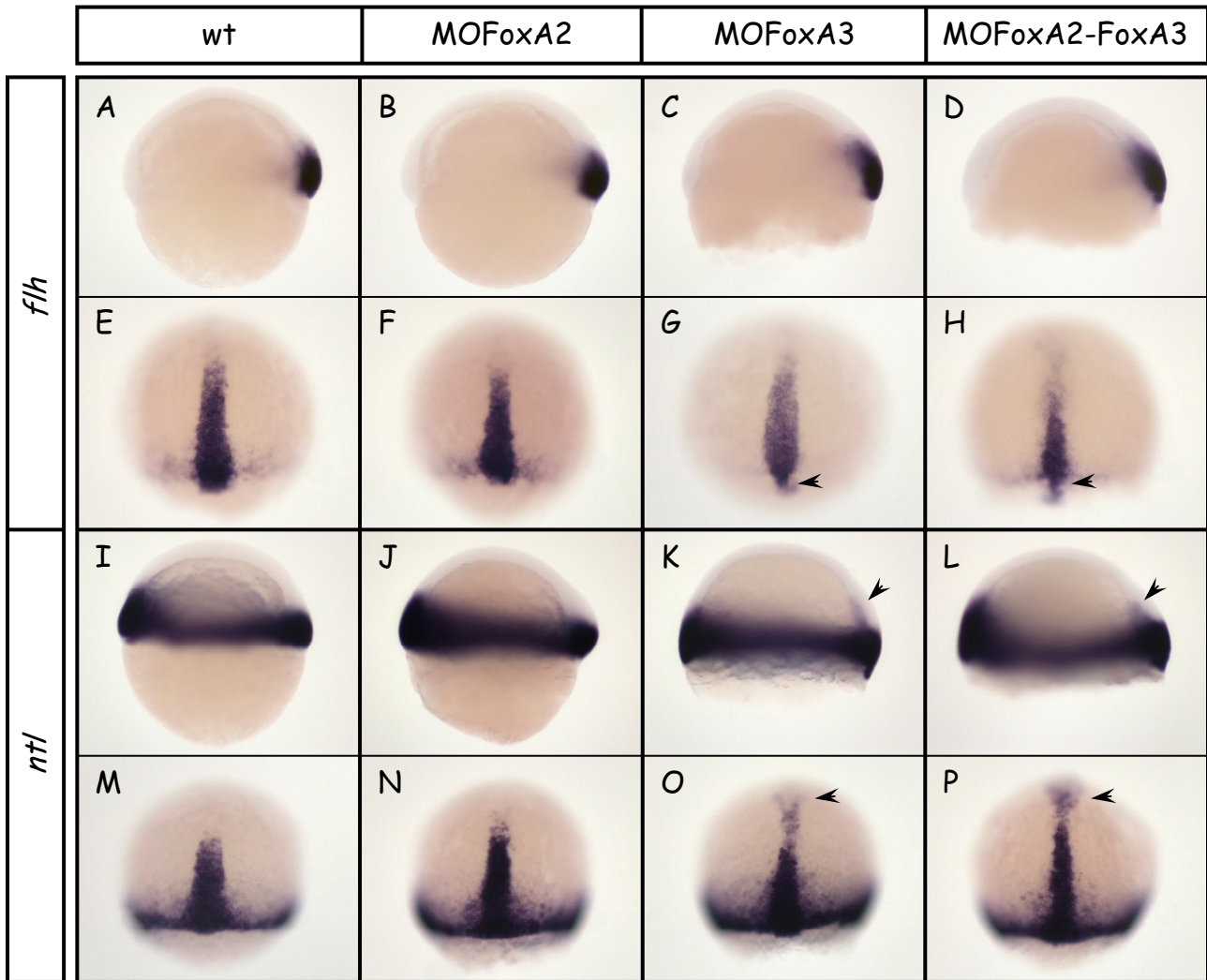
Les structures axiales sécrètent de nombreuses molécules diffusibles (p.ex. Shh et VEGF) qui sont impliquées dans le développement des tissus voisins tels que les somites ou les vaisseaux sanguins. Pour déterminer l'influence de la perte progressive des structures axiales, résultant de l'inactivation de FoxA2 et FoxA3, sur le développement de ces tissus, je les ai analysés par des hybridations *in situ*.

Le gène *aquaporin* est exprimé dans le système vasculaire à 30 hpf, en particulier dans les vaisseaux inter-segmentaires ainsi que l'aorte dorsale (Fig.30 A). L'inactivation de l'un ou l'autre des facteurs FoxA2 ou FoxA3 n'influence pas le développement de ces tissus (résultats non montrés). En revanche, leur inactivation simultanée a des effets importants sur le développement du système vasculaire (Fig.30 B). L'aorte dorsale est absente. En ce qui concerne les vaisseaux intersegmentaires, les défauts observés varient en fonction de la présence ou non de structures axiales. Dans la partie caudale, dépourvue de tissus axiaux, ces vaisseaux sont moins nombreux ou absents. Dans la partie antérieure qui possède une notochorde, ils sont présents mais mal organisés. Ces observations suggèrent que les structures axiales qui persistent dans les morphants FoxA2-FoxA3 ne sont pas fonctionnelles. La morphologie des somites a été mise en évidence en utilisant un couple de sondes fluorescentes, *CB1045/α-tropomyosin*. Le gène *CB1045*, qui code pour une protéine dont la fonction est inconnue, marque la frontière entre les somites tandis que l'*α-tropomyosin* est exprimé dans la totalité des muscles somitiques (Fig.30 C). Alors que les somites des simples morphants ont une forme en chevron, ceux des doubles morphants FoxA2-FoxA3 ne présentent plus cet aspect caractéristique (Fig.30 D). Ce défaut est présent sur toute la longueur de l'axe AP, indépendamment de la présence ou non de structures axiales.

En absence de FoxA2 et FoxA3 le développement du système vasculaire et des muscles somitiques est fortement perturbé. Ces phénotypes semblent être la conséquence de l'absence de structures axiales fonctionnelles le long de l'axe AP.

II.3. Les précurseurs de l'axe sont correctement induits mais pas maintenus pendant la gastrulation en absence de FoxA2 et FoxA3.

Les facteurs FoxA2 et FoxA3 agissent de façon redondante dans le développement des structures axiales. Alors que l'absence d'un seul de ces facteurs n'a pas d'effet sur le développement de la ligne médiane, leur inactivation simultanée abolit progressivement le développement des structures axiales le long de l'axe AP. Ce phénotype ne résulte pas d'une



II-Figure 31 : Le chordamésoderme est correctement induit pendant le gastrulation en absence de FoxA2 et FoxA3.

Expression des marqueurs précoces du chordamésoderme, *flh* (A-H) et *ntl* (I-P), chez les embryons sauvages (A, E, I et M), les morphants FoxA2 (B, F, J et N), les morphants FoxA3 (C, G, K et O) et les morphants FoxA2-FoxA3 (D, H, L et P) au stade *shield* (A-D et I-L) et à 80 % d'épibolie (E-H et M-P). Pour chaque marqueur, la(les) structure(s) mise(s) en évidence est(ont) indiquée(s) entre parenthèses. NC: notochorde, FP: plaque du plancher, HC: hypochorde.

flh est correctement exprimé au stade *shield* quelque soient les conditions testées (A-D). A 80 % d'épibolie, son expression est maintenue, excepté dans la partie postérieure (flèche en G et H) du territoire axial qui est légèrement plus étroit chez les embryons MOFoxA3 et les embryons MOFoxA2-FoxA3. Comme *flh*, l'expression de *ntl* est peu affectée en absence de FoxA2 et FoxA3. Les seuls défauts observés sont: un maintien de l'expression de *ntl* dans la plaque préchordale (flèche en G,L, O et P), et un territoire axial légèrement plus étroit chez les embryons MOFoxA3 et les embryons MOFoxA2-FoxA3.

Les embryons sont présentés en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (A-D et I-L), ou en vue dorsale (E-H et M-P).

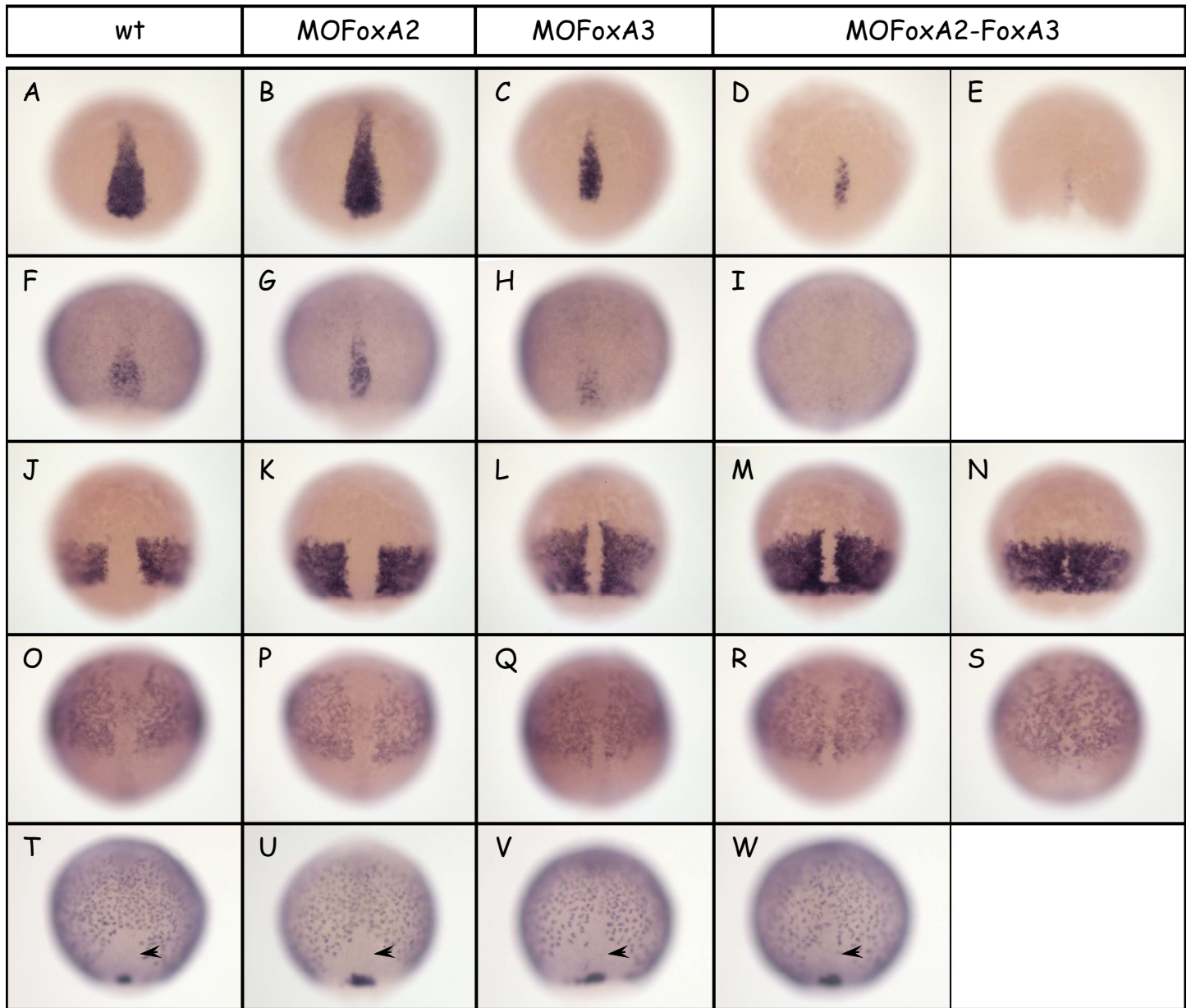
mort cellulaire intensive ou d'une diminution massive de la prolifération cellulaire suggérant que c'est la quantité initiale de tissu, destiné à faire de l'axe, qui est affectée. Les structures axiales se développent à partir de précurseurs communs qui sont spécifiés avant et pendant la gastrulation. A ce stade, ces cellules expriment les gènes *foxA2* et *foxA3*. Pour savoir si l'absence des structures axiales à 24 hpf, dans les morphants FoxA2-FoxA3, résulte d'un défaut précoce dans leur mise en place, j'ai analysé, à l'aide de différents marqueurs, l'induction et le développement de ces tissus pendant la gastrulation.

II.3.a. L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 n'affecte pas l'induction des précurseurs de l'axe au début de la gastrulation.

Les gènes *flh* et *ntl* sont des marqueurs précoces de l'axe, induits dans ces cellules en réponse à une stimulation par la voie Nodal. Afin de déterminer si le chordamésoderme est correctement induit en absence de FoxA2 et de FoxA3, j'ai analysé l'expression de *flh* et de *ntl* pendant la gastrulation (au stade *shield* et à 80 % d'épibolie).

Au stade *shield*, le gène *flh* est correctement exprimé dans l'écusson embryonnaire quelque soient les conditions testées (Fig. 31 : A à D). De même, l'absence des facteurs FoxA2 et FoxA3 ne diminue pas l'expression du gène *ntl* dans ce territoire (Fig. 31 : I à L). La seule modification visible est un maintien de l'expression de *ntl* dans le territoire préchordal chez les morphants FoxA3 et FoxA2-FoxA3, qui résulte de l'absence de FoxA3 (Fig.31 : K et L). Ces résultats indiquent que le chordamésoderme est correctement induit en début de gastrulation.

A 80 % d'épibolie, l'expression de ces deux gènes dans le mésoderme axial des embryons MOFoxA2 est indistinguable de celle des embryons sauvages (Fig. 31 : F à N). De façon surprenante, alors que les simples morphants FoxA3 ne présentent aucun phénotype notochordal à 24 hpf, ce territoire est légèrement plus étroit à 80 % d'épibolie (Fig. 31 : G et O). Cette observation suggère que l'absence de FoxA3 affecte légèrement le territoire axial pendant la gastrulation mais que ce défaut est compensé par la présence de FoxA2 au cours du développement embryonnaire. Chez les doubles morphants FoxA2-FoxA3, le territoire notochordal présumé est présent mais il est plus étroit que chez les embryons sauvages (Fig. 31 : H et P). De plus, sa partie postérieure/marginale est dépourvue de l'expression *flh* chez les embryons MOFoxA2-FoxA3 (Fig. 31 H). Cette observation suggère que la partie postérieure du chordamésoderme est plus sensible à la perte des facteurs FoxA2 et FoxA3 que sa partie antérieure.



II-Figure 32 : Pendant la gastrulation, le mésoderme axial disparaît au profit du mésoderme paraxial en absence de FoxA2 et FoxA3.

Expression à 80 % d'épibolie, des marqueurs du mésoderme axial, *dermo1* (A-E) et *pak1* (F-I), du mésoderme paraxial, *myf5* (J-N) et *twist1*(O-S), et de l'endoderme, *sox17* (T-W) chez les embryons sauvages (A, F, J, O et T), les simples morphants FoxA2 (B, G, K, P et U), les simples morphants FoxA3 (C, H, L, Q et V) et les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (D, E, I, M, N, R, S et W).

Chez les morphants FoxA3 et les morphants FoxA2 et FoxA3, le mésoderme axial disparaît progressivement (C-E et H-I) et le mésoderme paraxial s'étend dorsalement (L,M,Q et R) jusqu'à fusionner le long de la ligne médiane (N et S). Ce phénotype n'est pas visible chez les simples morphants FoxA2 (B, G, K, P et U). L'endoderme n'est pas affecté quelque soient les conditions testées (T-W).

Tous les embryons sont présentés en vue dorsale, pôle animal en haut.

En conclusion, l'absence de structures axiales à 24 hpf, suite à l'inactivation concomitante de FoxA2 et FoxA3, ne résulte pas d'un défaut dans l'induction de ces tissus mais plutôt dans leur maintien au cours de la gastrulation.

II.3.b. Le territoire notochordal présomptif n'est pas maintenu au cours de la gastrulation en absence de FoxA2 et FoxA3.

Les résultats précédents suggèrent que le territoire notochordal n'est pas maintenu pendant la gastrulation. Pour confirmer cette observation, j'ai analysé l'expression des marqueurs notochordaux *dermol* et *pak1*.

A 80 % d'épibolie, le gène *dermol* marque spécifiquement les précurseurs de la notochorde sur toute la longueur AP de l'axe (Fig. 32 A). En revanche, l'expression du gène *pak1* est limitée à la partie postérieure/marginale du territoire présomptif de la notochorde (Fig. 32 F). L'expression de ces deux marqueurs reste inchangée chez les simples morphants FoxA2 (Fig. 32 : B et G). En revanche, leur expression, faiblement diminuée chez les embryons MOFoxA3 (Fig.32 : C et H), est presque entièrement éliminée suite à l'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 (Fig.32 : D, E et I). La sensibilité du territoire notochordal, à la perte des facteurs FoxA2 et FoxA3, n'est pas la même le long de l'axe AP. Alors que l'expression du marqueur *pak1* est entièrement éliminée dans les embryons MOFoxA2-FoxA3, celle de *dermol* a tendance à persister dans quelques cellules de l'axe.

En conclusion, le maintien du territoire notochordal pendant la gastrulation dépend de la présence des facteurs FoxA2 et FoxA3. Dès le stade gastrula, cette dépendance n'est pas homogène le long de l'axe AP et la partie postérieure de la notochorde est plus sensible à l'absence de FoxA2 et FoxA3 que sa partie antérieure.

II.4. Le mésoderme paraxial est étendu dorsalement et fusionne le long de la ligne médiane en absence de FoxA2 et FoxA3.

Le territoire mésodermique axial disparaît pendant la gastrulation en absence de FoxA2 et FoxA3. Par ailleurs, aucune activité apoptotique massive n'est observée dans ce territoire. Si les cellules de l'axe ne meurent pas et qu'elles ne maintiennent pas l'expression des marqueurs notochordaux, alors que deviennent-elles ? Pour tenter de répondre à cette question, j'ai analysé le développement des tissus adjacents à l'axe pendant la gastrulation par des hybridations *in situ*.

A 80 % d'épibolie, le marqueur somitique *myf5* est exprimé dans le mésoderme situé de part et d'autre de la partie postérieure de l'axe des embryons sauvages (Fig.32 J). Chez les embryons MOFoxA2, cette expression est semblable à celle des embryons sauvages (100 % n=35; Fig.32 K). En revanche, chez les embryons MOFoxA3, les bords latéraux de ce territoire sont rapprochés dorsalement (46 % n=33 ; Fig.32 L). Ce phénotype est amplifié par l'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 et on observe chez ces embryons une fusion partielle du mésoderme paraxial le long de la ligne médiane (34 % n=38; Fig.32 M). Dans les cas les plus extrêmes, cette fusion est totale (6 % n=38; Fig.32 N).

Pendant la gastrulation, le gène *twist1* est exprimé dans le mésoderme céphalique situé de part et d'autre de la partie antérieure de l'axe (Fig.32 O). Alors que ce territoire n'est pas modifié par la perte de FoxA2, il est étendu dorsalement en absence de FoxA3 (Fig.32 : P et Q). Comme précédemment, ce phénotype est amplifié par la perte simultanée de FoxA2 et FoxA3 et il arrive que les embryons MOFoxA2-FoxA3 présentent un mésoderme céphalique fusionné le long de la ligne médiane (Fig. : R et S).

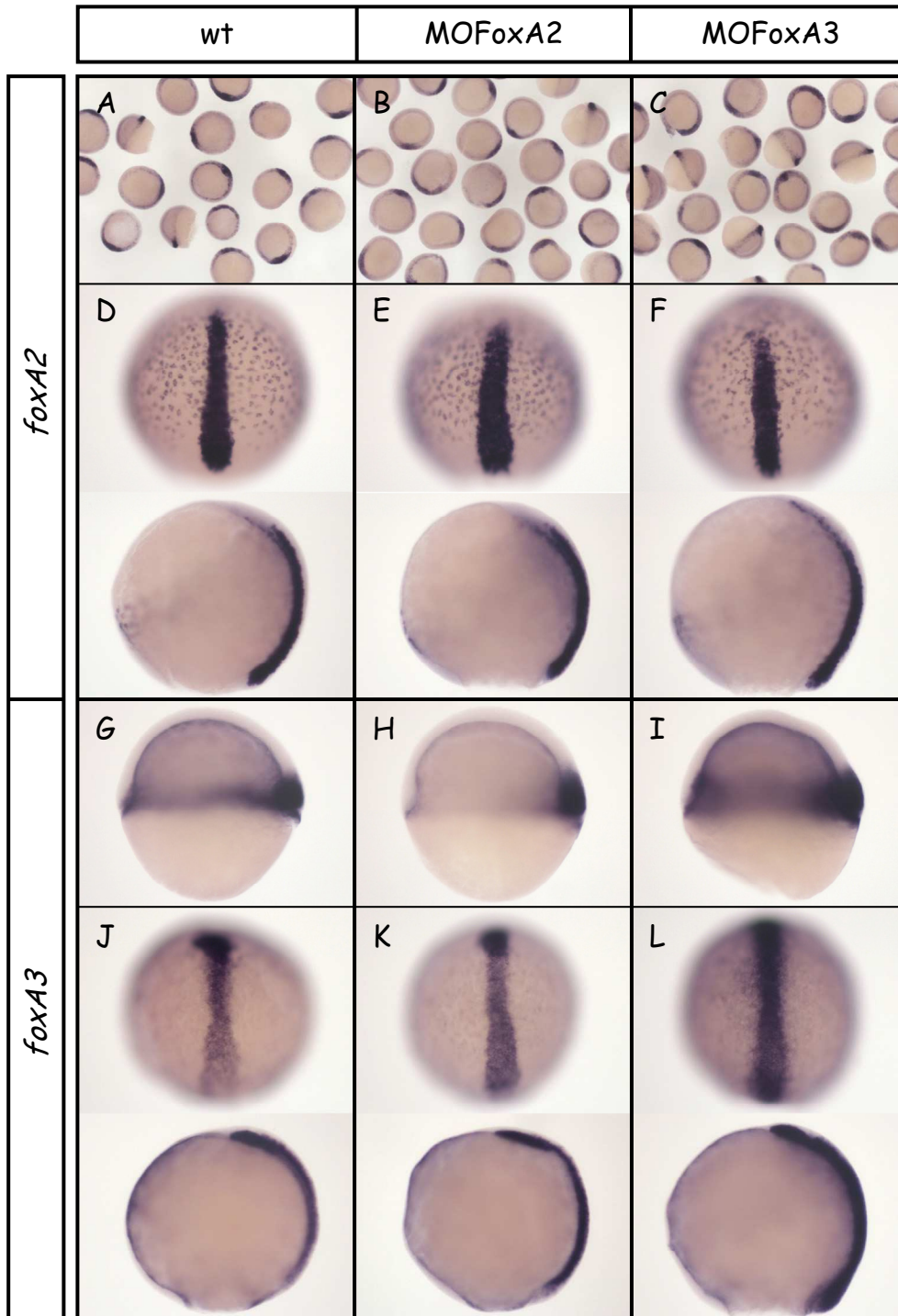
En conclusion, en absence de FoxA2 et FoxA3 les tissus axiaux ne sont pas maintenus pendant la gastrulation et à la place, le mésoderme paraxial se développe le long de la ligne médiane.

II.5. L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 n'affecte pas le développement de l'endoderme

Outre les structures axiales, les gènes de la famille *foxA* sont importants pour le développement de l'endoderme chez les vertébrés. Chez le poisson zèbre, le gène *foxA2* est exprimé dans l'endoderme pendant la gastrulation et à 30 hpf les transcrits des deux gènes *foxA2* et *foxA3* sont présents dans l'intestin. Ces observations laissent penser que ces facteurs de transcription pourraient participer au développement de l'endoderme. Pour tester cela, j'ai analysé l'expression du marqueur précoce de l'endoderme *sox17* pendant la gastrulation.

A ce stade, aucune modification de l'organisation des cellules endodermiques au sein de l'embryon ou de leur quantité n'est observée quelque soient les conditions testées (Fig. 32 : T à W). Les facteurs FoxA2 et FoxA3 ne sont pas requis pour le développement de l'endoderme pendant la gastrulation.

Sur la face dorsale des embryons sauvages, on remarque que les cellules endodermiques sont exclues de la partie postérieure de l'axe (flèches Fig. 32 : T à W). Contrairement aux observations faites pour le mésoderme paraxial, ce territoire axial reste dépourvu de cellules endodermiques en absence de FoxA2 et FoxA3. Ces observations suggèrent que l'activité des



II-Figure 33 : Les expressions de FoxA2 et FoxA3 sont indépendantes l'une de l'autre.

Expression foxA2 (A-F) et foxA3 (G-L) chez les embryons sauvages (A, D, G, et J), les morphants FoxA2 (B, E, H, et K), les morphants FoxA3 (C, F, I et L) au stade *shield* (A-C et G-I) ou à 90 % d'épibolie (D-F et J-L).

L'inactivation de FoxA2 n'affecte pas l'expression de foxA3, ni sa propre expression quelque soit le stade analysé. L'inactivation de FoxA3 n'a pas d'effet sur l'expression de foxA2 quelque soit le stade analysé. En revanche, l'absence de FoxA3 augmente sa propre expression dès le stade *shield* (I et L).

Les embryons sont présentés en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (G-I et images du bas en D-F et J-L), ou en vue dorsale (images du haut en D-F et J-L),

facteurs de transcription FoxA2 et Foxa3 ne concerne que le feuillet mésodermique pendant la gastrulation.

II.6. Les expressions de FoxA2 et FoxA3 sont indépendantes l'une de l'autre.

Chez la souris l'expression du gène *foxA1* est en partie régulée par le facteur Foxa2 indiquant que les gènes de la famille *foxa* sont capables de se réguler mutuellement (Duncan et al., 1998). J'ai tenté de mettre en évidence d'éventuelles relations régulatrices entre les gènes *foxA2* et *foxA3*. Pour cela, j'ai analysé l'expression de ces deux gènes en absence de FoxA2 ou de FoxA3 pendant la gastrulation.

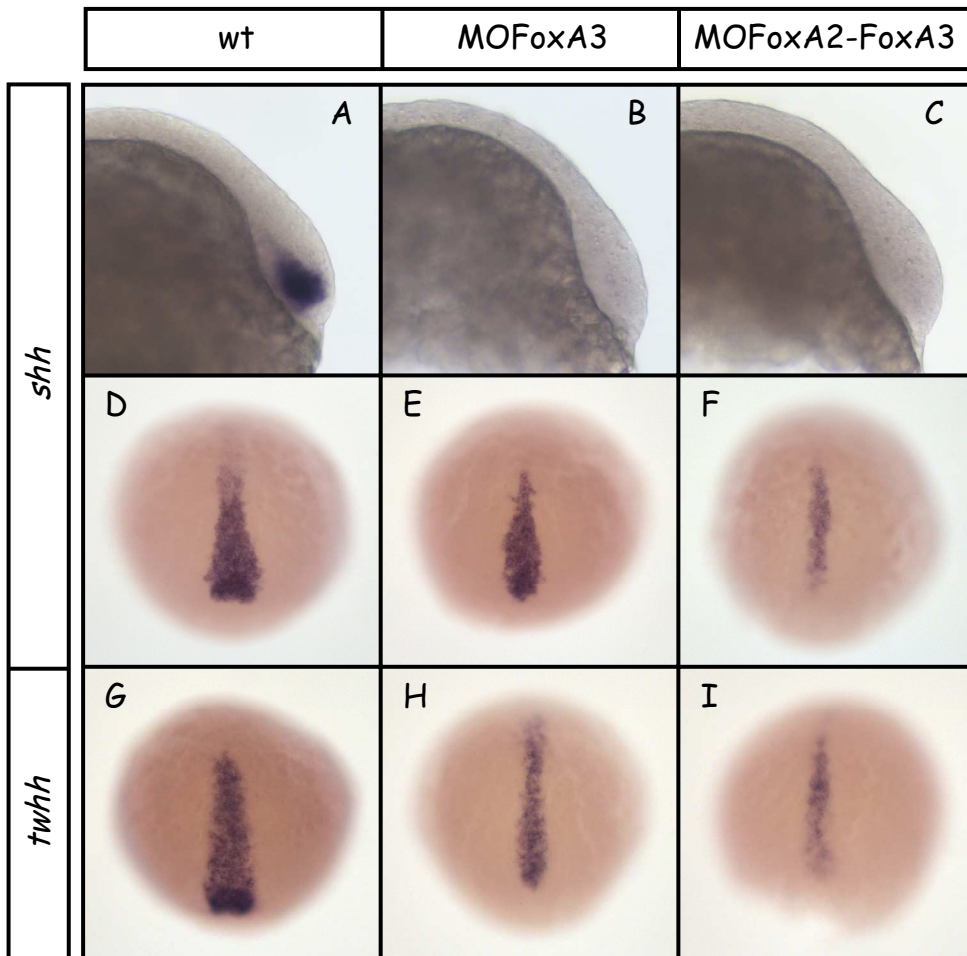
L'expression de *foxA3* débute pendant la période blastulienne, bien avant celle de *foxA2* qui est initiée au début de la gastrulation. Au stade *shield* et à 80 % d'épibolie, l'expression de *foxA2* n'est pas modifiée par l'absence de FoxA3 (Fig.33 : C et F). L'induction et le maintien de l'expression de *foxA2* sont indépendants de la présence de FoxA3. De plus, l'inactivation de FoxA2 ne modifiant pas sa propre expression, ce gène n'est pas l'objet d'une boucle d'autorégulation (Fig.33 : B et E).

En ce qui concerne *foxA3*, son expression pendant la gastrulation n'est pas régulée par le facteur FoxA2 (Fig.33 : H et K). En revanche, son expression augmente fortement en absence du facteur FoxA3 et cela dès le stade *shield* (Fig.33 : I et L). L'analyse des morphants FoxA3 à plus fort grossissement révèle que l'expression de *foxA3*, qui marque l'hypoblaste et la cellules épiblastiques immédiatement sus-jacentes chez les embryons sauvages, est étendue dans toute la couche épiblastique dorsale (résultats non montrés). Ces informations indiquent que le gène *foxA3* est l'objet d'une boucle d'autorégulation négative. L'inactivation de FoxA3, contrairement à FoxA2, nécessite l'injection d'une combinaison de deux morpholinos très concentrés. Si l'absence de FoxA3 dé-réprime sa propre expression, il est compréhensible que son inactivation nécessite de telles doses de morpholinos.

En conclusion, les facteurs FoxA2 et FoxA3 ne régulent pas leur expression mutuellement. Seul *foxA3* est l'objet d'une boucle d'autorégulation négative.

II.7. L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 affecte de façon importante la voie de signalisation Hedgehog pendant la gastrulation.

La voie de signalisation Hedgehog, dont les ligands sont sécrétés au niveau des structures de la ligne médiane, est essentielle à la différenciation des tissus voisins de l'axe. Les gènes *sonic hedgehog* (*shh*) et *tiggy winkle hedgehog* (*twhh*) codent pour deux ligands de cette voie.

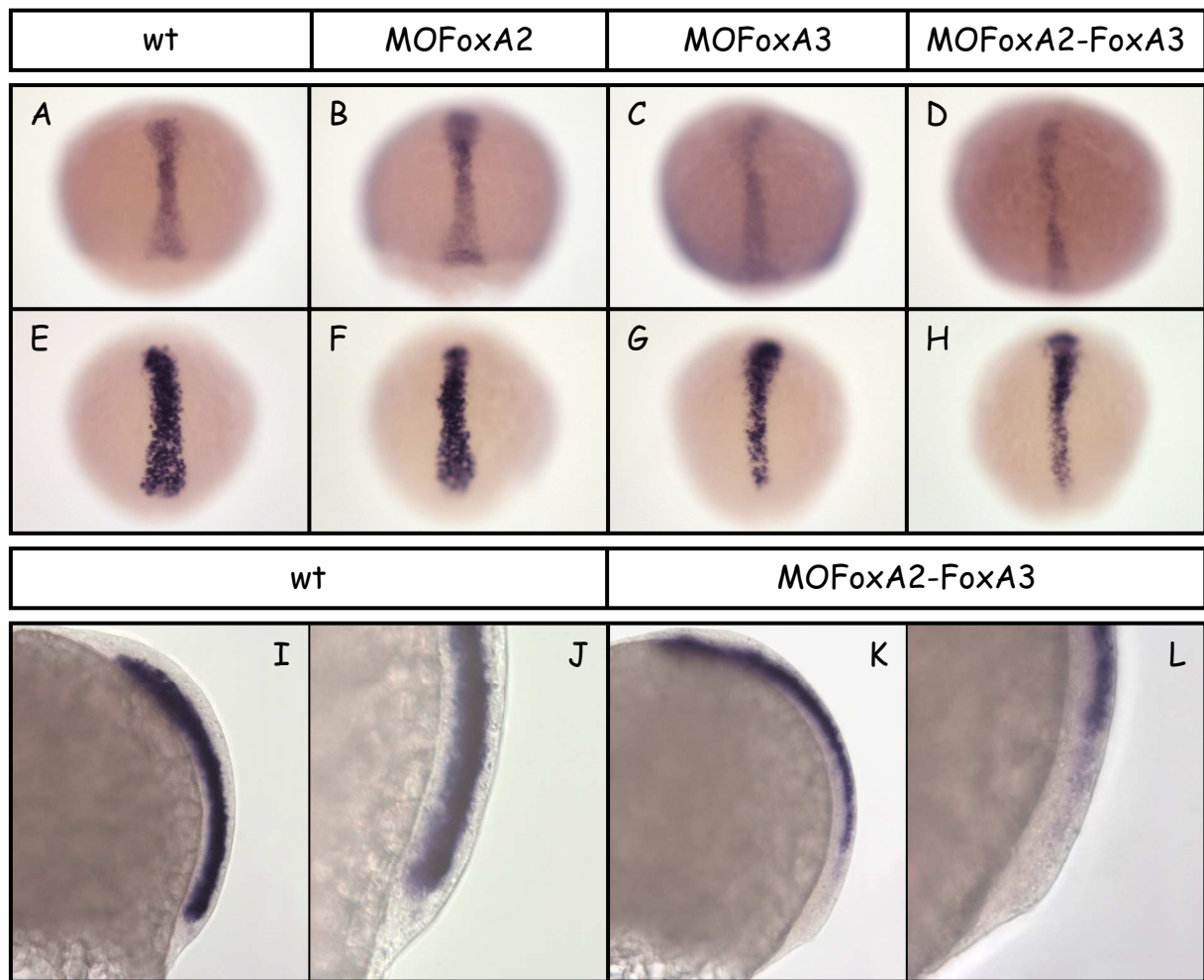


II-Figure 34 : L'expression des membres de la voie Hedgehog est fortement perturbée en absence des facteurs FoxA2 et FoxA3.

Expression *shh* (A-F) et *twhh* (G-I) chez les embryons sauvages (A, D et G), les morphants FoxA3 (B, E et H) et les morphants FoxA2-FoxA3 (C, F et I) à 60 % d'épibolie (A-C) et à 80 % d'épibolie (D-I).

L'expression de *shh* n'est pas initiée à 60 % d'épibolie en absence de FoxA3, chez les embryons MOFoxA3 et MOFoxA2-FoxA3 (B et C), et à 80 % d'épibolie son expression est diminuée (E et F). La même diminution est observée à 80 % d'épibolie pour les transcrits *twhh* (H et I).

Les embryons sont présentés en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (A-C) ou en vue dorsale (D-I).



II-Figure 35 : L'activité de la voie Nodal diminue dans l'épiblaste postérieur en absence des facteurs FoxA2 et FoxA3.

Expression *cyclops* (A-D) et *lefty2* (E-L) chez les embryons sauvages (A, E, I et J), les morphants FoxA2 (B et F), les morphants FoxA3 (C et G) et les morphants FoxA2-FoxA3 (D, H, K et L) à 80 % d'épibolie.

L'expression de *cyclops* ne semble pas être affectée par l'absence de FoxA2 ou FoxA3 (B et C). Seule une légère diminution de son expression est visible suite en absence de ces deux facteurs (D). Les transcrits *lefty2* sont absents de l'épiblaste postérieur des embryons MOFoxA3 et MOFoxA2-FoxA3 (G, H, K et L). L'expression de *lefty2* n'est pas modifiée chez les embryons MOFoxA2.

Les embryons sont présentés en vue dorsale, pôle animal en haut (A-H) ou en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (I-L).

Leur expression débute au stade *shield* et marque les précurseurs de la notochorde pendant la gastrulation.

L'absence de FoxA3 abolit l'expression initiale de *shh* dans l'écusson embryonnaire (Fig. 34B). A 80 % d'épibolie, bien qu'elle soit diminuée, l'expression de *shh* est néanmoins présente dans l'axe des morphants FoxA3 (Fig. 34 E). Les mêmes résultats sont obtenus pour *twhh* (Fig. 34 H). Ces observations suggèrent qu'en absence de FoxA3, l'initiation de l'expression de *shh* et *twhh* est retardée. L'inactivation de FoxA2 n'affecte pas l'expression de ces deux gènes, cependant elle amplifie le phénotype résultant de la perte de fonction de FoxA3. Ainsi, à 80 % d'épibolie, l'expression de *shh* et *twhh* est fortement diminuée chez les doubles morphants (Fig. 34 F et I).

Les facteurs FoxA2 et FoxA3 sont donc essentiels à l'induction et au maintien de l'expression des ligands de la voie Hedgehog. Plus largement, ces résultats indiquent que l'axe qui se développe en absence de FoxA2 et FoxA3 a une activité Hedgehog fortement altérée.

II.8. L'activité de la voie Nodal est affectée dans la partie postérieure de l'axe des doubles morphants FoxA2-FoxA3 pendant la gastrulation.

Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, la voie Nodal est responsable de l'induction et de la régionalisation AP du mésoderme axial. Pour voir si l'absence de structures axiales à 24 hpf dans les morphants FoxA2-FoxA3 résulte d'un défaut de la signalisation Nodal, j'ai analysé l'expression du ligand *cyclops* et de son inhibiteur compétitif *lefty2*.

L'expression de *cyclops* n'est presque pas affectée par l'absence de FoxA2 ou FoxA3 (Fig. 35 : A à C). Seule une légère diminution de la largeur de son domaine d'expression est décelable chez les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (Fig. 35D). Contrairement à *cyclops* qui est exprimé dans l'hypoblaste axial à l'origine de la notochorde, les transcrits *lefty2*, au même stade, sont exclus de l'hypoblaste et marquent l'épiblaste donnant le neurectoderme ventral (Fig. 35 : I et J). A 80 % d'épibolie, *lefty2* n'est plus exprimé dans la partie postérieure de l'axe en absence de FoxA3 (Fig. 35 : G, H, K et L). Le gène *lefty2* est un gène cible de la voie Nodal. Ces résultats montrent que l'activité de la voie Nodal est fortement diminuée en absence de FoxA3 dans la partie postérieure du neurectoderme ventral.

II.9. Conclusions :

Les facteurs FoxA2 et FoxA3 fonctionnent de façon redondante dans la formation des structures axiales. En effet, alors que la simple inactivation de FoxA2 ou FoxA3 affecte uniquement la différenciation de la plaque du plancher ou de la glande d'éclosion

respectivement, l'absence simultanée de ces deux facteurs élimine de façon dose-dépendante l'ensemble des structures axiales. A 30 hpf, la notochorde, la plaque du plancher et l'hypochorde disparaissent progressivement de l'axe AP et les seules cellules qui persistent dans la partie antérieure sont improprement différenciées. Cette disparition ne résulte pas d'un excès d'apoptose ou d'une baisse de la prolifération cellulaire au cours du développement embryonnaire, ni d'un défaut dans l'induction du mésoderme axial. En revanche, le ce tissu n'est pas maintenu pendant la gastrulation. Le mésoderme axial, dont l'activité signalisatrice est altérée, voit sa taille diminuer au profit du mésoderme paraxial qui s'étend dorsalement. En conclusion, les facteurs FoxA2 et FoxA3 sont indispensables au maintien et à la différenciation des structures de la ligne médiane au cours du développement embryonnaire.

III. Détermination de l'activité des facteurs FoxA2 et FoxA3 par des sur-expressions généralisées ou localisées.

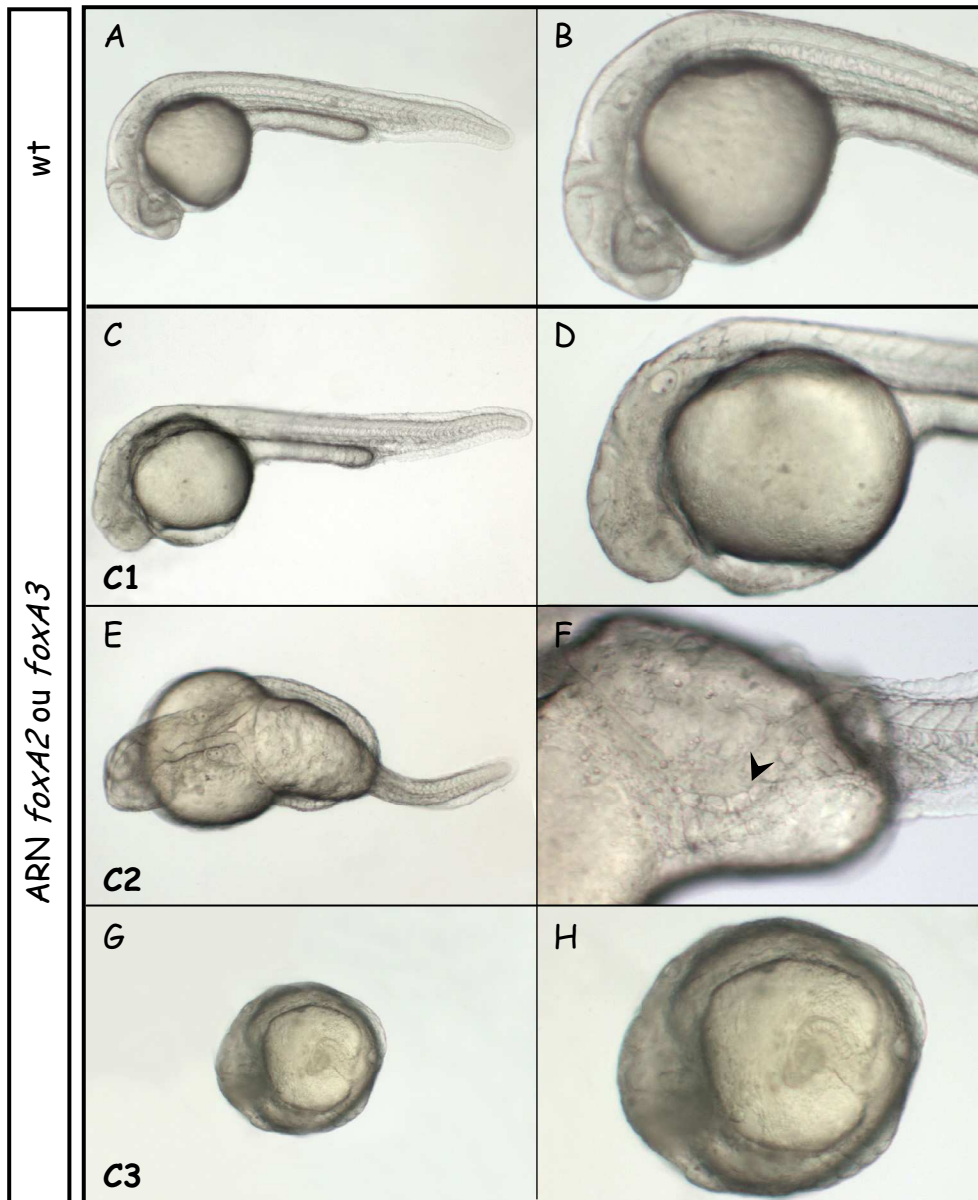
L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 m'a permis de démontrer que ces facteurs de transcription sont indispensables au développement des structures axiales. Cependant, le mécanisme par lequel ces protéines agissent sur le développement des tissus de l'axe reste à élucider. Afin d'obtenir de plus amples informations sur l'activité de ces molécules, j'ai réalisé des expériences de gain de fonctions en injectant les ARN *foxA2* ou *foxA3* dans l'embryon de poisson zèbre.

III.1. Caractérisation du phénotype résultant de la surexpression généralisée de *foxA2* et/ou *foxA3* :

III.1.a. La sur-expression de *foxA2* ou *foxA3* entraîne une duplication partielle de l'axe dorsal des embryons à 30 hpf.

Pour déterminer les concentrations optimales d'ARN à utiliser, j'ai injecté une gamme croissante d'ARN *foxA2* ou *foxA3* allant de 12,5 à 200 ng/μL dans la réserve vitelline d'embryon au stade 1 cellule. Alors que l'injection de l'ARN *foxA3* produit un phénotype fort dès 25 ng/μL, celle de *foxA2* induit un phénotype de même force pour une concentration 4 fois supérieure indiquant que l'ARN *foxA3* est plus efficace que celui de *foxA2*.

L'injection de l'ARN *foxA3* produit une gamme de phénotypes (classes C1 à C3, Fig.36 et Table2). Pour une faible concentration d'ARN (12,5 ng/μL), les embryons présentent une altération du développement de la partie antérieure de la tête (C1, Fig. 36 : C et D). Ces embryons de classe C1 présentent des défauts allant d'une microphthalmie à une anophthalmie souvent associée à une perte du télencéphale. L'augmentation des doses d'ARN *foxA3* produit une scission de l'axe dorsal d'intensité variable. Soit cette division n'est visible qu'au niveau du tronc et les embryons présentent une queue correctement développée (C2, Fig. 36 : E et F) ; soit elle concerne la totalité de l'axe embryonnaire et interfère avec l'élongation de la queue, produisant des embryons en forme de boules (C3, Fig.36 : G et H). L'observation attentive de ces axes « scindés » suggère la présence de notochorde dans chacune de leurs parties latérales. La sur-expression de l'ARN *foxA2* conduit à des phénotypes similaires (Table2) indiquant que les facteurs FoxA2 et FoxA3 ont des activités biologiques semblables.



II-Figure 36 : La surexpression généralisée de *foxA2* ou *foxA3* entraîne une scission de l'axe dorsal à 30 hpf.

Embryons sauvages à 30 hpf (A et B). Embryons injectés à 1 cellule avec les ARN *foxA2* ou *foxA3* et analysés à 30 hpf (C-H).

La surexpression de *foxA2* ou *foxA3* conduit à 3 classes phénotypiques. Les embryons de classe C1 ne développent pas les structures les plus antérieures (B et C). Les embryons de classe C2 ont un axe dorsal scindé au niveau du tronc et développent une queue (E et F). Chez les embryons de classe C3, cette scission est plus importante, la queue ne s'allonge pas et les embryons sont en forme de boules (G et H).

Les embryons sont présentés en vue latérale, pôle antérieur à gauche et face dorsale à droite (A, B, C, D et F) ou en vue dorsale, pôle antérieur à gauche (E, G et H). Les images en B, D, F et H sont des agrandissements des embryons présentés en A, C, E et G.

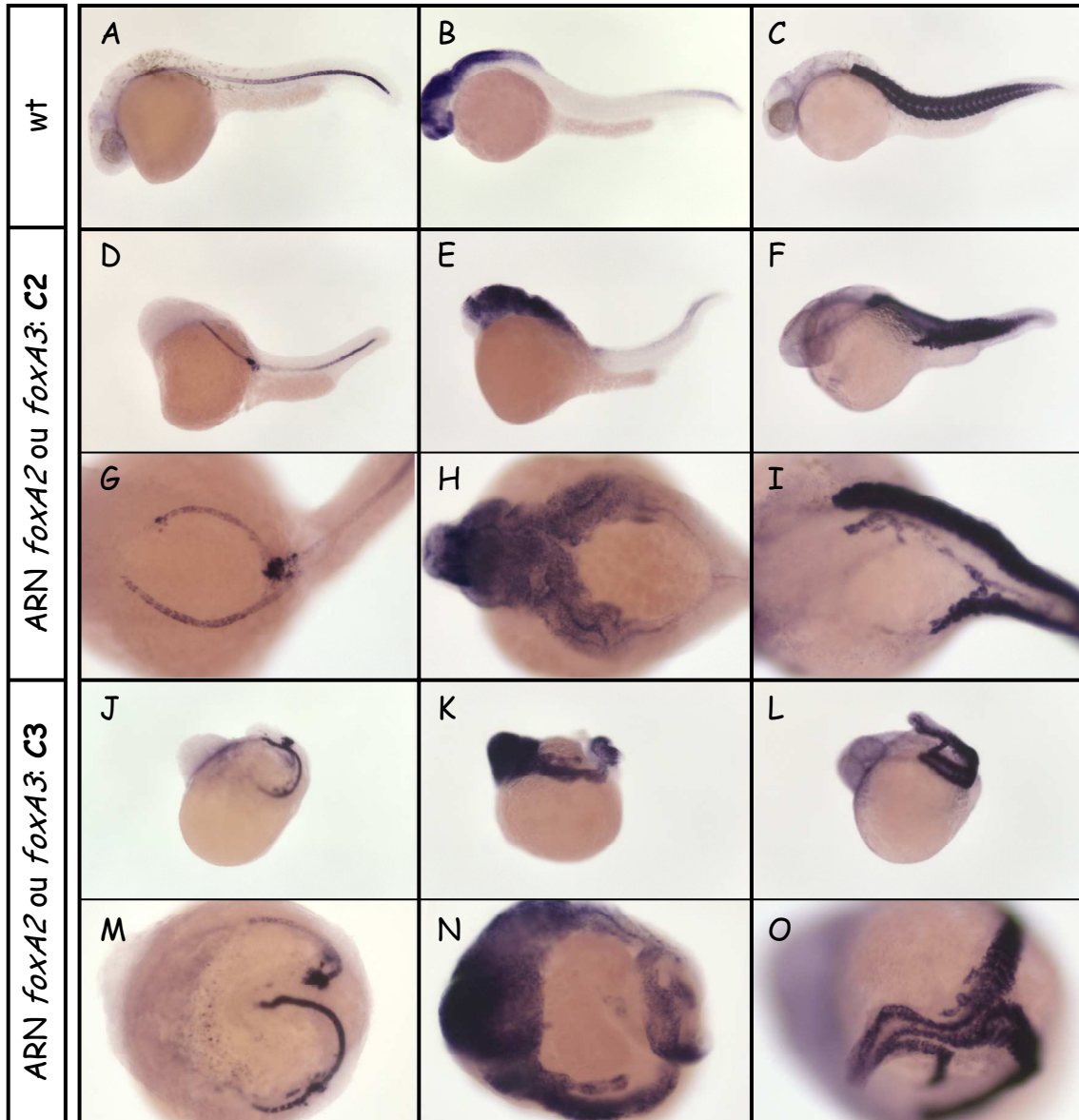
Table 2

2	ARN injecté	stade	concentration (ng/ μ L)	n	Phénotype (%)			
					wt	C1	C2	C3
	FoxA3	1 cellule	12.5	67	84	12	4	0
	FoxA3	1 cellule	25	217	7	33	19	41
	FoxA3	1 cellule	50	42	0	24	31	45
	FoxA3	8-16 cellules	25	187	10	6	42	42
	FoxA2*	1 cellule	100	75	24	32	19	25
	FoxA2**	8-16 cellules	100	77	5	4	40	51

*: Cette injection d'ARN FoxA2 produit 6 % d'embryons présentant des axes secondaires partiels

** : Cette injection d'ARN FoxA2 produit 3 % d'embryons présentant des axes secondaires partiels

C1: microphthalmie/anophtalmie
C2: axe scindé au niveau du tronc et queue allongée
C3: scission de l'axe et défaut de l'élongation de la queue



II-Figure 37 : La surexpression généralisée de *foxA2* ou *foxA3* produit une duplication partielle de l'axe dorsal à 30 hpf.

Expression à 30 hpf des marqueurs de la notochorde, *GS3706* (A, D, G, J et M), du tissu neural, *sox19* (B, E, H, K et N), des somite, *α -tropomyosin* (C, F, I, L et O) chez les embryons sauvages (A-C) et les embryons surexprimant *foxA2* ou *foxA3* appartenant aux classes C2 (D-I) ou C3 (J-O).

Les axes « scindés » résultant de la surexpression de *foxA2* ou *foxA3* sont composés d'une notochorde, d'un tube neural et de somites et correspondent donc à une duplication partielle de l'axe dorsal.

Les embryons sont présentés en vue latérale, pôle antérieur à gauche et face dorsale à droite (A-F et J-L) ou en vue dorsale, pôle antérieur à gauche (G-I et M-O). Les images en G, H, I, M, N et O sont des agrandissements des embryons présentés en D, E, F, J, K et L.

Pour mieux caractériser la nature et la composition des axes « scindés » obtenus, j'ai réalisé des hybridations *in situ* à l'aide de marqueurs de la notochorde (*GS3706*), du système nerveux (*sox19*) et des somites (*α tropomyosin*).

L'analyse de ces marqueurs à 30 hpf révèle que chacune des parties latérales des axes scindés, résultant de la sur-expression de *foxA2* ou *foxA3*, est constituée d'une notochorde, d'un tube neural et de somites (Fig. 37).

La division de l'axe dorsal concernant à la fois le mésoderme axial, paraxial et le système nerveux, cette analyse suggère, qu'au-delà d'une scission, il s'agit d'avantage d'une duplication partielle de l'axe embryonnaire.

III.1.b. La sur-expression de *foxA2* ou *foxA3* perturbe le développement de la glande d'éclosion à 30 hpf.

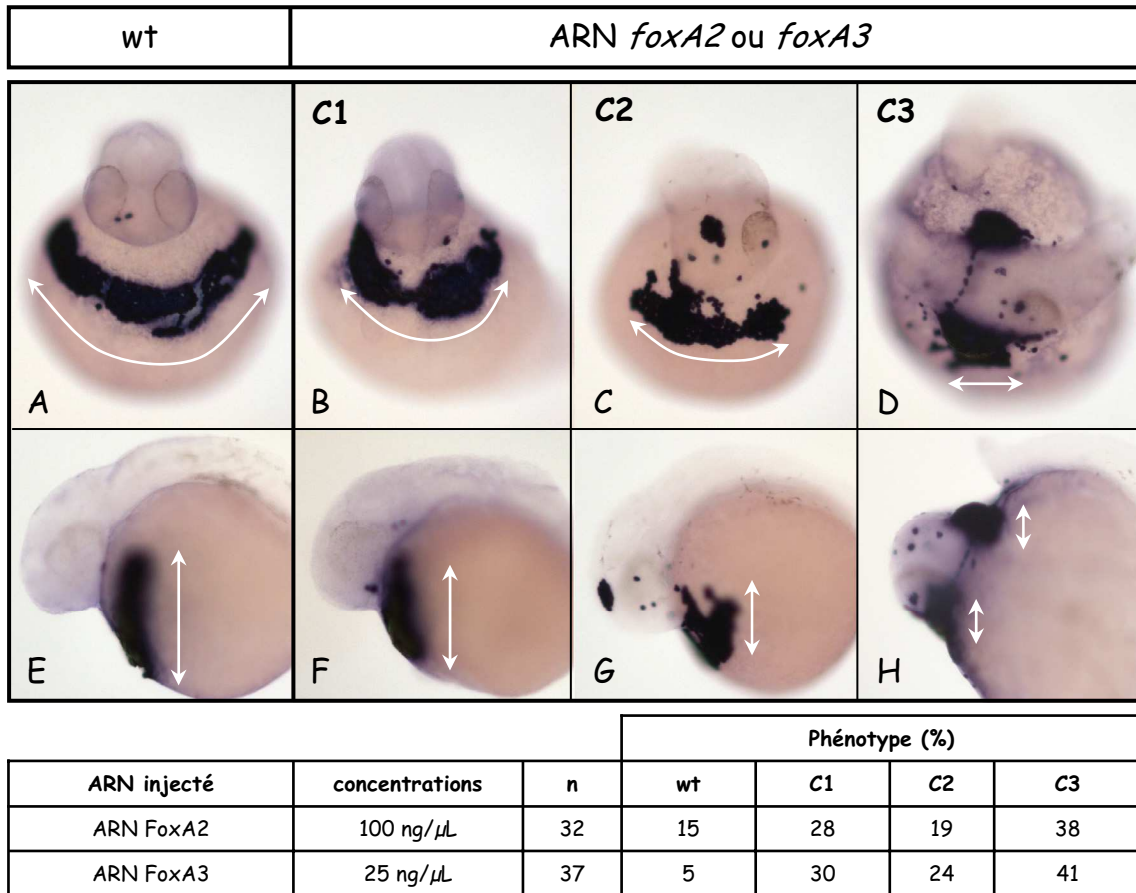
L'absence de FoxA3 empêchant la différenciation de la plaque préchordale en glande d'éclosion, j'ai analysé le développement de cette structure suite à la sur-expression de l'ARN *foxA3* à 30 hpf (Fig.38).

Comme le révèle le marqueur *hgg1*, la sur-expression de *foxA3* perturbe profondément le développement de la glande d'éclosion à 30 hpf (Fig.38). Les embryons sont distribués en trois classes phénotypiques de force croissante (C1 à C3 ; Fig.38). Plus le phénotype est fort, moins la glande d'éclosion est étendue à la surface de la réserve vitelline, elle reste à proximité de la tête (C1 et C2 ; Fig.38 : BF et CG). Dans les cas les plus extrêmes, elle est accolée à la structure céphalique. Dans ces embryons, la glande d'éclosion apparaît fragmentée et ses cellules sont présentes à la fois dans l'encéphale ainsi qu'en amont et/ou en aval de cette structure (C3 ; Fig.38 : D et H). Les mêmes résultats ont été obtenus pour les embryons sur-exprimant *foxA2*.

L'analyse de ces phénotypes suggère que la sur-expression des facteurs de transcription *foxA2* ou *foxA3* interfère avec la migration des cellules constituant la glande d'éclosion.

III.1.c. La duplication partielle de l'axe des embryons sur-exprimant *foxA2* ou *foxA3* ne résulte pas de l'induction d'un nouveau centre organisateur de Spemann.

Le centre organisateur de Spemann est capable d'organiser un axe embryonnaire secondaire lorsqu'il est greffé à la marge ventrale. Pour déterminer si les duplications partielles d'axes obtenues suite à la sur-expression de *foxA2* ou *foxA3* sont le résultat de l'induction d'un centre

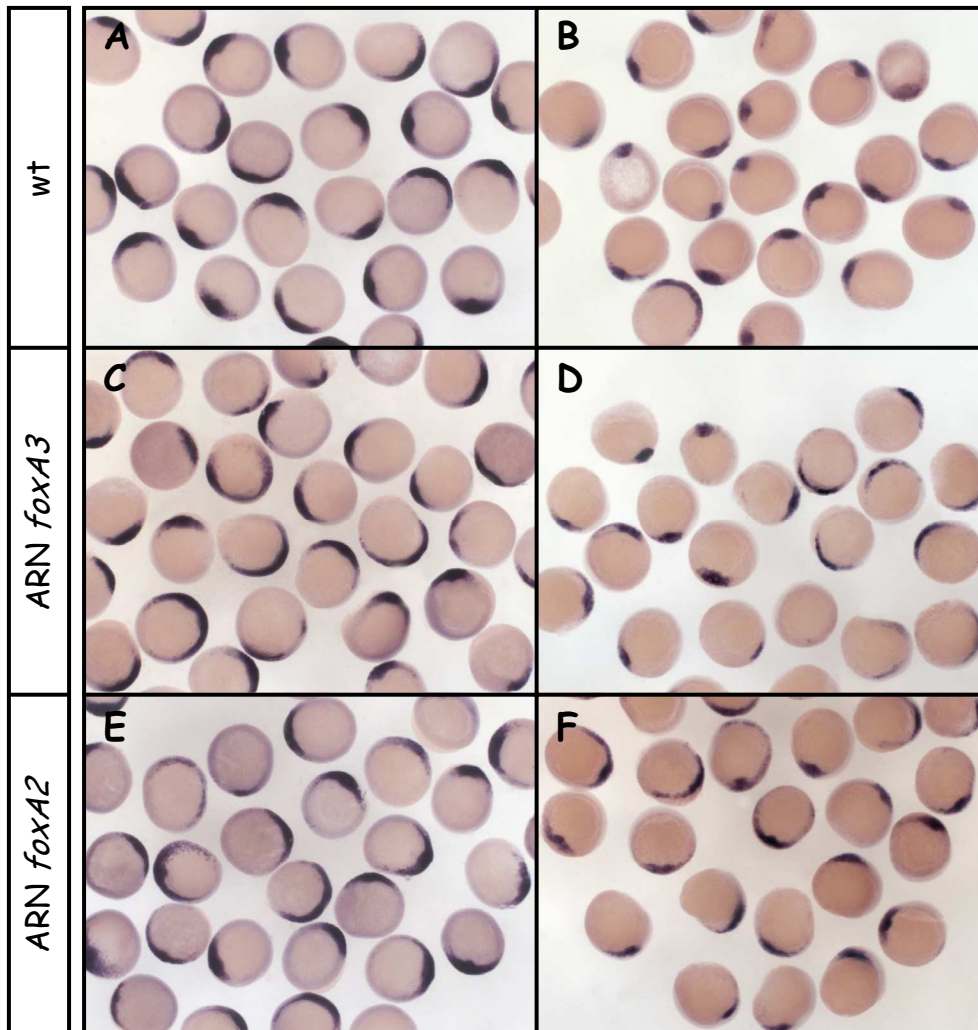


II-Figure 38 : La surexpression généralisée de *foxA2* ou *foxA3* perturbe le développement de la glande d'éclosion à 30 hpf.

Expression à 30 hpf du marqueur de la glande d'éclosion, *hgg1*, chez les embryons sauvages (A et E) et les embryons sur-exprimant *foxA2* ou *foxA3* (B-D et F-H).

La surexpression de *foxA2* ou *foxA3* conduit à 3 classes phénotypiques d'intensité croissante (C1: B et F; C2: C et G; C3: D et H). Plus le phénotype est fort, moins la glande d'éclosion est étendue à la surface de la réserve vitelline (comparer la taille des doubles flèches blanches). Dans les cas les plus extrêmes (C3), la glande d'éclosion est fragmentée de part et d'autre de l'encéphale (D et H).

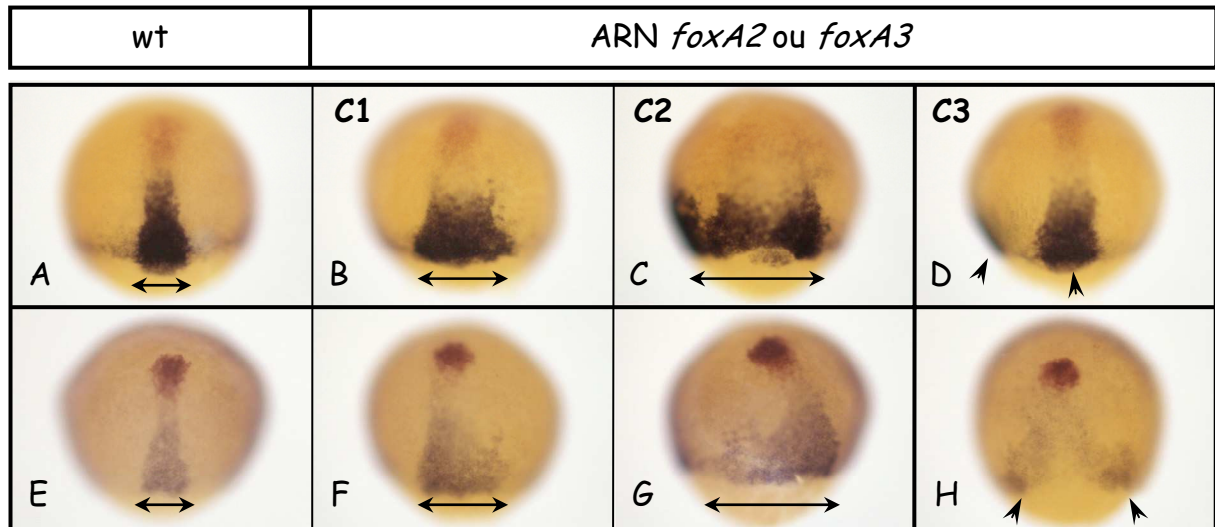
Les embryons sont présentés en vue frontale, face dorsale en haut (A-D, ou en vue latérale, pôle antérieur à gauche et face dorsale à droite (E-H). La table indique la répartition des embryons sur-exprimant *foxA2* ou *foxA3* dans les 3 classes phénotypiques.



II-Figure 39 : La surexpression généralisée de *foxA2* ou *foxA3* n'induit pas la formation d'un centre organisateur de Spemann ectopique.

Expression au stade *shield* de marqueurs précoces de l'écusson embryonnaire, *chordin* (A, C et E) et *goosecoid* (B, D et F) chez les embryons sauvages (A et B) et les embryons sur-exprimant *foxA3* (C et D) ou *foxA2* (E et F).

Aucune modification de l'expression de *chordin* et *goosecoid* n'est visible quelque soient les conditions testées.



ARN injecté	concentrations	sondes	n	Phénotype (%)			
				wt	C1	C2	C3
ARN FoxA2	100 ng/μL	<i>gsc/flh</i>	38	5	29	45	21
ARN FoxA2	100 ng/μL	<i>hgg1/shh</i>	37	3	30	35	32
ARN FoxA3	25 ng/μL	<i>gsc/flh</i>	37	5	22	24	49
ARN FoxA3	25 ng/μL	<i>hgg1/shh</i>	32	0	28	41	31

II-Figure 40 : La surexpression généralisée de *foxA2* ou *foxA3* induit un élargissement du chordamésoderme pendant la gastrulation.

Analyse du mésoderme axial à 80 % d'épibolie par des doubles hybridations *in situ* avec les couples de sondes *gsc/flh* (A-D) et *hgg1/shh* (E-H) chez les embryons sauvages (A et E) et les embryons sur-exprimant *foxA2* ou *foxA3* (B-D et F-H). *gsc* et *hgg1* sont des marqueurs de la plaque préchordale (en rouge). *flh* et *shh* sont des marqueurs de la notochorde présomptive (ou chordamésoderme) (en bleu).

La surexpression de *foxA2* ou *foxA3* induit un élargissement progressif du chordamésoderme. Ce territoire est faiblement élargi chez les embryons de classe C1 (B et F), ou fortement élargi chez les embryons de classe C2 (C et G). Chez les embryons de classe C3, le mésoderme notochordal est tel qu'il se divise en deux parties (D et H). Quelque soient les conditions testées, les embryons ne présentent qu'une seule et unique plaque préchordale.

Tous les embryons sont présentés en vue dorsale, pôle animal en haut. La table indique la répartition des embryons sur-exprimant *foxA2* ou *foxA3* dans les 3 classes phénotypiques.

organisateur de Spemann ectopique, j'ai analysé l'expression de marqueurs précoces de l'écusson embryonnaire (l'équivalent du centre organisateur de Spemann). Pour cela, j'ai réalisé des hybridations *in situ* avec les marqueurs *chordin* et *gooseoid* au stade *shield*.

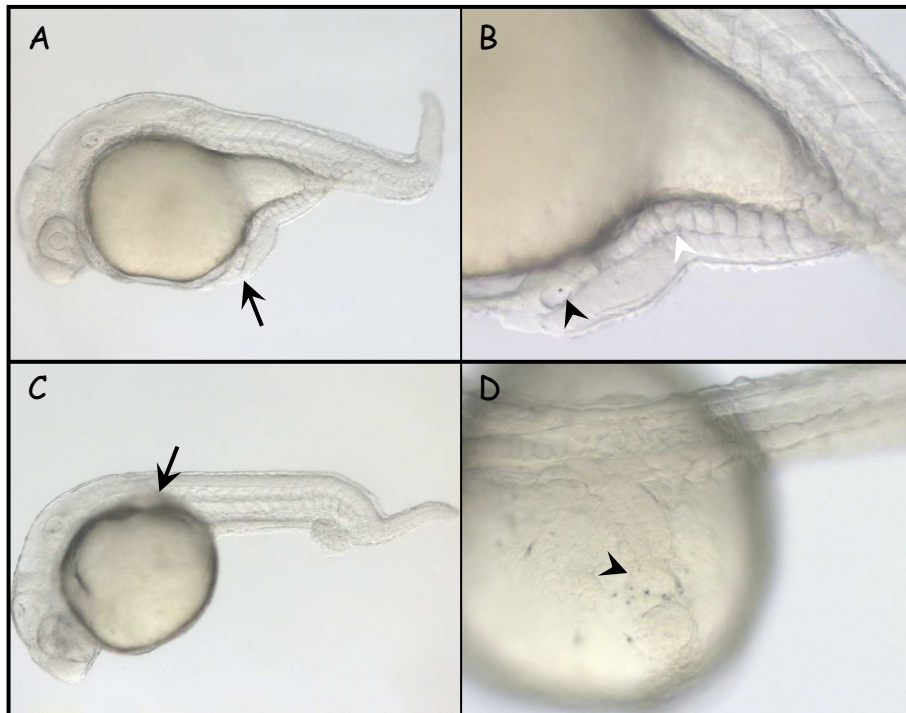
Chez les embryons sur-exprimant *foxA2* ou *foxA3*, je n'ai jamais observé d'expression ectopique de ces marqueurs ou d'élargissement de leur territoire d'expression (Fig.39). Ces embryons sont semblables aux embryons sauvages.

Par conséquent, la genèse de duplications partielles d'axe dorsal ne résulte pas de l'induction d'un centre organisateur de Spemann ectopique par les facteurs FoxA2 ou FoxA3.

III.1.d. La sur-expression de *foxA2* ou *foxA3* induit un élargissement du mésoderme axial pendant la gastrulation.

En absence de FoxA2 et FoxA3, le territoire axial présomptif n'est pas maintenu au cours de la gastrulation, aboutissant à une perte progressive des structure axiales le long de l'axe AP à 30 hpf. La sur-expression de l'un ou l'autre de ces facteurs induit une duplication partielle de la notochorde à 30 hpf. Pour savoir si cette duplication résulte de l'activité de FoxA2 et FoxA3 pendant la mise en place du territoire axial, j'ai analysé son développement par des doubles hybridations *in situ* au cours de la gastrulation. Pour cela, j'ai utilisé deux couples de sondes, chacun associant un marqueur préchordal (*gsc* ou *hgg1*) à un marqueur notochordal (*flh* ou *shh*). Le premier couple étant constitué de marqueurs précoces (*gsc/flh*) et le deuxième, de marqueurs plus tardifs (*hgg1/shh*).

A l'inverse de l'inactivation des facteurs FoxA2 et FoxA3, la sur-expression de l'une ou l'autre de ces molécules induit un élargissement progressif du territoire notochordal présomptif (Fig. 40). Chez les embryons de classe C1, le territoire notochordal est faiblement élargi (Fig. 40 : B et F). Chez les embryons de classe C2, il s'étend sur près de la moitié de la circonférence de l'embryon (Fig. 40 : C et G). Enfin, dans les cas les plus extrêmes, cet élargissement est tel que le mésoderme notochordal se scinde en deux parties au niveau de la marge dorsale (C3 ; Fig. 40 : D et H). En revanche, la taille du territoire préchordal ne semble pas être affectée par la sur-expression de *foxA2* ou *foxA3*. Quelque soit l'étendue du territoire notochordal, une seule et unique plaque préchordale est présente à l'extrémité antérieure de la notochorde présomptive. Les mêmes résultats ont été obtenus avec les ARN *foxA2* ou *foxA3* et cela quelque soit le couple de marqueurs utilisé (Fig. 40). Ces observations sont en accord avec l'obtention d'une notochorde partiellement dupliquée à 30 hpf, qui se termine antérieurement au niveau d'une seule et unique structure céphalique.



II-Figure 41 : La sur-expression de *foxA2* est capable d'induire la formation d'un axe secondaire partiel avec une très faible fréquence.

Une très faible proportion des embryons sur-exprimant *foxA2* (3% à 6%) développent un axe secondaire partiel (flèches en A et C) à 30 hpf. Ces axes secondaires ne développent pas de mésoderme axial (flèches blanches en B et D) et ne s'étendent pas au-delà de la vésicule otique (flèches noires en B et D)

Les embryons sont présentés en vue latérale, pôle antérieur à gauche et face dorsale à droite (A-C) ou en vue dorsale, pôle antérieur à gauche (D). Les images en B et D sont des agrandissements des embryons présentés en A et C.

En conclusion, la sur-expression généralisée des facteurs *foxA2* et *foxA3* conduit à une duplication partielle de la notochorde à 30 hpf qui ne résulte pas de l'induction d'un deuxième centre organisateur de Spemann mais d'un élargissement du mésoderme axial pendant la gastrulation.

III.1.e. La sur-expression de *foxA2* est capable d'induire la formation d'axes secondaires partiels avec une faible fréquence à 30 hpf.

La sur-expression généralisée des ARN *foxA2* ou *foxA3* conduit à une duplication partielle de l'axe embryonnaire. En plus de ce phénotype, j'ai pu observé avec une très faible fréquence (6 %, n=75) des embryons présentant un axe « secondaire » partiel suite à l'injection de l'ARN *foxA2* (Table 2 et Fig. 41). Ces axes « secondaires » diffèrent des « duplications » partielles d'axes précédemment décrits. Alors que les deux parties des axes dupliqués, se rejoignent systématiquement au niveau de la tête ; la partie antérieure des axes secondaires partiels bifurque de l'axe endogène de l'embryon. De plus, ces axes secondaires ne possèdent pas de notochorde et ne s'étendent jamais au-delà de la vésicule otique.

Compte tenu de la très faible quantité d'embryons présentant ces axes secondaires partiels, dans un premier temps, j'ai vérifié la spécificité de ce phénotype. Pour cela j'ai réalisé des injections localisées d'ARN *foxA2* ou *foxA3* dans un blastomère au stade 8-16 cellules (table 2). Les cellules sur-exprimant ces ARN ont pu être identifiées grâce à la co-injection de l'ARN codant pour la GFP. Seule la surexpression localisée de l'ARN *foxA2* génère des embryons présentant des axes secondaires partiels et dans tous les cas, les cellules fluorescentes sont localisées au niveau de l'axe secondaire formé (résultats non montrés). L'obtention d'axes secondaires partiels suite à l'injection de *foxA2* est donc spécifique de cet ARN. Néanmoins, la fréquence d'apparition de ce phénotype reste très faible, seul 3 % des embryons injectés développe ces structures ectopiques (Table 2). Le reste des embryons présente des phénotypes identiques à ceux obtenus lors des injections généralisées (C1, C2 et C3) (table 2).

De nombreuses molécules sécrétées (p. ex. Noggin, Chordin) ou facteurs de transcription (p. ex. Goosecoïd) sont capables d'induire la formation d'axes secondaires lorsqu'ils sont exprimés à la marge ventrale des embryons. Pour savoir si ces axes secondaires partiels sont la conséquence d'une distribution hétérogène des ARN *foxA2*, j'ai injecté les ARN *foxA2* en combinaison avec ceux de la *gfp* dans un blastomère au stade 8-16 cellules. J'ai ensuite trié les embryons au stade *shield* en fonction de la position DV du clone fluorescent. Lorsque

foxA2 est exprimé ventralement, la fréquence d'axes secondaires partiels générés augmente (clone dorsal : 3% n= 39 ; clone ventral : 9 %, n=22) mais cette capacité à induire des axes secondaires reste faible.

En résumé, l'expression ectopique de *foxA2*, contrairement à celle de *foxA3*, est capable d'induire la formation d'un axe secondaire partiel. Cette activité, bien que faible, semble dépendre de la position DV du clone sur-exprimant *foxA2*. Plus le clone cellulaire est situé ventralement, plus la fréquence d'axe secondaire partiel augmente.

III.2. L'expression ectopique des facteurs FoxA2 et FoxA3 au pôle animal n'induit pas la formation de notochorde ectopique :

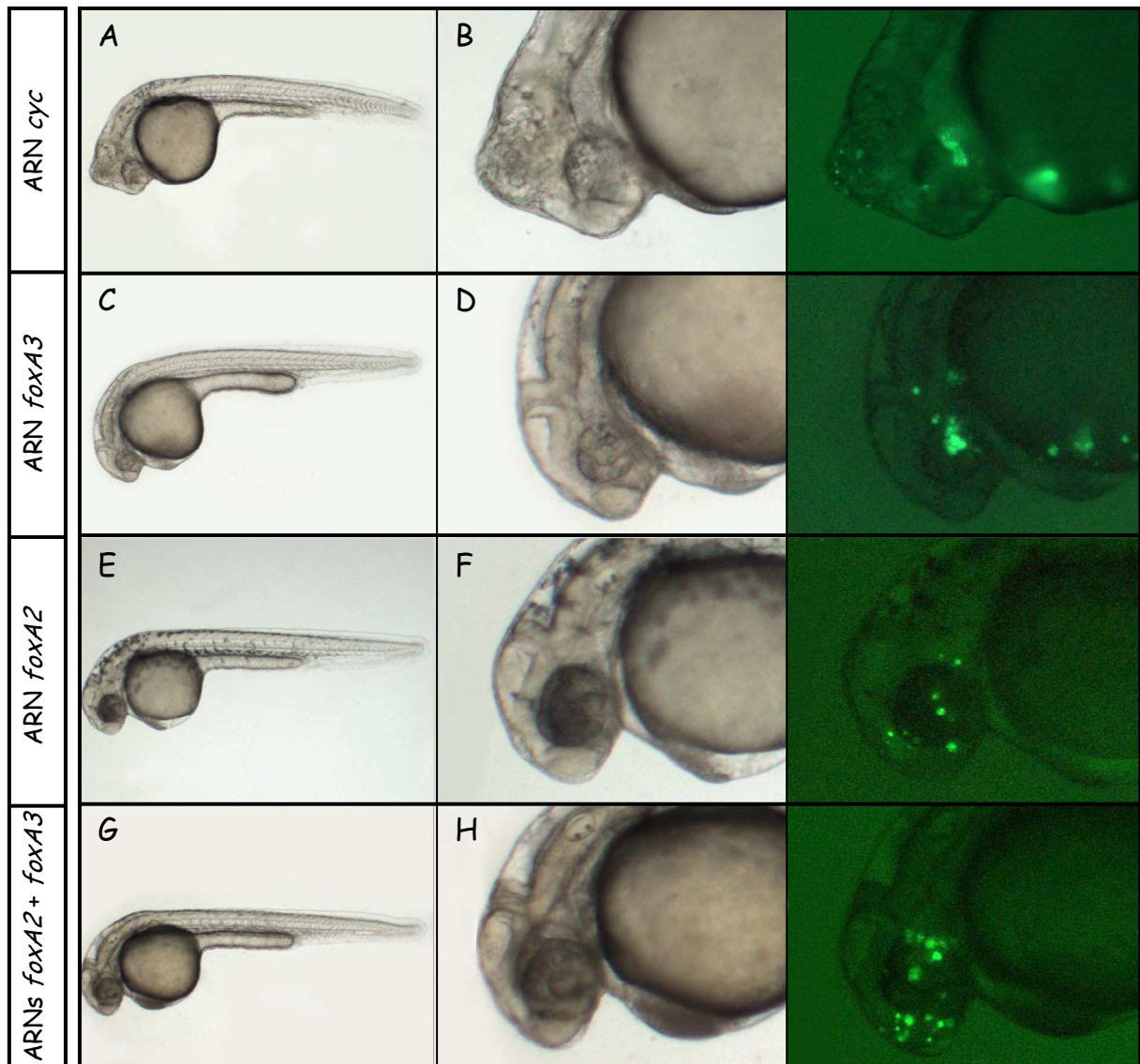
La sur-expression généralisée d'ARN affecte le développement embryonnaire en créant des situations très éloignées du contexte physiologique normal. En effet, ces manipulations induisent l'expression d'une molécule d'intérêt dans des régions qui en sont normalement dépourvues. Les facteurs surexprimés peuvent alors interagir avec des protéines nouvelles et induire des phénotypes qui ne reflètent pas leur activité endogène.

Chez l'embryon de poisson zèbre, il existe une zone où les principales voies de signalisation, sécrétées depuis la marge, ont un niveau d'activité basal. Cette zone correspond au pôle animal. La sur-expression d'ARN dans cette région permet de s'affranchir au maximum des effets résultant de l'interaction entre la molécule étudiée et les voies de signalisation agissant à la marge de l'embryon. On peut ainsi mieux appréhender l'activité propre à une molécule donnée.

La sur-expression des ARN *foxA2* et *foxA3* dans la totalité de l'embryon conduit à un élargissement du mésoderme axial pendant la gastrulation. Pour savoir si ces facteurs de transcription peuvent initier le développement de mésoderme axial par eux-mêmes, j'ai surexprimé ces molécules au pôle animal.

III.2.a. Les facteurs foxA2 et/ou foxA3 ne sont pas capables d'induire de la formation de notochorde quand ils sont exprimés au pôle animal.

Pour réaliser cette expérience, j'ai injecté soit individuellement, soit en combinaison, les ARN *foxA2* ou *foxA3* dans un blastomère animal au stade 64 à 128 cellules. Ces ARN ont été utilisés à des concentrations fortes allant de 100 ng/μL à 800 ng/μL. Afin d'être en mesure de localiser les cellules injectées au cours du développement embryonnaire, j'ai co-injecté l'ARN codant pour la GFP. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'expression



II-Figure 42 : La sur-expression de *foxA2* et *foxA3* au pôle animal n'est pas capable d'initier la formation de mésoderme axial.

Embryons injectés au pôle animal avec l'ARN *cyclops* (A et B), *foxA3* (C et D), *foxA2* (E et F) ou *foxA2* et *foxA3* (G et H) en combinaison avec l'ARN codant pour la GFP et analysés à 30 hpf.

Alors que l'injection de l'ARN *cyclops* au pôle animal induit la formation de notochorde ectopique dans les structures céphaliques, l'injection des ARN *foxA2* et/ou *foxA3* n'a pas d'effet.

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, pôle antérieur à gauche et face dorsale à droite. Les images en B, D, F et H sont des agrandissements des embryons présentés en A, C, E et G respectivement. Pour chaque agrandissement, la position des cellules injectées (exprimant la GFP) est mise en évidence.

ectopique de *nodal* au pôle animal induit la formation de mésoderme axial. A titre d'élément comparatif et pour vérifier l'efficacité de mes injections, j'ai réalisé, en parallèle, des injections au pôle animal de l'ARN *cyclops*.

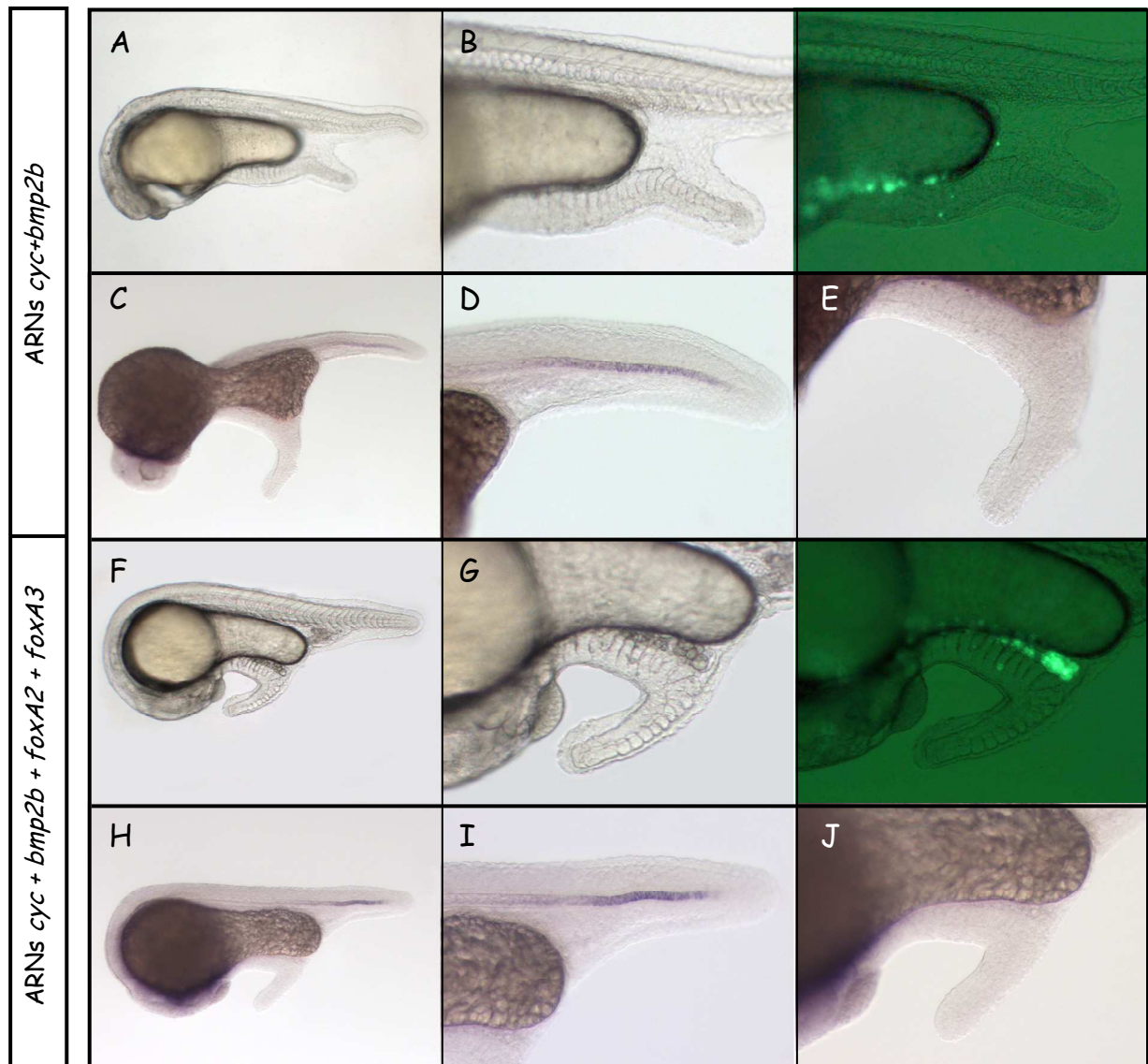
A 30 hpf, l'expression ectopique de *foxA2* et *foxA3* au pôle animal, seuls ou en combinaison, n'a pas d'effet sur le développement embryonnaire quelque soit la concentration utilisée (Fig. 42 : C à H). En comparaison, l'injection au pôle animal de l'ARN *cyclops* à une concentration de 15 ng/μL est suffisante pour induire la formation de notochorde ectopique dans les structures céphaliques des embryons à 30 hpf (Fig. 42 : A et B).

Ces résultats indiquent que les facteurs de transcription FoxA2 et FoxA3, contrairement au ligand Nodal, ne sont pas capables d'induire, le développement de mésoderme axial quand ils sont exprimés dans un environnement dépourvu des principales voies de signalisation.

III.2.b. L'expression ectopique de *foxA2* et *foxA3* en combinaison avec *nodal* et *bmp* n'induit pas la formation de queues ectopiques contenant de la notochorde.

Chez le poisson zèbre, le développement des structures axiales à partir de la marge dorsale dépend de la voie Nodal. En revanche, la marge ventrale de l'embryon est à l'origine du développement de la queue et résulte de la triple stimulation des voies de signalisation Nodal, BMP et Wnt (Agathon et al., 2003). Ces voies de signalisation se régulant mutuellement, l'activation au pôle animal de seulement deux d'entre elles (Nodal et BMP) est capable d'induire la formation de queues ectopiques. Ces queues ectopiques sont formées des trois feuillets embryonnaires mais sont systématiquement dépourvues de mésoderme axial, dont le développement dépend de l'activité de la marge dorsale. Pour savoir si les facteurs FoxA2 et FoxA3 sont capables de restaurer le développement du mésoderme axial dans ces queues ectopiques, j'ai co-injecté au pôle animal les ARN *cyclops* et *bmp2b* en combinaison avec ceux de *foxA2* et *foxA3*.

Tout d'abord, l'injection au pôle animal de *cyclops* et *bmp2b* (utilisés à 15 ng/μL et 380 ng/μL respectivement) induit la formation de queues ectopiques dépourvues de notochordes à 30 hpf (Fig. 43 : A et B). La co-injection des ARN *foxA2* et *foxA3* (utilisés à 400 ng/μL chacun) n'a pas d'effet sur le développement des queues ectopiques qui restent dépourvues de structures axiales (Fig. 43 : F et G). L'analyse du marqueur GS3706 par hybridation *in situ* confirme l'absence de notochorde (Fig.43 C à E et H à J).



II-Figure 43 : L'expression ectopique de *foxA2* et *foxA3* n'induit pas la formation de mésoderme axial dans les queues résultant de l'activité de Nodal et BMP.

Embryons injectés au pôle animal avec une combinaison des ARN *cyclops/bmp2b* (A-E), ou *cyclops/bmp2b/foxA2/foxA3* (F-J) en combinaison avec l'ARN codant pour la GFP. Les embryons ont été analysés morphologiquement à 30 hpf (A,B,F et G) ou par hybridation in situ avec le marqueur notochordal GS3706 (C, D, E, H, I et J).

Quelque soient les conditions testées, les queues ectopiques sont dépourvues de notochorde.

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, pôle antérieur à gauche et face dorsale à droite. Pour chaque embryon, un agrandissement de la queue endogène (D et I) ou de la queue ectopique (B, E, G et J) sont présentés. Les images de droites en B et G montrent la position des cellules injectées (exprimant la GFP).

En résumé, les facteurs FoxA2 et FoxA3 ne sont pas capables d'induire le développement de mésoderme axial dans les queues ectopiques résultant de la triple stimulation des voies Nodal, BMP et Wnt au pôle animal.

III.3. Conclusions:

En conclusion, j'ai montré précédemment que les structures axiales disparaissent progressivement en absence de FoxA2 et FoxA3. A l'inverse, la sur-expression généralisée de ces facteurs de transcription conduit à une duplication partielle de la notochorde à 30 hpf qui ne résulte pas de l'induction d'un deuxième centre organisateur de Spemann mais d'un élargissement du mésoderme axial pendant la gastrulation. De plus, pour une faible proportion d'embryons, l'expression ectopique de *foxA2*, contrairement à celle de *foxA3*, peut initier la formation d'un axe secondaire partiel. Ces éléments confirment le rôle fondamental des facteurs FoxA2 et FoxA3 dans le développement des structures de l'axe. Cependant, j'ai montré, par des injections au pôle animal, que ces facteurs ne sont pas capables d'induire, par eux-mêmes, la formation de mésoderme axial. Ainsi, bien que FoxA2 et FoxA3 soient nécessaires au développement des structures de l'axe, ils ne sont pas suffisants pour initier leur développement.

IV. Les facteurs FoxA2 et FoxA3 fonctionnent de façon redondante à Flh dans la mise en place des structures axiales :

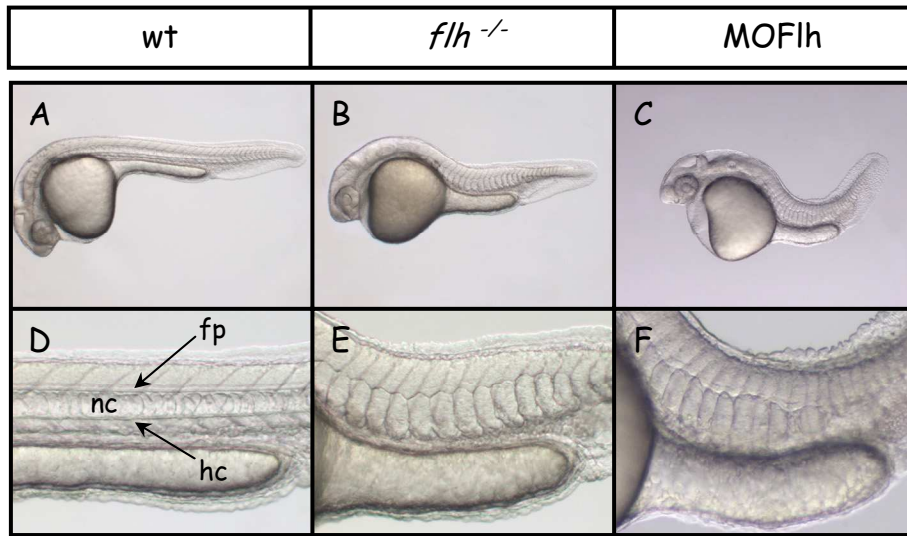
J'ai montré jusqu'ici que les facteurs FoxA2 et FoxA3 jouent un rôle fondamental dans le développement des structures axiales. Leur gain de fonction entraîne un élargissement du territoire notochordal alors que leur inactivation simultanée abolit le développement des structures axiales. De plus, l'analyse moléculaire réalisée pendant la gastrulation a montré qu'en absence de ces deux facteurs le territoire notochordal n'est pas maintenu et qu'à la place se développe du mésoderme paraxial. Ce phénotype précoce est semblable à celui des mutants *flh* qui, tout comme les doubles morphants FoxA2-FoxA3, ne possèdent pas de notochorde à 30 hpf. La mise en évidence de telles similarités m'a conduit à analyser et comparer l'activité de ces différentes molécules au cours du développement des structures axiales.

IV.1. Phénotype de la perte de fonction du gène *floating head (flh)* :

L'inactivation de Flh par injection de 200 μ M du morpholino MOFlh conduit à un phénotype identique à celui des mutants *flh* (Fig. 44 : B à E). Ces embryons ne présentent aucune notochorde reconnaissable et les somites sont fusionnés le long de la ligne médiane.

Afin de mieux caractériser le phénotype des morphants Flh, j'ai réalisé une série d'hybridations *in situ*, à 30 hpf et pendant la gastrulation. Pour cela, j'ai pris soin d'utiliser les mêmes marqueurs que ceux utilisés lors de l'analyse moléculaire des embryons MOFoxA2-FoxA3 afin de pouvoir comparer efficacement ces deux phénotypes.

A 30 hpf, le marqueur notochordal *GS3706* confirme l'absence de notochorde chez les morphants Flh (Fig.45 B). En revanche, ces embryons développent une plaque du plancher, comme le révèle l'expression des marqueurs *fspondin2* et *foxa2*, mais celle-ci présente de nombreuses interruptions le long de l'axe AP (Fig.45 F et résultats non montrés). En ce qui concerne l'hypochorde, les données publiées indiquent que cette structure est absente chez les mutants *flh* (Talbot et al., 1995). Cependant, contrairement aux autres tissus axiaux, l'hypochorde n'a pas fait l'objet d'une étude approfondie. L'analyse des marqueurs *dermo1* et *radar* confirme l'absence d'hypochorde chez les morphants Flh (Fig.45 H et résultats non montrés). De plus, chez ces embryons, le marqueur *col2a1* est présent dans la plaque du plancher mais il ne montre aucune expression hypochordale (Fig.45 D). Les morphants Flh, tout comme les mutants *flh* (talbot et al. 1995, halpern et al. 1995), ne développent ni

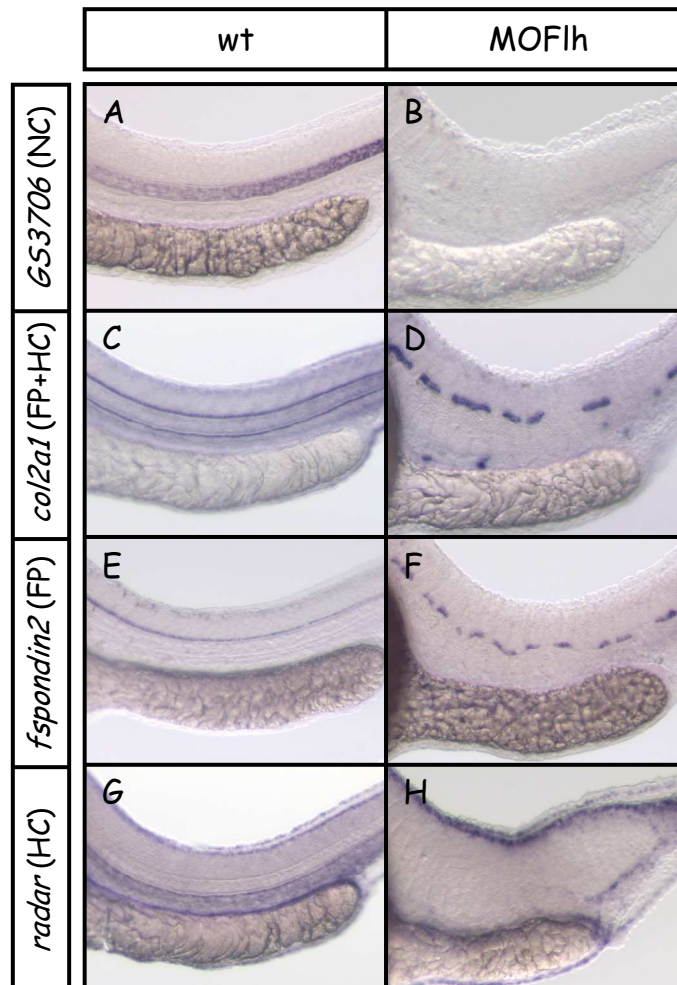


II-Figure 44 : Le phénotype des morphants Flh est identique à celui des mutants *flh*.

Embryons sauvages (A et D), mutants homozygotes pour le gène *flh* (B et E) ou embryons injectés avec le morpholino MOFlh à 200 μ M (C et F) et analysés à 30 hpf.

Les morphants Flh, tout comme les mutants *flh*, ne développent aucune notochorde reconnaissable et leurs somites sont fusionnés le long de la ligne médiane.

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, pôle antérieur à gauche et face dorsale en haut. Pour chaque embryon, un agrandissement de la région du tronc est présenté (D, E et F). nc: notochorde, fp: plaque du plancher, hc: hypochorde.

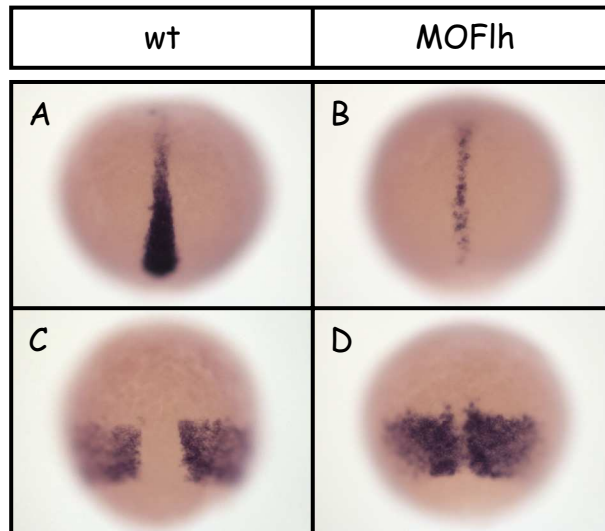


II-Figure 45 : Les morphants Flh ne développent ni notochorde, ni hypochorde et la formation de la plaque du plancher est altérée.

Expression à 30 hpf, des marqueurs *GS3706* (A et B), *col2a1*(C et D), *fspondin2* (E et F) et *radar* (G et H) chez les embryons sauvages (A, C, E et G), ou les embryons injectés avec 200 μ M de morpholino MOFlh (B, D, F et H). Pour chaque marqueur, la(les) structure(s) mise(s) en évidence est(sont) indiquée(s) entre parenthèses. NC:notochorde, FP: plaque du plancher, HC: hypochorde

L'inactivation de Flh abolit le développement de la notochorde (B) et de l'hypochorde (D et H). La plaque du plancher est présente chez les morphants Flh mais elle est discontinue le long de l'axe AP (D et F).

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, côté antérieur à gauche et face dorsale en haut.



II-Figure 46 : Le mésoderme axial n'est pas maintenu pendant la gastrulation en absence de Flh et à la place le mésoderme paraxial se développe.

Expression à 80 % d'épibolie, des marqueurs du mésoderme axial, dermo1 (A et B) et du mésoderme paraxial, myf5 (C et D) chez les embryons sauvages (A et C) et les embryons injectés avec 200 μ M de MOFlh (B et D).

Le mésoderme axial disparaît en absence de Flh (B) et le mésoderme paraxial s'étend dorsalement et fusionne le long de la ligne médiane (D).

Tous les embryons sont présentés en vue dorsale, pôle antérieur en haut.

notochorde, ni hypochorde et bien que la plaque du plancher soit présente sa morphologie est altérée.

Chez les mutants *flh*, les précurseurs de l'axe sont induits pendant la gastrulation, mais ce territoire n'est pas maintenu et à la place se développe le mésoderme somitique (Halpern et al., 1995). Dans les morphants Flh, le territoire d'expression du marqueur notochordal *dermo1* est fortement diminué tandis que celui du marqueur somitique *myf5* est étendu dorsalement et fusionné le long de la ligne médiane (Fig.46 B et D). En résumé, l'inactivation du facteur Flh par injection de 200 μ M de MOFlh reproduit le phénotype des mutants *flh* et confirme l'efficacité de ce morpholino.

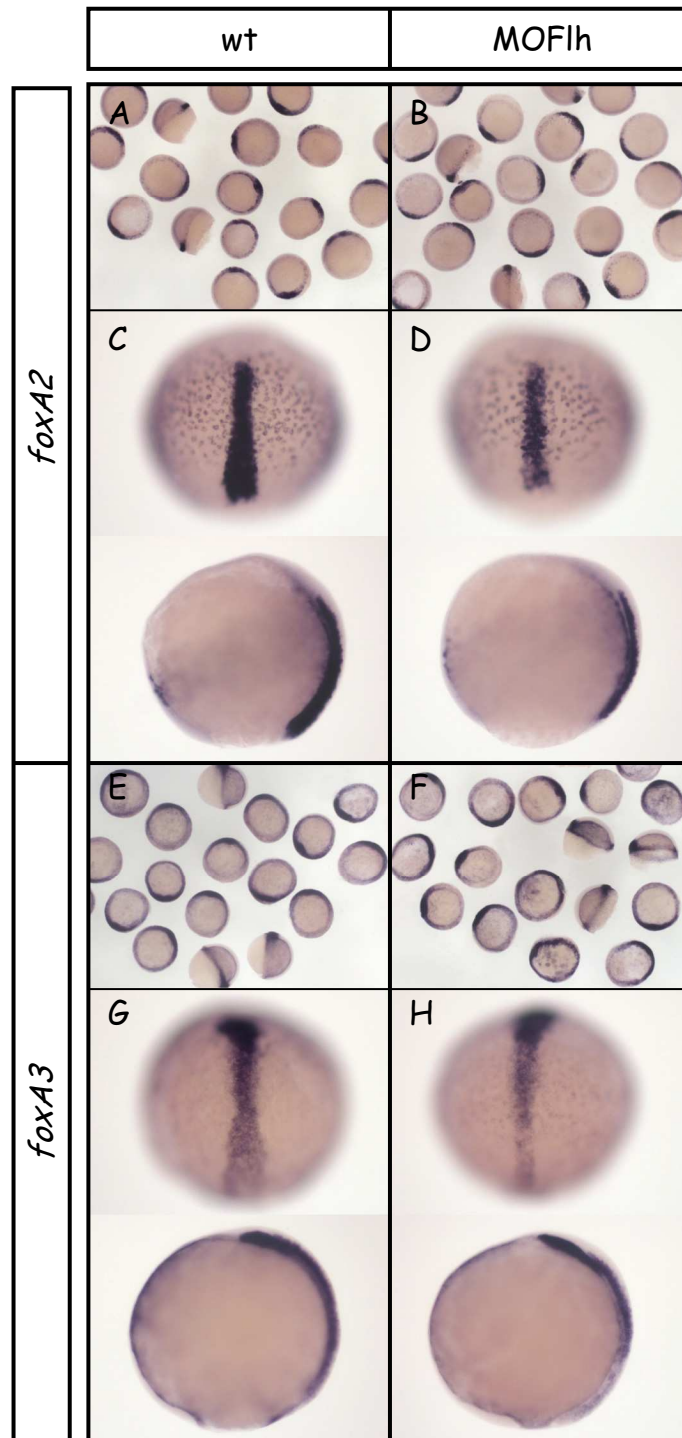
Comme je l'ai mentionné précédemment, le phénotype précoce des morphants Flh est similaire à celui des doubles morphants FoxA2-FoxA3 (comparer Fig.46 et Fig. 32). Ces observations suggèrent que les facteurs Flh, FoxA2 et FoxA3 pourraient avoir des fonctions redondantes dans le maintien du mésoderme axial pendant la gastrulation.

IV.2. L'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 n'abolit pas l'expression de flh, et inversement

Lors de la caractérisation du phénotype des morphants FoxA2-FoxA3, j'ai montré que l'expression du gène *flh*, au cours de la gastrulation, ne semble pas être affectée par l'absence de l'un ou l'autre de ces facteurs (Fig. 31). En effet, l'expression de *flh* est correctement induite et elle persiste pendant la gastrulation chez les morphants FoxA2-FoxA3 (Fig.31 : A-H). Seule la partie la plus postérieure de l'axe de ces embryons est affectée (Fig.31 H). Par conséquent, la disparition des structures axiales chez les embryons MOFoxA2-FoxA3 ne semble pas résulter de l'absence de l'expression de *flh*. De plus, ces observations suggèrent que l'expression de *flh* dans les structures axiales est indépendante de l'activité des facteurs FoxA2 et FoxA3.

Afin de déterminer si, à l'inverse, le facteur Flh est susceptible de réguler l'expression des gènes *foxA2* et *foxA3*, j'ai réalisé l'expérience opposée. J'ai analysé l'expression de *foxA2* et de *foxA3* dans les morphants Flh au début et pendant la gastrulation.

Au stade *shield*, l'expression de *foxA2* et *foxA3* dans les morphants Flh est identique à celle des embryons sauvages. L'induction de ces deux facteurs est donc indépendante de la présence de Flh (Fig.47 : AB et GH). A 80 % d'épibolie, le domaine d'expression de *foxA2* est plus étroit chez les morphants Flh que chez les embryons sauvages (Fig.47 : C à F). De même, l'expression de *foxA3* diminue dans la partie postérieure de l'axe dorsal des morphants Flh (Fig.47 : I à L). Afin de mieux caractériser ces modifications, j'ai analysé de façon

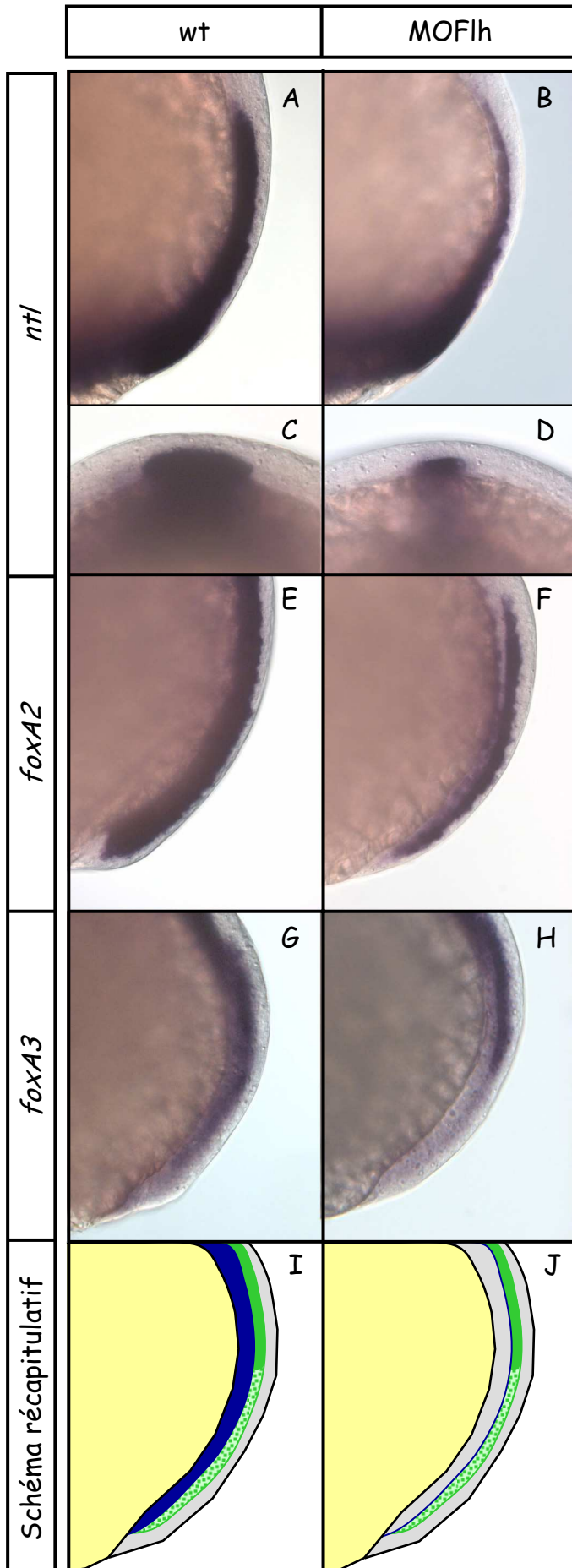


II-Figure 47 : Analyse de l'expression de foxA2 et foxA3 chez les morphants Flh.

Expression de *foxA2* (A-D) et *foxA3* (E-H) chez les embryons sauvages (A, C, E et G) et les embryons injectés avec 200 μ M de morpholino MOFlh (B, D, F et H) au stade *shield* (A-B et E-F) ou à 90 % d'épibolie (C-D et G-H).

L'inactivation de Flh n'affecte pas l'induction de *foxA2* (B) ou de *foxA3* (F) En revanche, le territoire d'expression de ces deux gènes diminue en absence de Flh à 90 % d'épibolie (D et H).

Les embryons sont présentés en vue dorsale (images du haut en C, D, G et H) ou en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite (images du bas en C, D, G et H).



II-Figure 48 : L'expression de *foxA2* et *foxA3* disparaît de l'hypoblaste notochordal chez les morphants Flh pendant la gastrulation.

Expression à 90 % d'épibolie du marqueur de l'hypoblaste notochordal *ntl* (A-D) et des gènes *foxA2* (E-F) et *foxA3* (G-H) chez les embryons sauvages (A, C, E et G) et les embryons injectés avec 200 μ M de morpholino MOFlh (B, D, F et H). Schéma récapitulatif l'expression de *foxA2* et *foxA3* dans l'axe dorsal des embryons sauvages (I) et des morphants Flh (J)

(E, G et I) A 90 % d'épibolie, *foxA2* et *foxA3* sont exprimés dans la couche hypoblastique de l'axe dorsal (bleu) et dans sa couche épiblastique (vert). Cependant, seul *foxA2* est exprimé dans l'épiblaste postérieur (pointillés), alors que les transcrits *foxA2* et *foxA3* sont tout les deux présents dans sa partie antérieure (couleur pleine).

En absence de Flh, l'expression de *foxA2* et *foxA3* persiste dans l'épiblaste mais elle disparaît de la couche hypoblastique à l'origine de la notochorde (F, H et J). Ce phénotype ne résulte pas de l'absence d'hypoblaste notochordal chez les morphants Flh (B). En effet, ce tissu, moins étendu que chez les embryons sauvages, est néanmoins présent (comparer C et D).

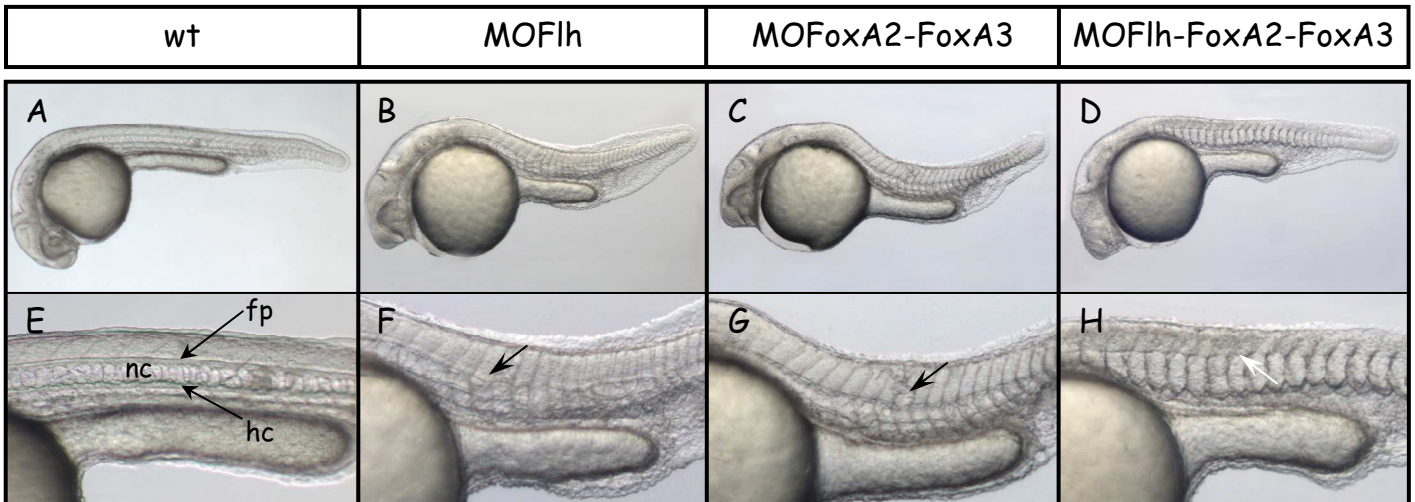
Tous les embryons sont présentés en vue latérale, pôle animal en haut et face dorsale à droite sauf en C et D qui sont des coupes optiques transversales de l'axe dorsale, face dorsale en haut.

détaillée l'expression de *foxA2* et *foxA3* dans les morphants Flh (Fig. 48). A 80 % d'épibolie, on distingue deux couches cellulaires au niveau de l'axe dorsal : une couche profonde, l'hypoblaste, correspondant au territoire notochordal, et une couche superficielle, l'épiblaste, correspondant au neurectoderme. Chez les embryons sauvages, les gènes *foxA2* et *foxA3* sont exprimés dans ces deux couches cellulaires (Fig. 48 : E et G). Cependant, alors que l'expression de *foxA2* s'étend sur toute la longueur AP de l'épiblaste ventral, *foxA3* n'est exprimé que dans sa partie antérieure. Dans les morphants Flh, l'expression de *foxA2* et *foxA3* dans l'épiblaste n'est pas affectée. En revanche, leurs transcrits sont absents de l'hypoblaste notochordal (Fig. 48 : F et H) Il semble donc que l'activité du facteur Flh soit requise pour maintenir l'expression de *foxA2* et *foxA3* dans le territoire notochordal (l'hypoblaste) pendant la gastrulation. Les embryons MOFlh, dépourvus de notochorde à 30 hpf, initient le développement du mésoderme axial au début de la gastrulation, comme le révèle le marqueur ntl (Fig. 48 : B et D). Cependant, ce territoire n'est pas maintenu au cours du développement embryonnaire (Fig. 46 B) (Halpern et al., 1995). Compte tenu de ces observations, l'absence des transcrits *foxA2* et *foxA3* dans l'hypoblaste notochordal des morphants Flh, pendant la gastrulation, reflète : soit le non-maintien de ce tissu ; soit l'absence d'une régulation positive de l'expression de *foxA2* et *foxA3* par le facteur Flh.

En résumé, bien qu'il soit difficile de trancher entre ces deux hypothèses, cette analyse indique néanmoins que les expressions de *foxA2*, *foxA3* et *flh* sont initiées indépendamment les unes des autres.

IV.3. FoxA2, FoxA3 et Flh ont des activités redondantes dans la mise en place des structures axiales

La similarité du phénotype des morphants FoxA2-FoxA3 avec celui des morphants Flh suggère que ces molécules pourraient avoir des activités redondantes lors du développement des structures axiales. Afin de tester cette hypothèse, j'ai inactivé simultanément ces trois facteurs. Sachant que la perte totale de fonction de Flh ou des facteurs FoxA2 et FoxA3 conduit à une absence de la totalité des structures axiales, j'ai travaillé avec des doses de morpholinos entraînant, individuellement, des phénotypes faibles. Ainsi, si ces facteurs ont des activités redondantes, leur perte simultanée devrait conduire à une amplification de leur phénotype individuel.



II-Figure 49 : La triple inactivation partielle de Flh, FoxA2 et FoxA3 abolit le développement de la notochorde à 30 hpf.

Embryons sauvages à 30 hpf (A et E). Morphants Flh faibles (injecté avec 100 μ M de morpholino MOFlh) (B et F), morphants FoxA2-FoxA3 faibles (injectés avec 3x500 μ M des morpholinos MOb1, MOg1 et MOg3) (C et G) et triples morphants Flh-FoxA2-FoxA3 (injectés avec 100 μ M de MO Flh et 3x500 μ M de MOb1, MOg1 et MOg3) (D et H)

Le développement de la notochorde est faiblement affecté par la perte partielle de Flh (flèche en F) ou de FoxA2 et FoxA3 (flèche en G). La diminution simultanée de l'activité de Flh, FoxA2 et FoxA3 amplifie largement ces phénotypes faibles (D) et à 30 hpf, aucune notochorde n'est présente chez les triples morphants Flh-FoxA2-FoxA3 (flèche blanche en H).

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, côté antérieur à gauche et face dorsale en haut. Pour chaque embryon, un agrandissement de la région du tronc est présentée (E-H). fp: plaque du plancher, nc: notochorde, hc: hypochorde.

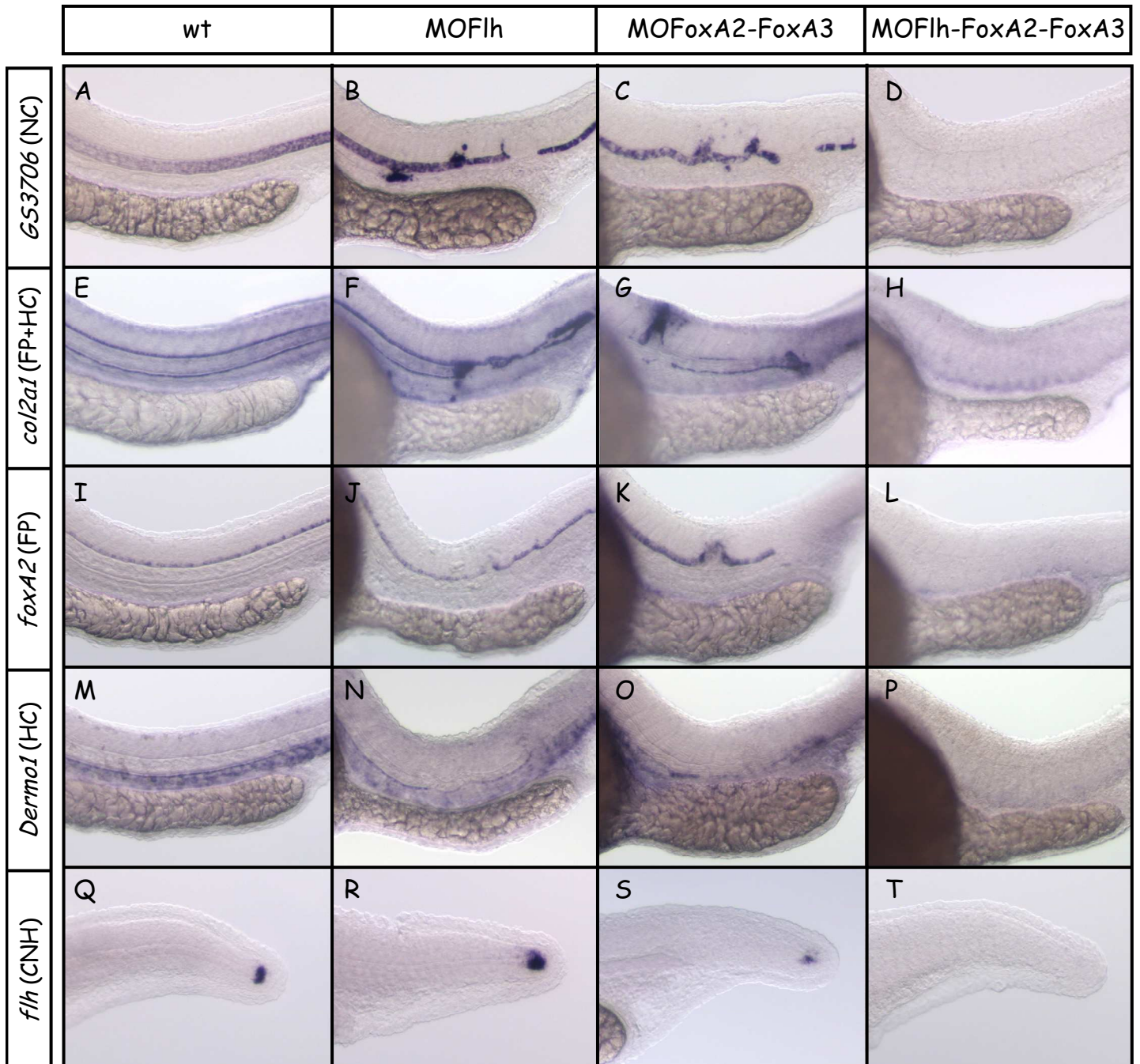
Table 3

3	MO injectés	concentrations (µM)	marqueurs	structures	n	phénotypes (%)			
						wt	C1	C2	C3
A	MO flh	100	GS 3706	NC	72	64	33	3	0
	MO flh	100	col2a1	FP et HC	41	63	37	0	0
	MO flh	100	FoxA2	FP	38	79	21	0	0
	MO flh	100	Fspondin2	FP	40	65	35	0	0
	MO flh	100	radar	HC	38	74	26	0	0
	MO flh	100	dermo1	HC	37	70	30	0	0
B	MO b1g1g3	3x500	GS 3706	NC	71	3	73	18	6
	MO b1g1g3	3x500	col2a1	FP et HC	38	13	63	16	8
	MO b1g1g3	3x500	FoxA2	FP	36	0	42	53	5
	MO b1g1g3	3x500	Fspondin2	FP	43	2	0	70	28
	MO b1g1g3	3x500	radar	HC	41	0	73	27	27
	MO b1g1g3	3x500	dermo1	HC	41	0	71	29	29
C	MO flh + MO b1g1g3	100, 3x500	GS 3706	NC	68	0	0	0	100
	MO flh + MO b1g1g3	100, 3x500	col2a1	FP et HC	49	0	0	0	100
	MO flh + MO b1g1g3	100, 3x500	FoxA2	FP	48	2	0	0	98
	MO flh + MO b1g1g3	100, 3x500	Fspondin2	FP	47	0	0	6	94
	MO flh + MO b1g1g3	100, 3x500	radar	HC	46	0	0	0	100
	MO flh + MO b1g1g3	100, 3x500	dermo1	HC	49	0	0	0	100

C1: arrêt des structures axiales après l'anus

C2: arrêt des structures axiales avant l'anus

C3: pas de structures axiales



II-Figure 50 : L'inactivation partielle simultanée de Flh, FoxA2 et FoxA3 abolit le développement de l'ensemble des structures axiales.

Expression à 30 hpf, des marqueurs *GS3706* (A-D), *col2a1* (E-H), *foxA2* (I-L), *dermo1* (M-P) et *flh* (Q-T) chez les embryons sauvages (A, E, I, M et Q), les simples morphants Flh (100 μ M de MOFlh) (B, F, J, N et R), les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (3x500 μ M de MO_{b1}, MO_{g1} et MO_{g3}) (C, G, K, O et S) et triples morphants Flh-FoxA2-FoxA3 (100 μ M de MO Flh et 3x500 μ M de MO_{b1}, MO_{g1} et MO_{g3}) (D, H, L, P et T). Pour chaque marqueur, la(les) structure(s) mise(s) en évidence est(ont) indiquée(s) entre parenthèses. NC: notochorde, FP: plaque du plancher, HC: hypochorde et CNH: charnière chordo-neurale.

L'inactivation partielle de Flh (B, F, J et N) ou de FoxA2 et FoxA3 (C, G, K et O) perturbe légèrement le développement des structures axiales. La diminution simultanée de Flh, FoxA2 et FoxA3 a des effets catastrophiques sur la formation des structures de la ligne médiane. Ces tissus sont entièrement absents à 30 hpf (D, H, L et P). La CNH est absente chez les triples morphants Flh-FoxA2-FoxA3 (T) alors qu'elle n'est jamais éliminée chez les simples MOFlh (R) et les doubles MOFoxA2-FoxA3 (S).

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, côté antérieur à gauche et face dorsale en haut.

IV.3.a. La triple inactivation partielle de FoxA2, FoxA3 et Flh abolit le développement des structures axiales à 30 hpf.

Une diminution de moitié des concentrations de morpholinos utilisées pour inactiver les facteurs Flh ou FoxA2 et FoxA3 est suffisante pour produire des phénotypes faibles.

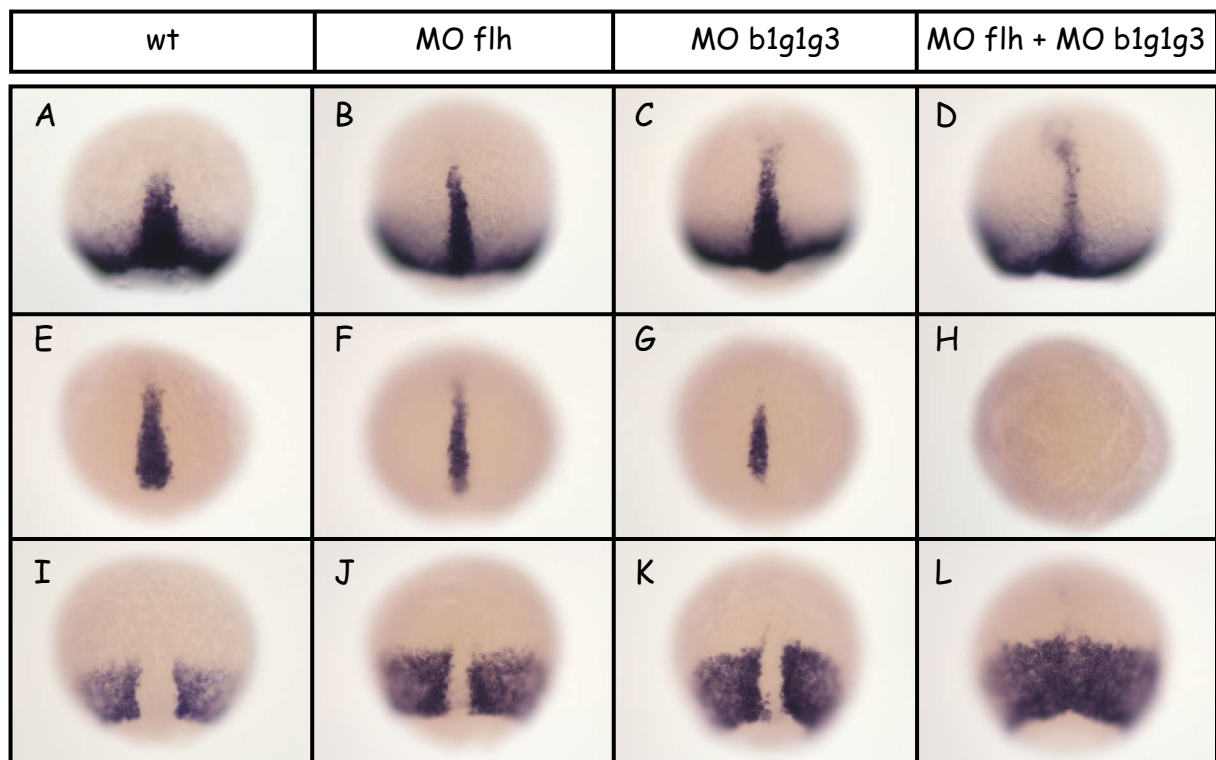
En effet, l'injection de 100 μ M du morpholino MOFlh ou de 3x500 μ M des morpholinos MOb1, MOg1 et MOg3 n'abolit pas le développement de la notochorde. Chez ces morphants, cette structure présente quelques désorganisations locales mais reste visible sur la quasi-totalité de l'axe AP (Fig.49 : BF et CG). En revanche, l'injection simultanée de faibles concentrations des morpholinos MOFlh, MOb1, MOg1 et MOg3 amplifie fortement les phénotypes faibles décrits précédemment. Les triples morphants Flh-FoxA2-FoxA3 obtenus ne développent aucune notochorde sur la totalité de l'axe AP. De plus, ce phénotype est très pénétrant puisque la notochorde est absente chez la totalité des embryons injectés.

Pour déterminer si cette amplification phénotypique concerne l'ensemble des structures axiales, j'ai réalisé des hybridations *in situ*. Comme pour l'analyse des doubles morphants FoxA2-FoxA3, j'ai distingué 3 classes phénotypiques en fonction du niveau AP où les structures axiales sont interrompues. Ces résultats sont présentés Table 3. De plus, la figure 50 montre une photo représentative du phénotype principal associé à chaque morphant.

Chez les morphants Flh, injectés avec 100 μ M de morpholino, l'expression des marqueurs de la notochorde (*GS3706*), de la plaque du plancher (*foxA2*, *fspondin2* et *col2a1*) et de l'hypochorde (*radar*, *dermo1* et *col2a1*), est identique à celle des embryons sauvages dans près de 70 % des cas. Chez les 30 % d'embryons restants, les structures axiales sont légèrement désorganisées et mais elles ne sont jamais interrompues avant l'anus (classe C1 ; Table 3A et Fig.50 : B, F, J, N et R).

Chez les doubles morphants FoxA2-FoxA3, injectés avec 3 x 500 μ M de morpholinos, plus de la moitié des embryons présentent des structures axiales qui s'étendent au-delà de l'anus (classe C1 ; table 3B). Sur les embryons restants, la plupart présentent une notochorde, une plaque du plancher et une hypochorde dans la région antérieure à l'anus (classe C2 ; Fig. 50 : C, G, K, O et S) et une faible proportion d'entre eux ne développent aucun de ces tissus (classe C3 ; Table 4B).

L'inactivation partielle et simultanée de Flh, FoxA2 et FoxA3 abolit dans près de 100 % des cas le développement de l'ensemble des structures axiales le long de l'axe AP (Fig.50 : D, H, L, P et T ; table 4C).



II-Figure 51 : Flh, FoxA2 et FoxA3 fonctionnent de façon redondante afin de maintenir l'identité du mésoderme axial pendant la gastrulation.

Expression à 80 % d'épibolie, des marqueurs du mésoderme axial, *ntl* (A-D) et *dermo1* (E- H), et du mésoderme paraxial, *myf5* (I-L) chez les embryons sauvages (A, E et I), les simples morphants Flh (100 μ M de MOFlh) (B, F et J), les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (3x500 μ M de MOb1, MOg1et MOg3) (C, G et K) et les triples morphants Flh-FoxA2-FoxA3 (100 μ M de MO Flh et 3x500 μ M de MOb1, MOg1et MOg3) (D, H et L).

Les territoires d'expression de *ntl* (B-C), *dermo1* (F-G) et *myf5* (J-K) ne sont presque pas affectés chez les simples morphants Flh et les doubles morphants FoxA2-FoxA3. Chez les triples morphants Flh-FoxA2-FoxA3, l'expression du marqueur précoce *ntl* , est fortement diminuée mais n'est jamais éliminée (D) alors que celle de *dermo1* est entièrement absente (H). A l'inverse, le territoire d'expression de *myf5* est fusionné le long de la ligne médiane (L).

Tous les embryons sont présentés en vue dorsale, pôle animal en haut.

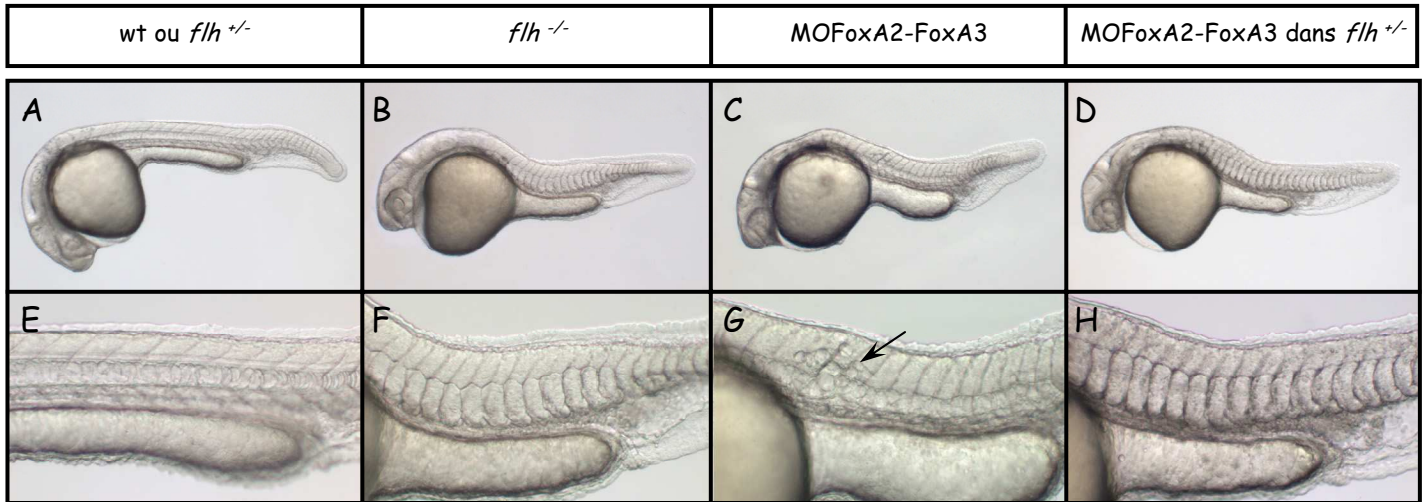
En conclusion, la diminution simultanée des activités de Flh, FoxA2 et FoxA3 amplifie fortement le phénotype faible des morphants Flh ou des morphants FoxA2-FoxA3. Ces résultats démontrent que ces facteurs de transcription fonctionnent de façon redondante dans la mise en place des structures axiales.

IV.3.b. FoxA2 FoxA3 et Flh fonctionnent de façon redondante pendant la gastrulation :

Afin de déterminer si les fonctions redondantes des facteurs Flh, FoxA2 et FoxA3 sont présentes dès le stade gastrula, j'ai analysé les territoires d'expression des marqueurs de l'axe (*dermo1*, *shh* et *ntl*) et du mésoderme paraxial (*myf5*) à 80 % d'épibolie (Fig. 51).

A ce stade, l'inactivation partielle du facteur Flh ou des facteurs FoxA2 et FoxA3 n'affecte que faiblement le territoire notochordal, comme le révèle l'expression de *dermo1* (Fig.51 : E à G). De la même façon, chez ces morphants, le mésoderme paraxial est légèrement plus étendu dorsalement que chez les embryons sauvages (Fig.51 : I à K). En revanche, chez les triples morphants, le territoire notochordal exprimant *dermo1* est entièrement absent et à la place le mésoderme paraxial est fusionné le long de la ligne médiane (Fig. 51 H et L). L'absence totale de l'expression de *dermo1* n'a jamais été observée chez les morphants Flh ou FoxA2-FoxA3 injectés avec de fortes concentrations de morpholinos. De plus, chez le mutant *flh* le territoire notochordal diminue fortement pendant la gastrulation, mais il ne disparaît complètement qu'en début de somitogenèse. La diminution simultanée de l'activité des facteurs Flh, FoxA2 et FoxA3 conduit donc à un phénotype plus fort que ceux observés individuellement. Alors que l'expression du marqueur précoce du mésoderme axial, le gène *ntl*, n'est presque pas modifiée suite à l'inactivation partielle de Flh ou des facteurs FoxA2 et FoxA3, son expression est fortement affectée par la diminution simultanée de ces trois molécules (Fig. 51 : A à D). Néanmoins, l'expression de *ntl* demeure chez les morphants Flh-FoxA2-FoxA3 suggérant que l'induction du mésoderme axial à un stade plus précoce n'est pas affectée par la perte des facteurs Flh, FoxA2 et FoxA3.

En conclusion, ces expériences démontrent que les facteurs Flh, FoxA2 et FoxA3 ne sont pas requis pour l'induction du mésoderme axial mais qu'ils possèdent une activité partiellement redondante requise pour le maintien de l'identité de ce tissu.



II-Figure 52 : Flh est responsable du maintien de la notochorde antérieure chez les doubles morphants FoxA2-FoxA3 à 30 hpf.

Embryons sauvages non injectés (A et E) ou injectés avec les morpholinos MOb1, MOg1et MOg3 (3x1000 µM)(C et G). Mutants *flh* homozygotes (B et F). Mutants *flh* hétérozygotes non injectés (A et E) ou injectés avec les morpholinos MOb1, MOg1et MOg3 (3x1000 µM)(D et H).

Les mutants *flh* homozygotes ne développent pas de notochorde (B et F) alors que les mutants *flh* hétérozygotes sont similaires aux embryons sauvages (A et E). L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 abolit le développement de la notochorde excepté dans la partie la plus antérieure de l'axe (C et flèche en G). L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 chez les mutants *flh* hétérozygotes élimine entièrement la notochorde (D et H).

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, extrémité antérieure à gauche et face dorsale en haut. Pour chaque embryon, un agrandissement de la région du tronc est présenté (E-H).

Table 4

4	MO injectés	concentrations (µM)	souche	n	phénotypes (%)			
					wt	C1	C2	C3
	MO b1g1g3	3x1000	wt	91	5	26	58	11
	-	-	[flh+/-;flh+/-]	43	65	0	0	35
	MO b1g1g3	3x1000	[flh+/-;flh+/-]	45	0	0	11	89

C1: arrêt de la notochorde après l'anus
C2: arrêt de la notochorde avant l'anus
C3: absence totale de notochorde

IV.4. L'activité du facteur Flh est responsable du maintien des structures axiales antérieures en absence de FoxA2 et FoxA3.

La perte de fonction des facteurs FoxA2 et FoxA3, même forte, abolit rarement le développement de la notochorde, de la plaque du plancher et de l'hypochorde dans la partie antérieure de l'embryon suggérant que d'autres facteurs, capable de compenser l'absence de FoxA2 et FoxA3, sont responsables de leur développement dans cette région. Le facteur Flh, exprimé précocement dans les précurseurs de l'axe et ayant des activités redondantes à celles de FoxA2 et FoxA3, est un bon candidat. Afin de tester cette hypothèse, j'ai analysé le développement des structures axiales antérieures dans les morphants FoxA2-FoxA3 pour lesquels l'activité de Flh est diminuée (Fig. 52 et table 4). Pour cela, j'ai injecté les morpholinos MOb1, MOg1 et MOg3 à fortes concentrations dans les embryons issus du croisement des mutants *flh*^{+/-}.

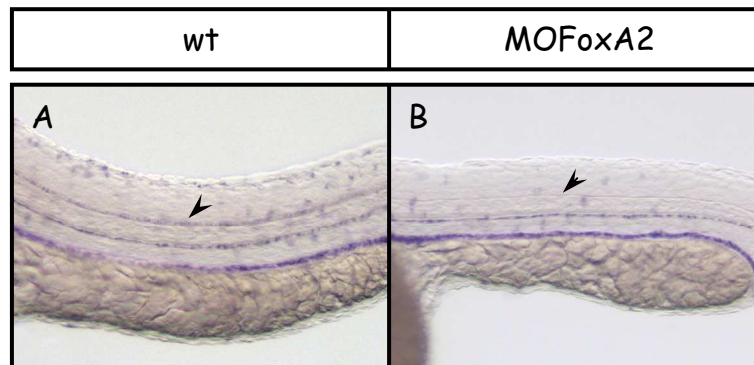
La mutation *flh* étant récessive, seul un quart des embryons, qui correspondent aux mutants homozygotes, ne développent aucune notochorde. L'inactivation de FoxA2 et FoxA3 dans un contexte génétique sauvage produit seulement 11 % d'embryons sans notochorde antérieure. En revanche, l'inactivation de ces facteurs chez les mutants *flh* élimine la totalité des structures axiales dans près de 90 % des cas (Fig. 52 D). De plus, j'ai remarqué que plus d'un tiers des mutants *flh* injectés avec les morpholinos MOb1, MOg1 et MOg3 meurent pendant la somitogenèse (38 %, n=73). Ces embryons correspondent vraisemblablement aux mutants *flh* homozygotes.

En conclusion, une diminution de l'activité de Flh est suffisante pour abolir le développement de la notochorde résiduelle des morphants FoxA2-FoxA3. En d'autres termes, Flh est responsable du développement de la notochorde antérieure en absence de FoxA2 et FoxA3.

IV.5. Conclusions :

Au cours du développement embryonnaire, la présence des facteurs FoxA2, FoxA3 et Flh est requise pour le développement des structures axiales. En effet, tandis que les mutants *flh* ne possèdent ni notochorde, ni hypochorde, l'ensemble des structures axiales est affecté par l'absence de FoxA2 et FoxA3. Bien que ces phénotypes ne soient pas identiques à 30 hpf, ils sont très similaires pendant la gastrulation. J'ai démontré par des triples pertes de fonction que Flh, FoxA2 et FoxA3 ne sont pas requis pour l'induction du mésoderme axial mais qu'ils fonctionnent de façon partiellement redondante afin de maintenir l'identité de ce tissu. De plus, la présence de Flh est suffisante pour initier le développement des structures axiales

antérieures en absence de FoxA2-FoxA3 et suggère que l'activité des ces facteurs n'est pas identique le long de l'axe AP.

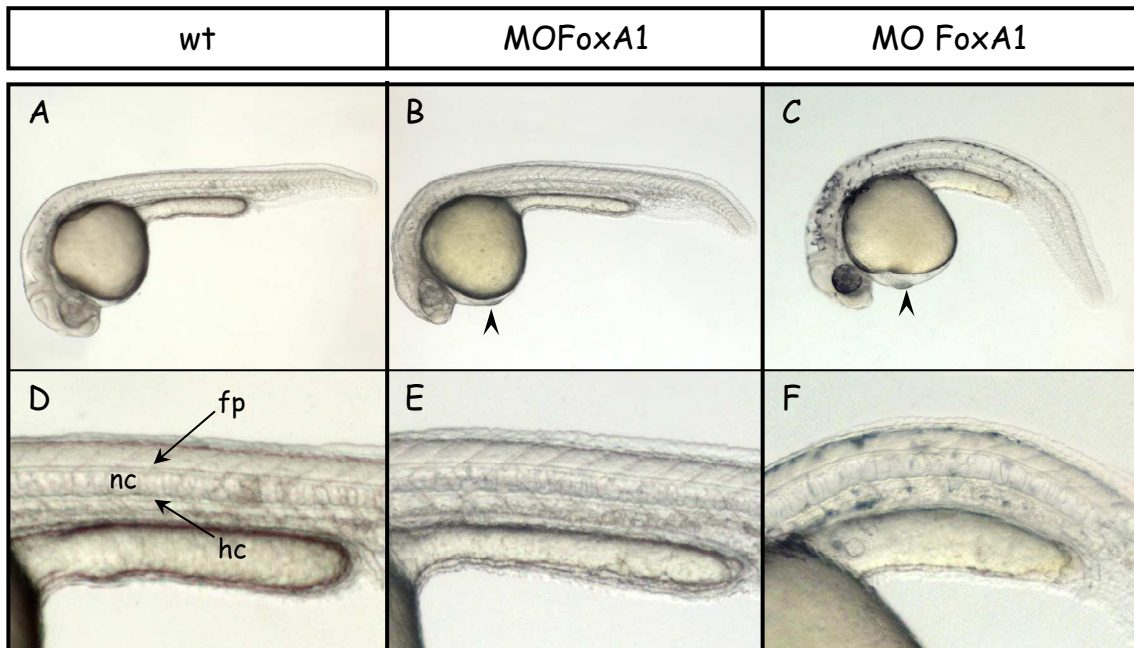


II-Figure 53 : L'expression de *foxA1* dans la plaque du plancher dépend de la présence de FoxA2.

Expression de *foxA1* à 30 hpf chez les embryons sauvages (A) et les morphants FoxA2 (B).

Alors que *foxA1* est correctement exprimé dans l'hypochorde des morphants FoxA2, son expression dans la plaque du plancher est abolie (flèche).

Les embryons sont présentés en vue latérale, pôle antérieur à gauche et face dorsale en haut.



II-Figure 54 : L'inactivation de FoxA1 n'affecte pas le développement des structures axiales à 30 hpf.

Embryons sauvages à 30 hpf (A) Morphants FoxA1 résultant de l'injection des deux morpholinos MOFoxA1a et MOFoxA1b (2x1000 μ M ou 2x1500 μ M) (B,C,E et F)

La plupart des morphants FoxA1 sont identiques aux embryons sauvages (B). Une faible proportion d'entre eux présentent une courbure ventrale (C). Dans tous les cas, les structures axiales ne sont pas affectées par l'absence de FoxA1 (E et F).

Les embryons sont présentés en vue latérale, pôle antérieur à gauche et face dorsale en haut. Pour chaque embryon, un agrandissement de la région du tronc est présenté (D, E et F) nc: notochorde, fp: plaque du plancher, hc: hypochorde.

V. FoxA1 contribue avec FoxA2 et FoxA3 à la mise place des structures axiales.

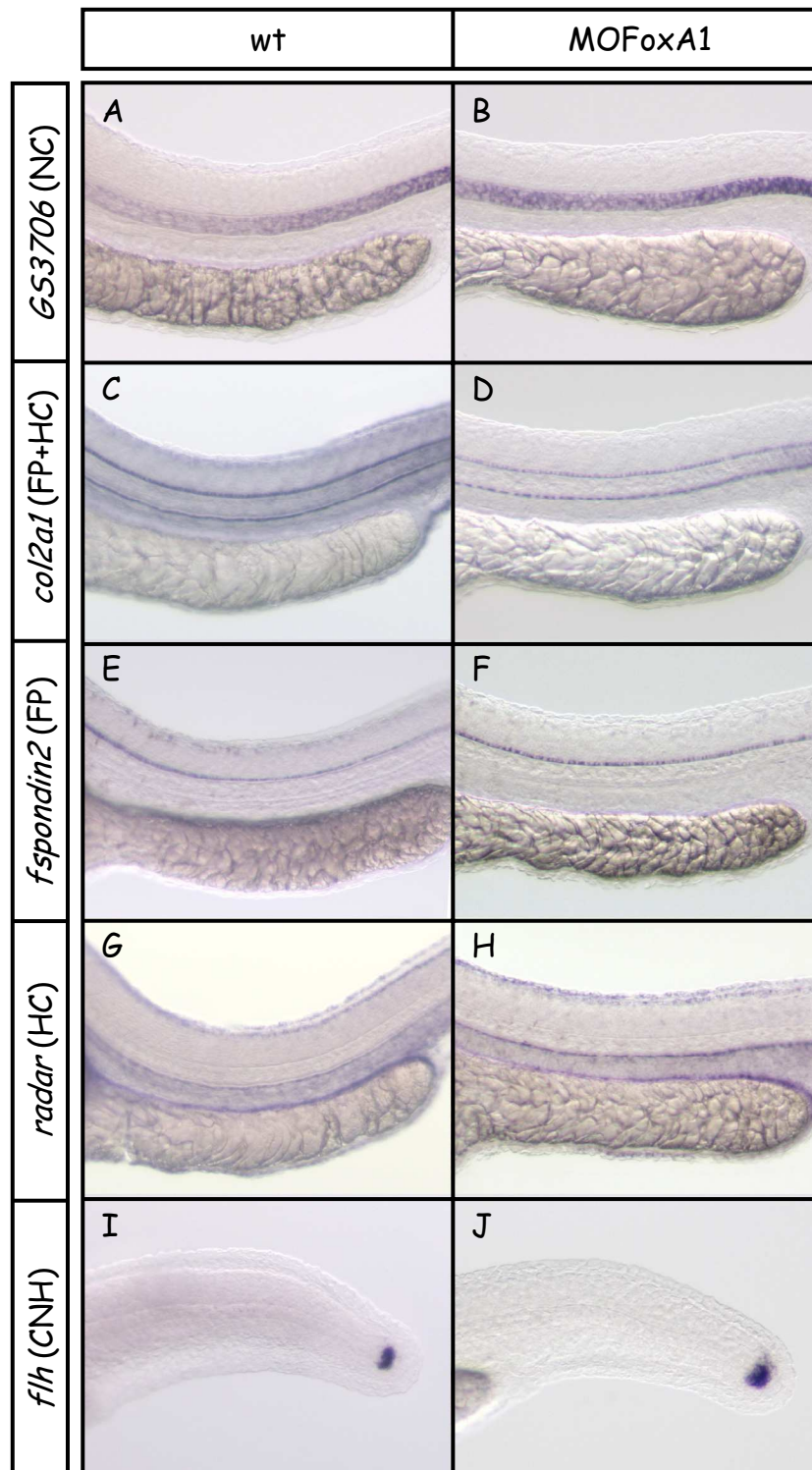
Le gène *foxA1* est un autre membre de la famille *foxA*. Ce gène débute son expression dans les précurseurs de l'axe en fin de gastrulation et à 24 hpf il marque la plaque du plancher et l'hypochorde. Bien que *foxA1* soit activé trop tardivement pour jouer un rôle dans le développement précoce des structures axiales, son patron d'expression laisse supposer qu'il pourrait participer à leur maintien après la gastrulation. Chez la souris l'expression de *foxA1* est, en partie, régulée par FoxA2 (Duncan et al., 1998). De la même façon chez le poisson zèbre, son expression à 24 hpf dans la plaque du plancher dépend de la présence de FoxA2 (Fig.53). Compte tenu de ces éléments, j'ai décidé d'étudier la fonction de FoxA1 au cours du développement des structures axiales.

V.1. La simple inactivation de FoxA1 n'affecte pas le développement des structures axiales.

Afin de mettre en évidence la fonction du facteur de transcription FoxA1 au cours du développement embryonnaire, j'ai réalisé des pertes de fonctions. Pour cela, j'ai injecté, dans le vitellus d'embryons au stade 1 cellule, une combinaison de deux morpholinos, MOFoxA1a et MOFoxA1b, utilisés à de fortes concentrations (2x1000 μ M ou 2x 1500 μ M).

A 30 hpf, la plupart des morphants FoxA1 ne présentent aucun défaut reconnaissable (68 %, n = 194 pour des morpholinos utilisés à 2x1000 μ M ; ou 59 %, n=86 pour des morpholinos utilisés à 2x 1500 μ M ; Fig.54B). En particulier, leurs structures axiales sont présentes et semblent être correctement développées (Fig.54E). Il arrive, cependant, qu'une partie des morphants FoxA1 présentent une courbure ventrale semblable à celle résultant de la perte de fonction de FoxA2 (32 %, n = 194 pour des morpholinos utilisés à 2x1000 μ M ; ou 41 %, n=86 pour des morpholinos utilisés à 2x1500 μ M ; Fig.54C). L'analyse de ces embryons à un plus fort grossissement ne révèle aucun défaut particulier dans les structures de l'axe qui pourrait être à l'origine de cette courbure ventrale (Fig.54F). Ces observations ont été confirmées par des hybridations *in situ* (Fig.55 : B à J). La notochorde, l'hypochorde, la plaque du plancher et la CNH ne sont pas affectés par l'absence de FoxA1.

En conclusion, la simple inactivation de FoxA1 n'a pas d'effet sur le développement des structures axiales.

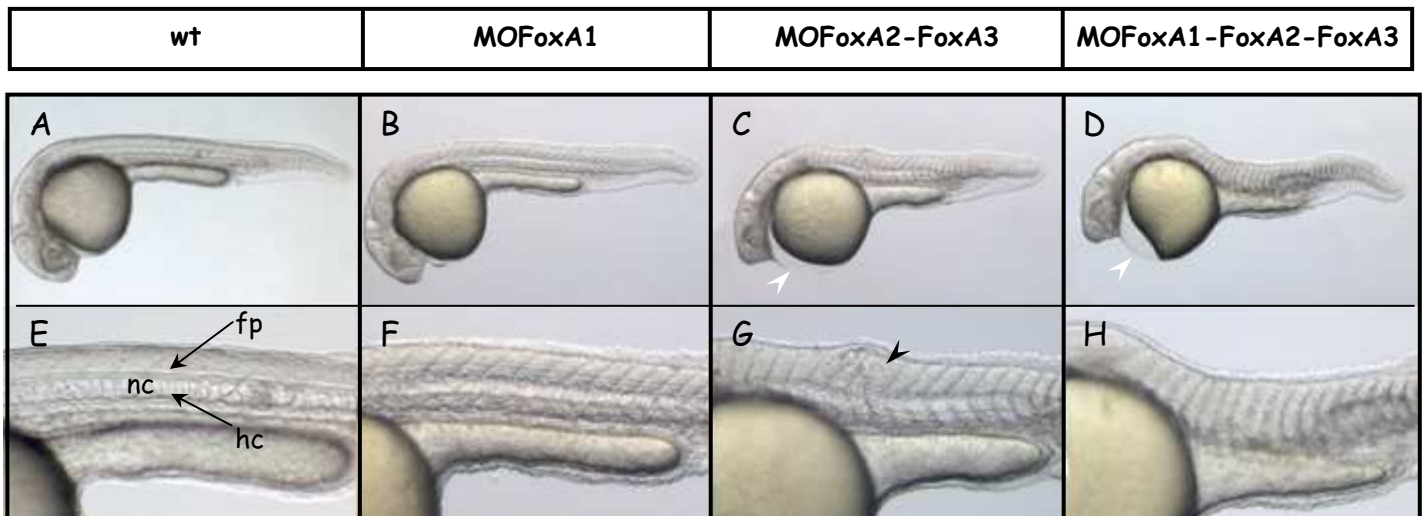


II-Figure 55 : L'inactivation de FoxA1 n'affecte pas le développement des structures axiales à 30 hpf.

Expression à 30 hpf, des marqueurs *GS3706* (A-B), *col2a1* (C-D), *fspondin2* (E-F), *radar* (G-H) et *flh* (I-J) chez les embryons sauvages (A, C, E, G et I) et les morphants FoxA1 (B, D, F, H et J). Pour chaque marqueur, la(les) structure(s) mise(s) en évidence est(ont) indiquée(s) entre parenthèses. NC: notochorde, FP: plaque du plancher, HC: hypochorde, CNH: Charnière Chordo-Neurale.

Aucun des marqueurs de l'axe analysé n'est modifié par l'absence de FoxA1 à 30 hpf.

Les embryons sont présentés en vue latérale, pôle antérieur à gauche et face dorsale en haut.



II-Figure 56 : La diminution de FoxA1 amplifie le phénotype hypomorphe des morphants FoxA2 et FoxA3.

Embryons sauvages à 30 hpf (A et E). Morphants FoxA1 (2x720 μ M de MOFoxA1a et MOFoxA1b) (B et F), morphants FoxA2-FoxA3 (3x500 μ M de MOb1, MOg1et MOg3) (C et G) et triples morphants FoxA1-FoxA2-FoxA3 (2x720 μ M de MOFoxA1a et MOFoxA1b et 3x500 μ M de MOb1, MOg1et MOg3) (D et H)

Le développement de la notochorde est faiblement affecté par la perte partielle de FoxA2 et FoxA3 (flèche en G). La diminution simultanée de l'activité de FoxA1, FoxA2 et FoxA3 amplifie largement ces phénotypes faibles (D) et à 30 hpf, aucune notochorde n'est présente chez les triples morphants FoxA1-FoxA2-FoxA3.

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, extrémité antérieure à gauche et face dorsale en haut. Pour chaque embryon, un agrandissement de la région du tronc est présenté (E-H). fp: plaque du plancher, nc: notochorde, hc: hypochorde.

Table 5

5	MO injectés	concentrations (µM)	marqueurs	structures	n	phénotypes (%)			
						wt	C1	C2	C3
A	MO foxA1ab	2x720	GS 3706	NC	69	100	0	0	0
	MO foxA1ab	2x720	col2a1	FP et HC	25	100	0	0	0
	MO foxA1ab	2x720	FoxA2	FP	24	100	0	0	0
	MO foxA1ab	2x720	Fspondin2	FP	26	100	0	0	0
	MO foxA1ab	2x720	radar	HC	25	100	0	0	0
	MO foxA1ab	2x720	dermo1	HC	25	100	0	0	0
B	MO b1g1g3	3x500	GS 3706	NC	76	3	71	26	0
	MO b1g1g3	3x500	col2a1	FP et HC	35	3	89	9	0
	MO b1g1g3	3x500	FoxA2	FP	36	3	50	47	0
	MO b1g1g3	3x500	Fspondin2	FP	36	3	14	75	8
	MO b1g1g3	3x500	radar	HC	35	29	63	8	8
	MO b1g1g3	3x500	dermo1	HC	35	9	83	8	8
C	MO foxA1ab + MO b1g1g3	2x720, 3x500	GS 3706	NC	76	0	4	55	41
	MO foxA1ab + MO b1g1g3	2x720, 3x500	col2a1	FP et HC	36	3	3	47	47
	MO foxA1ab + MO b1g1g3	2x720, 3x500	FoxA2	FP	36	0	0	22	78
	MO foxA1ab + MO b1g1g3	2x720, 3x500	Fspondin2	FP	38	5	0	13	82
	MO foxA1ab + MO b1g1g3	2x720, 3x500	radar	HC	37	0	16	84	84
	MO foxA1ab + MO b1g1g3	2x720, 3x500	dermo1	HC	36	3	0	0	97

C1: arrêt après l'anus

C2: arrêt avant l'anus

C3: pas de structures axiales

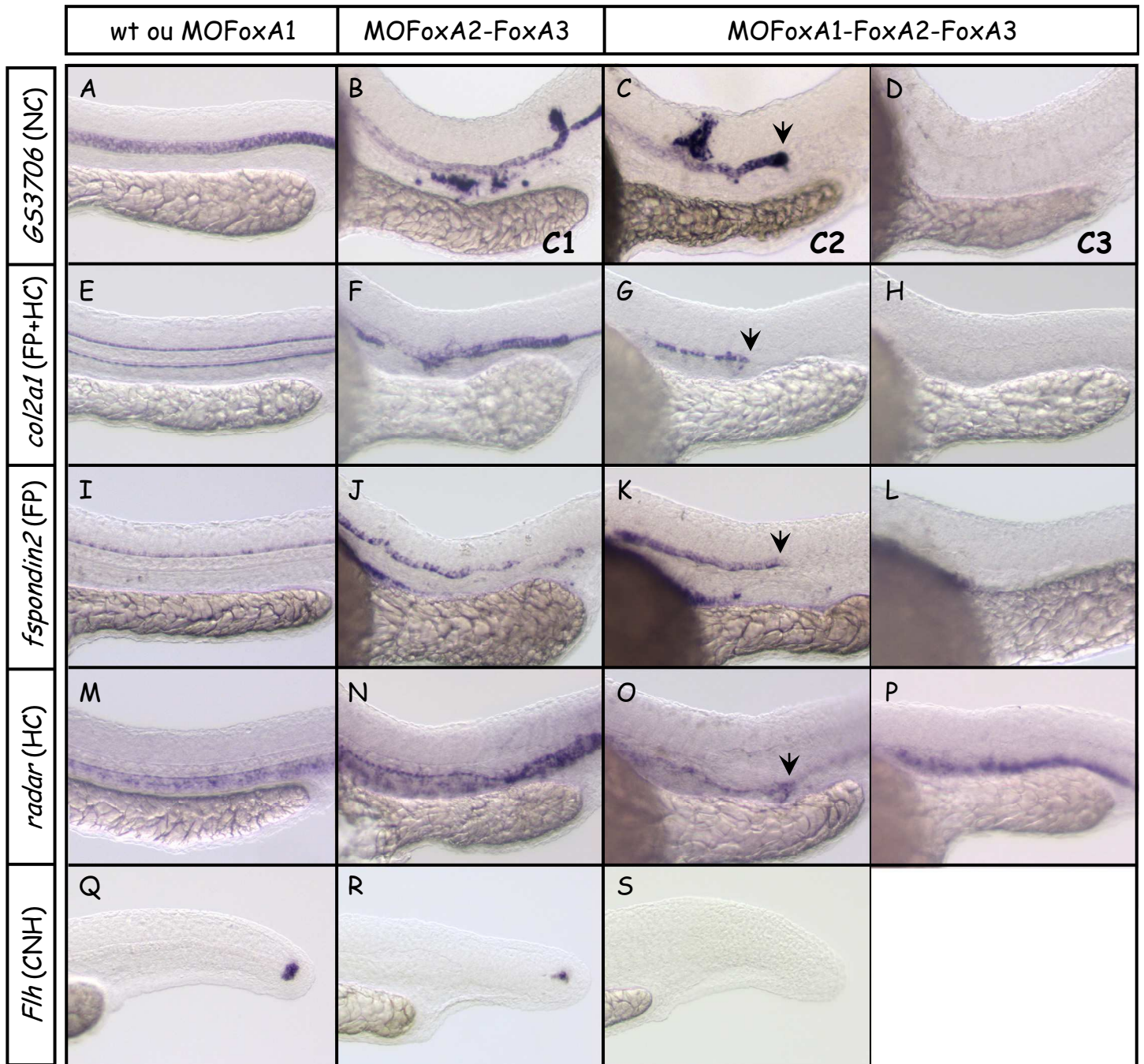
V.2. FoxA1 fonctionne de façon redondante à FoxA2 et FoxA3 dans le développement des structures de la ligne médiane.

J'ai montré, jusqu'à présent, qu'au moins deux membres de la famille FoxA (FoxA2 et FoxA3) participent au maintien des structures axiales au cours du développement embryonnaire. Compte tenu de ces observations, il est fort probable que les effets de l'inactivation de FoxA1 soient masqués par la présence de ces deux facteurs. Pour tester cette hypothèse, j'ai inactivé simultanément FoxA1, FoxA2 et FoxA3. Comme précédemment, j'ai utilisé pour cette expérience des doses de morpholinos conduisant à des phénotypes individuels faibles. Ainsi, si FoxA1 contribue au maintien des structures axiales, la diminution de son activité devrait amplifier le phénotype faible des embryons MOFoxA2-FoxA3.

Alors que la plupart des morphants FoxA2-FoxA3, développent une notochorde qui s'étend sur la quasi-totalité de l'axe AP (Fig.56 : C et G), la moitié des triples morphants MOFoxA1-FoxA2-FoxA3 présente une notochorde interrompue avant l'anus et l'autre moitié ne développe aucune notochorde (Fig.56 : D et H). La disparition de cette structure suite à l'inactivation simultanée de FoxA1, FoxA2, et FoxA3 a été confirmée par l'analyse du marqueur notochordal *GS3706* (Fig.57 : A à D et table 5).

De plus, l'analyse des marqueurs de la plaque du plancher et de l'hypochorde indique que le facteur FoxA1 n'intervient pas seulement dans le développement de la notochorde mais qu'il contribue à la formation de l'ensemble des structures de l'axe (Fig. 57 et Table 5). En effet, la diminution de l'activité de FoxA1 en absence de FoxA2 et FoxA3 conduit à une absence de ces tissus dans près de 80 % des cas, alors que seul 8 % des doubles morphants FoxA2-FoxA3 ne montrent aucune expression des marqueurs de la plaque du plancher (*fspodin2*) ou de l'hypochorde (*dermo1* et *radar*). De plus, comme le révèle le marqueur *flh*, la charnière chordo neurale à l'origine de ces tissus est absente dans le triples morphants MOFoxA1-FoxA2-FoxA3 alors qu'elle est seulement diminuée chez les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (Fig.57 : Q à S).

En conclusion, les facteurs de transcription FoxA1, FoxA2 et FoxA3 fonctionnent de façon redondante dans la mise en place des structures axiales dérivant de la CNH.

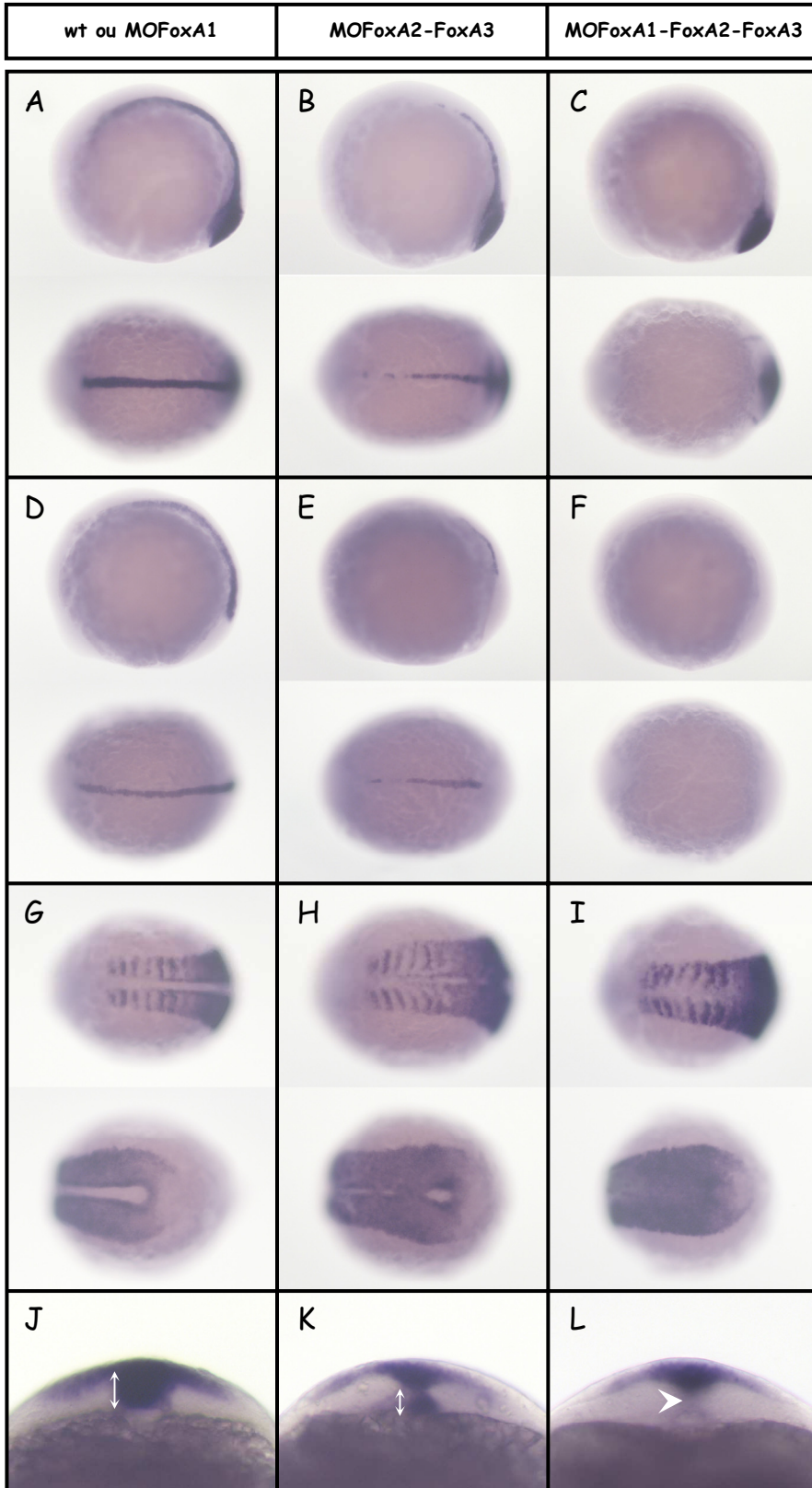


II Figure 57 : La diminution simultanée de l'activité de FoxA1, FoxA2 et FoxA3 abolit le développement de l'ensemble des structures axiales.

Expression à 30 hpf, des marqueurs *GS3706* (A-D), *col2a1* (E-H), *fspondin2* (I-L), *radar* (M-P) et *flh* (Q-T) chez les embryons sauvages (A, E, I, M et Q), les doubles morphants FoxA2-FoxA3 (3x500 μ M de MO_{b1}, MO_{g1} et MO_{g3}) (B, F, J, N et R) et les triples morphants FoxA1-FoxA2-FoxA3 (2x720 μ M de MO FoxA1a et MOFoxA1b et 3x500 μ M de MO_{b1}, MO_{g1} et MO_{g3}) (C-D, G-H, K-L, O-P et S). Pour chaque marqueur, la(les) structure(s) mise(s) en évidence est(ont) indiquée(s) entre parenthèses. NC: notochorde, FP: plaque du plancher, HC: hypochorde et CNH: charnière chordo-neurale.

L'inactivation partielle de FoxA2 et FoxA3 affecte peu le développement des structures axiales (B, F, J et N). La diminution de FoxA1 amplifie fortement le phénotype faible des embryons MOFoxA2-FoxA3. Chez les triples morphants, soit les structures axiales sont interrompues avant l'anus (C, G, K et O), soit elles sont entièrement absentes (D, H, L et P) La diminution de FoxA1 élimine la CNH résiduelle présente chez les morphants FoxA2-FoxA3 (R et S)

Tous les embryons sont présentés en vue latérale, extrémité antérieure à gauche et face dorsale en haut. La distribution statistique des embryons selon les classes C1, C2 et C3 est reportée dans la table 5



II-Figure 58 : FoxA1 fonctionne de façon redondante à FoxA2 et FoxA3 dès le début de la somitogenèse.

Expression à 5 somites, des marqueurs du mésoderme axial, *ntl* (A-C et J-L) et *dermo1* (D-F), et du mésoderme paraxial, *myf5* (G-I) chez les embryons sauvages (A, D et G), les morphants FoxA2-FoxA3 (3x500µM de MO_b1, MO_g1 et MO_g3) (B, E et H), (C, G et K) et les morphants FoxA1-FoxA2-FoxA3 (2x720µM de MOFoxA1a et MOFoxA1b et 3x500 µM de MO_b1, MO_g1 et MO_g3) (C, F et I).

Les territoires d'expression de *ntl* (B), *dermo1* (E) et *myf5* (H) sont faiblement affectés chez les doubles morphants FoxA2-FoxA3. Chez les triples morphants FoxA1-FoxA2-FoxA3, le mésoderme axial est absent et à la place le mésoderme paraxial fusionne le long de la ligne médiane (C, F et I). Le CNH est diminué chez les doubles morphants (K) et absent chez les triples morphants (L).

Les embryons sont présentés en vue latérale, pôle antérieur à gauche et face dorsale en haut (images du haut en A-F) ou en vue dorsale, pôle antérieur à gauche (images du bas en A-F et G-I). J, K et L sont des coupes transversales optiques dans la région caudale des embryons marqués avec *ntl*.

V.3. L'activité de FoxA1 est requise dès le début de la somitogenèse pour maintenir, avec FoxA2 et FoxA3, le développement des structures axiales.

Le gène *foxA1* débute son expression à la fin de la gastrulation, j'ai donc cherché à mettre en évidence le stade à partir duquel le phénotype additif dû à FoxA1 était détectable. Pour cela, j'ai comparé les phénotypes des doubles morphants FoxA2-FoxA3 avec ceux des triples morphants FoxA1-FoxA2-FoxA3, par des hybridations *in situ*, au début de la somitogenèse.

A 5 somites, tandis que le territoire axial est diminué chez les embryons MOFoxA2-FoxA3, ce tissu est absent chez les embryons MOFoxA1-FoxA2-FoxA3 (Fig.58 : A à F). A l'inverse, le mésoderme paraxial qui est légèrement étendu dorsalement en absence de FoxA2 et FoxA3 (Fig.58H), fusionne systématiquement le long de la ligne médiane chez les triples morphants (Fig.58I). Enfin, la charnière chordo-neurale, à l'origine des structures axiales du tronc et de la queue, est déjà absente au stade 5 somites chez les triples morphants FoxA1-FoxA2-FoxA3 (Fig.58 L)

En conclusion, dès le début de la somitogenèse, le facteur de transcription FoxA1 contribue avec FoxA2 et FoxA3 au maintien du territoire axial.

V.4. Conclusions :

Le facteur FoxA1, membre de la famille FoxA exprimé le plus tardivement au cours du développement embryonnaire, participe avec FoxA2 et FoxA3 à la formation de la notochorde, de la plaque du plancher et de l'hypochorde. Son activité, redondante à celles de FoxA2 et FoxA3, est requise dès le début de la somitogenèse afin de maintenir l'identité du mésoderme axial.

Partie II : Discussion et Perspectives

I. Le facteur FoxA3 est indispensable à la différenciation de la glande d'éclosion :

La glande d'éclosion située à la surface de la réserve vitelline se différencie à partir du polster qui dérive du mésoderme axial antérieur, la plaque préchordale. Chez le poisson zèbre, le gène *foxA3*, exprimé dès le stade blastula à la marge dorsale, marque consécutivement la plaque préchordale, le polster et la glande d'éclosion indiquant qu'il pourrait participer à la différenciation du mésoderme axial antérieur. Néanmoins, jusqu'à présent, aucun rôle pour ce facteur de transcription dans ce processus n'avait été décrit. Pendant mon travail de thèse, j'ai montré, pour la première fois, que le facteur de transcription FoxA3 est indispensable à la différenciation de la glande d'éclosion. En effet, en absence de FoxA3, bien que la plaque préchordale soit correctement induite pendant la gastrulation, son programme d'expression génique est altéré et sa différenciation est abolie.

Pendant la gastrulation, l'expression du gène *ntl* dans le mésoderme axial est rapidement éliminée de sa partie antérieure (la plaque préchordale) pour n'être maintenue que dans sa partie postérieure (le chordamésoderme). En absence de FoxA3, cette restriction n'a pas lieu et l'expression de *ntl* persiste dans la plaque préchordale. A l'inverse, l'expression de *ntl* disparaît suite à la surexpression de *foxA3*. Les facteurs de transcription de la famille FoxA, plus connus pour leur rôle activateur, peuvent aussi agir comme des répresseurs de transcription. Sachant que *foxA3* est exprimé dans la plaque préchordale, et compte tenu des éléments précités, FoxA3 pourrait être un répresseur direct de l'expression de *ntl* dans ce tissu. Afin d'identifier l'activité transcriptionnelle de FoxA3, il serait intéressant de réaliser des protéines de fusions entre le domaine de liaison à l'ADN de FoxA3 et un domaine activateur (VP16) ou répresseur de transcription (EnR).

Au cours du développement embryonnaire, le gène *ntl* est important à deux niveaux. Il intervient dans la spécification du chordamésoderme et dans le contrôle des mouvements cellulaires du mésoderme dorsal. Au niveau du mésoderme axial, la plaque préchordale migre en direction du pôle animal tandis que le chordamésoderme est le siège de mouvements de Convergence/Extension. Il a été montré, chez le poisson zèbre, que Ntl est nécessaire à la convergence des cellules du chordamésoderme mais ne participe pas à l'extension de ce tissu

(Glickman et al., 2003). Chez le xénope, Ntl est capable d'inhiber la migration antérieure du mésoderme axial, favorisant ainsi, les mouvements de convergence dorsale (Kwan and Kirschner, 2003). Chez le poisson zèbre, le maintien de l'expression de *ntl* dans la plaque préchordale suite à l'inactivation de FoxA3, pourrait donc modifier le comportement des cellules du mésoderme axial antérieur. Chez les morphants FoxA3, l'endoderme situé de part et d'autre de la plaque préchordale s'étend dorsalement. De plus, la surexpression de *foxA3* semble affecter la migration des cellules de la glande d'éclosion. Compte tenu de ces éléments, l'absence d'une glande d'éclosion différenciée chez les morphants FoxA3 pourrait être la conséquence d'une diminution de la migration antérieure des cellules de la plaque du plancher et d'une augmentation de la convergence dorsale, résultant du maintien ectopique de *ntl* dans ce tissu. Néanmoins, j'ai montré que l'absence de *ntl* n'est pas capable de restaurer la différenciation de la glande d'éclosion dans les morphants FoxA3. Par conséquent, le maintien de l'expression de *ntl* dans la plaque préchordale des morphants FoxA3 ne peut être responsable, à lui seul, de l'absence d'une glande d'éclosion différenciée.

Pour tenter d'identifier d'autres facteurs susceptibles d'expliquer l'absence de la glande d'éclosion chez les morphants FoxA3, j'ai analysé l'expression de gènes marquant spécifiquement la plaque préchordale, tels que les membres des voies de signalisation Wnt et BMP.

En absence de FoxA3, les territoires d'expression des gènes *dkk1* et *frzB*, qui codent pour des inhibiteurs de la voie Wnt, diminuent et se superposent. Chez l'embryon sauvage, le gène *wnt8* est exprimé à la marge de l'embryon, excepté dans sa partie la plus dorsale qui sécrète des inhibiteurs des Wnt. La répression de l'activité des Wnt dans ce territoire est indispensable au développement des structures antérieures. Récemment, il a été montré que FoxA3 coopère avec le facteur Gsc dans ce processus. Il est donc possible qu'en absence de FoxA3, l'activité de la voie Wnt s'étende dorsalement et que l'absence de différenciation de la glande d'éclosion soit une conséquence de cette expansion. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser le territoire d'expression du *wnt8* au début de la gastrulation.

En absence de FoxA3, l'expression préchordale des gènes BMP4 et BAMBI diminue. L'inactivation de *zKLF4*, un autre facteur de transcription impliqué dans la différenciation de la plaque préchordale, abolit l'expression de BMP4 dans la plaque préchordale. Ce gène, qui code pour un facteur de transcription en doigt de zinc, est exprimé dans la plaque préchordale et ses dérivés, du début de la gastrulation jusqu'à 36h. Son inactivation par injection de morpholino produit un phénotype similaire à celui des morphants FoxA3. En effet, la plaque

préchordale est correctement induite, mais sa différenciation n'est pas initiée. Compte tenu de ces similarités, il serait intéressant de comparer l'activité des facteurs FoxA3 et zKLF4 au cours de la différenciation de la glande d'éclosion.

J'ai montré que l'absence d'une glande d'éclosion chez les morphants FoxA3 ne résultait pas de l'absence d'une plaque préchordale. En effet, ce tissu est correctement induit au début de la gastrulation et ne présente aucune mort cellulaire particulièrement importante, ni aucune diminution de la prolifération cellulaire. Si les cellules de la plaque préchordale ne se différencient pas en glande d'éclosion et qu'elles ne meurent pas, alors que deviennent-elles ? L'analyse du territoire endodermique indique que ce tissu s'étend dans le territoire préchordal des morphants FoxA3. Il est donc possible qu'en absence de FoxA3, l'identité de la plaque préchordale ne soit pas maintenue et que les cellules adoptent une identité endodermique. Différentes expériences permettraient de tester cette hypothèse. Premièrement, la réalisation de doubles hybridations in situ fluorescentes permettrait de déterminer si les cellules de la plaque préchordale co-expriment les marqueurs du mésoderme et de l'endoderme. Deuxièmement, le marquage des cellules de la plaque préchordale à l'aide de molécules fluorescentes permettrait de suivre leur devenir au cours du développement embryonnaire. Contribuent-elles aux dérivés de l'endoderme à des stades plus tardifs ? Troisièmement, le potentiel de développement des cellules de la plaque préchordale des morphants FoxA3 pourrait être déterminé par des expériences de transplantation cellulaire. Dans un environnement sauvage, les cellules pour lesquelles foxA3 est inactif ont-elles la capacité de former de la plaque préchordale ou participent-elles à un autre tissu ?

En conclusion, FoxA3 est indispensable à la différenciation de la glande d'éclosion du poisson zèbre. La mise en évidence de l'identité des cellules de la plaque préchordale, de leur potentiel de développement et de leur capacité migratoire en absence de FoxA3 pourrait ouvrir de nouvelles voies dans la compréhension de la fonction de ce facteur de transcription.

II. Les facteurs de la famille FoxA sont nécessaires au développement des structures axiales.

II.1. Les facteurs de la famille FoxA ont des activités redondantes.

Chez le poisson zèbre, comme chez les autres espèces de vertébrés, les gènes de la famille *foxA* sont exprimés dans les structures axiales, suggérant qu'ils jouent un rôle important dans le développement de ces tissus. Cependant, la perte de fonction d'un seul de ces gènes a peu d'effet sur le développement du mésoderme axial. L'inactivation de *foxA2* affecte la différenciation de la plaque du plancher, celle de FoxA3 interfère avec la différenciation de la glande d'éclosion. Au cours du développement embryonnaire, les territoires d'expression des facteurs de la famille *foxA* sont partiellement redondants. Par exemple, les gènes *foxA2* et *foxA3* sont co-exprimés dans la notochorde et la CNH, tandis que la plaque du plancher exprime les gènes *foxA1* et *foxA2*. Il est donc possible que leurs activités se compensent mutuellement et que l'absence d'un seul de ces facteurs ne soit pas suffisante pour affecter significativement le développement des structures axiales.

J'ai montré que l'inactivation simultanée de FoxA2 et FoxA3 a des effets catastrophiques sur le développement des structures axiales. En absence de ces deux facteurs, la notochorde, la plaque du plancher et l'hypochorde sont absentes au niveau du tronc et de la queue à 30 hpf. Dans les cas les plus extrêmes aucune des structures axiales ne se développent. La diminution de l'activité de FoxA1 amplifie encore ce phénotype. Alors que seulement 8% des morphants FoxA2-FoxA3 ne développent aucun dérivé de l'axe, ce phénotype extrême est présent chez près de la moitié des triples morphants FoxA1-FoxA2-FoxA3. Ces résultats démontrent clairement que les membres de la famille FoxA, partiellement co-exprimés dans les structures de l'axe, possèdent des activités redondantes. De plus, ces activités redondantes sont requises dès la gastrulation pour FoxA2 et FoxA3 et dès la somitogenèse pour FoxA1. Un dernier membre de la famille FoxA est le facteur FoxA4. Ce gène est exprimé dès le stade blastula à la marge dorsale. Pendant la gastrulation *foxA4* marque transitoirement la notochorde et à 24 hpf il est exprimé dans la CNH et la plaque du plancher. Ce patron d'expression est partiellement redondant à celui de *foxA2* et de *foxA3*. De plus, l'homologue de *foxA4* chez le xénope est capable d'induire, en combinaison avec le facteur *Xbra* (l'homologue de *ntl*), la formation de notochorde. L'ensemble de ces éléments suggère donc que FoxA4 pourrait, comme les autres membres de la famille FoxA, participer au développement des structures axiales. A la lumière des résultats obtenus pour FoxA1, FoxA2 et FoxA3, il apparaît

indispensable de tester l'activité de ce dernier membre de la famille FoxA. Pour cela, il faudra réaliser des pertes de fonction de FoxA4, seules ou en combinaison avec celles des autres membres de la famille FoxA.

En absence de deux ou trois facteurs de cette famille, j'ai montré que les structures axiales étaient systématiquement éliminées au niveau du tronc et de la queue mais que la région antérieure était moins sensible à cette perte d'activité suggérant que d'autres facteurs pourraient être responsables de leur développement à ce niveau. Ce facteur pourrait être FoxA4. Pour savoir si l'activité de la famille FoxA est essentielle pour le développement des structures axiales sur la totalité de l'axe AP, il est indispensable de déterminer l'effet de l'inactivation simultanée de l'ensemble des membres de cette famille protéique. Néanmoins, l'utilisation de morpholinos pour cette expérience a plusieurs limitations techniques. L'inactivation d'un seul facteur nécessite souvent l'utilisation de plusieurs morpholinos. De plus, pour être efficace les morpholinos doivent être utilisés à de fortes concentrations. Or, à fortes doses, les morpholinos peuvent devenir toxiques et les embryons développent des nécroses. Dans ces conditions, l'inactivation de la totalité des facteurs FoxA semble être difficile à réaliser.

II.2. Les facteurs de la famille FoxA sont requis pour le développement de la Charnière Chordo-Neurale.

J'ai montré que l'élimination des structures axiales en absence des facteurs de la famille FoxA n'est pas identique le long de l'axe AP. En effet, alors que les structures axiales ont tendance à être maintenues dans la région antérieure de l'embryon, la notochorde, la plaque du plancher et l'hypochorde sont systématiquement absentes au niveau du tronc et de la queue. Des expériences de lignages cellulaires, des manipulations embryologiques ainsi que l'analyse de marqueurs moléculaires ont montré que les structures axiales du tronc et de la queue se développent à partir d'une population de précurseurs communs dérivant de l'organisateur : la charnière chordo-neurale (CNH). Néanmoins, il n'existe aucune preuve génétique de l'existence de cette structure. Chez la plupart des mutants étudiés, l'ensemble des trois structures de l'axe est rarement affecté. Le mutant *ntl* ne développe pas de notochorde, mais présente une plaque du plancher élargie. Le mutant *flh* ne présente ni notochorde, ni hypochorde mais les cellules de la plaque du plancher persistent. Les mutants *cyc* ou *oep* ne développent pas de plaque du plancher mais la notochorde et l'hypochorde sont présentes. Les seuls mutants pour lesquels la totalité des structures axiales est éliminé, sont des mutants qui ne développent aucun écusson embryonnaire tel que le mutant *bozozok*. Ici, l'inactivation des

facteurs de la famille FoxA élimine la notochorde, l'hypochorde et la plaque du plancher du tronc et de la queue sans affecter le développement de l'écusson embryonnaire et confirme que ces tissus dérivent d'une population de précurseurs ayant une identité moléculaire commune : la CNH.

L'analyse de cette structure par des hybridations in situ au cours du développement embryonnaire indique que la CNH est absente dès la somitogenèse chez les morphants FoxA1-FoxA2-FoxA3. Cette absence ne résulte pas d'une mort cellulaire ou d'une diminution de la prolifération cellulaire. Cette structure, qui dérive de l'écusson embryonnaire, apparaît à la fin de la gastrulation. On peut donc se demander si, en absence de FoxA2 et FoxA3, la formation de la CNH est initiée. Au cours du développement embryonnaire, de nombreux gènes marquent la CNH, notamment le gène *flh*. Pendant la gastrulation l'expression de *flh* s'étend sur la totalité du chordamésoderme mais dès le début de la somitogenèse son expression se restreint à la partie caudale du mésoderme axial, la CNH. Chez les morphants FoxA2-FoxA3, l'expression de *flh* à la fin de la gastrulation, marque le chordamésoderme excepté dans sa partie la plus caudale. Cette analyse suggère que le développement du mésoderme axial est spécifié mais qu'à la fin de la gastrulation la formation de la CNH n'est pas initiée. Ces observations expliqueraient pourquoi la perte de fonction des facteurs de la famille FoxA affecte différemment le développement des structures axiales le long de l'axe AP. Suite à l'inactivation de ces facteurs, le développement du mésoderme axial est initié et donne la notochorde, la plaque du plancher et l'hypochorde de la partie antérieure de l'axe. Cependant, l'absence d'une CNH correctement spécifiée à la fin de la gastrulation conduit à une absence des structures axiales dans la région du tronc et de la queue. Pour confirmer cette hypothèse, il est indispensable de déterminer précisément le stade auquel la CNH est affectée.

II.3. Que deviennent les précurseurs des structures axiales en absence des facteurs de la famille FoxA ?

J'ai montré au cours de mon étude qu'en absence des facteurs de la famille FoxA le mésoderme axial est correctement induit au début de la gastrulation mais que ce territoire n'est pas maintenu ultérieurement. Chez les morphants FoxA2-FoxA3, je n'ai détecté aucun changement dans l'activité proliférative ou apoptotique des cellules qui soit susceptible d'expliquer la disparition du mésoderme axial pendant la gastrulation. Par conséquent, si les précurseurs des structures axiales sont induits mais ne meurent pas : que deviennent-ils ? L'analyse du mésoderme paraxial montre que ce territoire s'étend dorsalement jusqu'à fusionner le long de la ligne médiane en absence de FoxA2 et FoxA3. Il est possible que

l'identité mésodermique axial des cellules de la ligne médiane ne soit pas maintenue et qu'à la place elles adoptent l'identité du tissu voisin tel que celle du mésoderme paraxial. Pour tester cette hypothèse, plusieurs expériences devront être réalisées. Premièrement, il faudra déterminer et suivre précisément l'identité des cellules de la ligne médiane au cours de la gastrulation. Pour cela, la réalisation de doubles hybridations *in situ* fluorescentes, à l'aide de marqueurs mésodermique axial et paraxial permettra de déterminer l'identité moléculaire (axial ou paraxial ou les deux) des cellules de la ligne médiane. Deuxièmement, il faudra déterminer leur potentiel de développement en absence de FoxA2 et FoxA3 par des transplantations cellulaires (Halpern et al., 1995). Pour cela, des cellules provenant de morphants FoxA2-FoxA3 préalablement marqués, sont greffées chez un embryon receveur à un stade blastula moins avancé. Dans ces conditions, les cellules du donneur ont tendance à contribuer d'avantage aux structures axiales. Ainsi, on pourra savoir si les cellules greffées (qui ne possèdent pas d'activité FoxA2-FoxA3) sont capables, dans un environnement sauvage, de contribuer au mésoderme axial ou si elles participent à un autre tissu ? Troisièmement, le marquage des cellules de l'axe permettra de suivre le devenir de ces cellules au cours du développement embryonnaire. Dans le laboratoire, nous disposons d'une lignée transgénique exprimant la *gfp* sous le contrôle du promoteur *flh* : la lignée *flh:gfp*. Chez ces embryons transgéniques, les précurseurs de l'axe fluorescent dès le début de la gastrulation, et cette fluorescence persiste jusqu'à des stades tardifs (48 hpf). Comme la GFP est une protéine très stable, la fluorescence est présente dans des tissus qui sont normalement dépourvus de l'expression de *flh*. Au stade *shield*, la GFP marque l'écusson embryonnaire, puis elle apparaît dans le mésoderme axial (plaque préchordale et notochorde) et à 24 hpf, l'ensemble des dérivés de l'axe (glande d'éclosion, notochorde, plaque du plancher et hypochorde) fluoresce. L'utilisation de cette lignée serait très intéressante pour déterminer le devenir des cellules axiales en absence des facteurs de la famille FoxA. J'ai réalisé des injections préliminaires pour inactiver FoxA2 et FoxA3 dans cette lignée transgénique. A 30 hpf, en absence de structures axiales, les cellules fluorescentes sont présentes sur la totalité de l'axe AP et semblent être intégrées dans la partie ventrale du tube neural (observations personnelles). De façon surprenante, je n'ai jamais observé de cellules fluorescentes dans les somites. Ces données préliminaires suggèrent qu'en absence de FoxA2 et FoxA3 les cellules du mésoderme axial contribuent au neurectoderme situé immédiatement au dessus et pas au mésoderme paraxial situé latéralement. Dans ces conditions, l'expansion dorsale du mésoderme paraxial observée pendant la gastrulation serait juste une conséquence de l'absence du mésoderme axial qui est passé d'une couche cellulaire profonde (l'hypoblaste /

mésendoderme) à une couche cellulaire plus superficielle (l'épiblaste / neurectoderme). D'autres résultats accumulés au cours de l'étude du phénotype des morphants FoxA2-FoxA3 vont dans ce sens. Pendant la gastrulation, l'expression du gène *lefty2* qui marque la partie ventrale de l'épiblaste (situé au dessus du mésoderme axial) disparaît de cette couche cellulaire. De plus, l'expression de *foxA3* qui est normalement restreinte à la couche hypoblastique, s'étend dans l'épiblaste. Ces données préliminaires sont très encourageantes mais elles nécessitent d'être approfondies. En particulier, il est indispensable d'analyser précisément les limites du mésoderme axial (hypoblaste) et du neurectoderme (épiblaste) pendant la gastrulation en absence des facteurs de la famille FoxA. De plus, les données préliminaires obtenues à 24 hpf avec la lignée transgénique *flh:gfp* devront être confirmées. Le développement de la vidéo-microscopie confocale dans l'institut permettra de suivre *in vivo* le développement des cellules de l'axe en absence de FoxA2 et FoxA3 grâce à l'utilisation de la lignée *flh:gfp*.

II.4. Les facteurs de la famille FoxA sont requis à la fois pour le maintien de l'identité des précurseurs de l'axe et pour leur différenciation ultérieure.

J'ai montré que les facteurs de la famille FoxA sont requis de façon redondante pendant le développement embryonnaire afin de maintenir le développement du mésoderme axial. En absence de ces facteurs, les structures axiales disparaissent le long de l'axe embryonnaire à 30 hpf. Néanmoins, quand les morphants FoxA2-FoxA3 présentent des structures axiales résiduelles, celles ci sont improprement différenciées et leur morphogenèse est altérée. En effet, les cellules de la notochorde sont localement désorganisées et envahissent les tissus environnants, notamment le tube neural. L'expression de *shh*, qui disparaît au moment où les cellules de la notochorde commencent à se différencier, persiste dans cette structure. Les cellules de la plaque du plancher, quant à elles, présentent une forme prismatique au lieu de leur forme cubique caractéristique et elles n'initient pas l'expression de *shh*. De plus, l'analyse de marqueurs du système vasculaire et des muscles somitiques suggère que l'activité des structures axiales résiduelles des morphants FoxA2-FoxA3 est aussi altérée. L'ensemble de ces éléments suggère fortement que les facteurs FoxA participent à la différenciation tardive des structures axiales. Ainsi, ces facteurs seraient requis à deux niveaux au cours du développement embryonnaire : pendant la gastrulation pour maintenir l'identité du mésoderme axial, et à 24 hpf pour permettre aux structures axiales de se différencier. Cependant, de nombreuses questions, ayant trait à la différenciation du mésoderme axial, restent sans réponse à l'heure actuelle. Quelle est la nature de la plaque du plancher résiduelle (MFP, LFP

ou les deux) dans les morphants FoxA2-FoxA3 ? Quel est l'état de différenciation des cellules notochordales ? Sont-elles vacuolisées ? Présentent-elles une membrane péri-notochordale ? Pour apporter des réponses à ces questions, une analyse plus approfondie sera nécessaire.

II.5. Les activités redondantes des membres de la famille FoxA sont-elles conservées chez les vertébrés ?

Chez la souris, la morphogénèse de la ligne primitive est fortement perturbée et les mutants *foxa2* ne développent ni nœud ni aucune des structures de l'axe. Parmi les autres gènes de la famille *foxa* chez les mammifères, seul *foxa1* est exprimé dans les structures de la ligne médiane. Néanmoins, son absence, chez les mutants *foxa1*, n'affecte pas le développement embryonnaire. Il est possible que, comme chez le poisson zèbre, l'activité des de Foxa2 soit capable de compenser celle de Foxa1. Chez le xénope, jusqu'à présent aucune perte de fonction n'a été réalisée et la participation de ces facteurs au cours du développement des structures de l'axe reste à élucider. Néanmoins, cette famille de gène est exprimée dans les structures axiales et les membres de cette famille *foxA* partage des territoires d'expression partiellement redondants.

II.6. Activité des facteurs FoxA2 et FoxA3.

J'ai montré, par des pertes de fonctions, que le développement des structures axiales dépend de l'activité redondante des facteurs FoxA2 et FoxA3. Afin de déterminer leur activité moléculaire j'ai réalisé des expériences de gains de fonctions.

La sur-expression généralisée de *foxA2* et/ou *foxA3* conduit à une duplication partielle de l'axe à 30 hpf qui est constitué d'un tube neural, de somites et d'une notochorde. J'ai montré que cette duplication partielle de notochorde ne résulte pas de l'induction d'un deuxième centre organisateur de Spemann mais d'un élargissement du mésoderme axial pendant la gastrulation. Cependant, en l'état actuel, mon analyse ne me permet pas de savoir si cet élargissement est le fruit d'une induction plus importante de mésoderme axial ou s'il résulte de défauts liés aux mouvements cellulaires (en particulier, les mouvements de Convergence/Extension). Pour pouvoir trancher entre ces deux alternatives, il faudrait analyser précisément l'épaisseur du mésoderme axial. Est-il formé du même nombre de couches cellulaires que chez l'embryon sauvage ? Pour savoir si les mouvements de Convergence-Extension sont affectés chez ces embryons, il faudrait suivre le mouvement des cellules du mésoderme latéral au cours de la gastrulation. Migrent-elles dorsalement de façon identique à celle des embryons sauvages ? S'étendent-elles correctement le long de l'axe AP.

Pour une faible proportion d'embryons (entre 3 et 9 % des embryons), l'expression ectopique de *foxA2*, peut initier la formation d'un axe secondaire partiel. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le xénope. En effet, chez cette espèce, la surexpression des ARN *foxA2* ou *foxA4* initie la formation d'un axe secondaire partiel avec une très faible proportion (moins de 5 % des embryons (Knochel et al., 1992; Ruiz i Altaba and Jessell, 1992; Suri et al., 2004)) En revanche, je n'ai jamais obtenu ce type de phénotype suite à la surexpression de l'ARN *foxA3*. Chez le xénope, aucun homologue de *foxA3* n'a pu être identifié. Ces éléments suggèrent que l'activité de FoxA3 a divergé par rapport à celle de FoxA2.

Alors que *foxA2* et *foxA3* sont en mesure d'élargir le territoire mésodermique axial pendant la gastrulation, j'ai montré, par des injections au pôle animal, que ces facteurs ne sont pas capables d'induire, par eux-mêmes, la formation de mésoderme axial. En conclusion, bien que l'activité redondante des facteurs FoxA2 et FoxA3 soit indispensable au maintien du territoire axial dès le stade gastrula, ces résultats confirment qu'ils ne sont pas suffisants pour initier leur développement.

II.7. Qu'y a-t-il en amont des facteurs de la famille FoxA ?

Chez le poisson zèbre, l'expression de *foxA3* débute avant celle de *foxA2* et marque fortement la plaque préchordale et de façon moins intense la notochorde. Après la gastrulation, son expression disparaît de la notochorde (à l'exception de l'extrémité caudale à l'origine de la CNH) mais persiste dans la plaque préchordale jusqu'à des stades tardifs. L'expression du gène *foxA2*, quant à elle, est initiée au début de la gastrulation dans l'écusson embryonnaire puis elle marque uniquement les cellules du chordamésoderme. Les gènes *foxA2* et *foxA3* sont donc exprimés de façon différente le long de l'axe AP (*foxA3* étant plus antérieur à *foxA2*) et au cours du temps (*foxA3* étant initié avant *foxA2*). La voie de signalisation Nodal est indispensable à la spécification AP des structures axiales. La plaque préchordale, située antérieurement, est spécifiée par une forte stimulation de la voie Nodal tandis que le chordamésoderme, plus postérieur, requiert des doses moins importantes. Par ailleurs, différentes études ont montrées que les gènes de la famille *foxA* sont des cibles de la voie Nodal. Compte tenu de ces éléments, il serait intéressant de déterminer si les expressions des gènes *foxA2* et *foxA3* sont induites par Nodal de façon dose-dépendante. On s'attend à ce que *foxA3*, exprimé plus antérieurement que *foxA2*, nécessite les doses les plus fortes. Pour tester cela, il faudrait réaliser des injections de doses croissantes de l'ARN *cyclops* (*nodal*) au pôle animal et déterminer si l'expression de *foxA2* et *foxA3* est induite au début de la gastrulation.

De plus, l'utilisation de cycloheximide permettrait de vérifier l'activité directe de Nodal sur l'expression de ces gènes.

II.8. Qu'y a-t-il en aval des facteurs de la famille FoxA ?

Récemment une liste non exhaustive des gènes cibles de la famille FoxA a été établie (Friedman and Kaestner, 2006). Parmi ces gènes, très peu sont connus pour leur rôle dans le développement des structures axiales. Chez les vertébrés, plusieurs études impliquent le facteur de transcription FoxA2 dans la régulation de l'expression de Sonic Hedgehog. En effet, l'identification et l'analyse des séquences régulatrices responsable de l'expression de *shh* dans les structures de la ligne médiane, chez le poisson zèbre et la souris, ont mis en évidence des sites de liaison fonctionnels pour les facteurs de la famille FoxA (Chang et al., 1997; Epstein et al., 1999; Jeong and Epstein, 2003; Muller et al., 1999). Chez les mutants *monorail/foxA2*, l'expression de *shh* est induite mais elle n'est pas maintenue à 24 hpf (Norton et al., 2005). En absence de FoxA2 et Foxa3, j'ai montré que l'expression des gènes de la voie Hedgehog est fortement altérée. Cependant, comme nous l'avons vu dans l'introduction, cette voie de signalisation n'est pas indispensable au développement des structures axiales. En effet chez les mutants pour lesquels la voie de signalisation Hedgehog est inactive, seule la différenciation de la LFP est affectée (Chen et al., 2001; Schauerte et al., 1998). Par conséquent, l'altération de la voie Hedgehog en absence des facteurs de la famille FoxA, n'est pas responsable du phénotype des doubles morphants. Dans les années à venir, l'identification des cibles génétiques des facteurs de transcription de la famille FoxA sera essentielle pour comprendre, au niveau moléculaire, le mécanisme d'action de ces facteurs de transcription dans le maintien de l'identité du mésoderme axial et sa différenciation ultérieure. Le développement des cribles utilisant des puces à ADN pourrait être une bonne alternative afin d'identifier de nouvelles cibles des facteurs de transcription de la famille FoxA et permettrait ainsi de mettre en évidence de nouveaux acteurs dans le développement du mésoderme axial.

III. Les facteurs de la famille FoxA sont partiellement redondant à Flh :

III.1. L'absence de structures axiales chez les morphants FoxA2-FoxA3 ne résulte pas de la simple absence de Flh :

En absence des facteurs FoxA2 et FoxA3, le mésoderme axial est induit au début de la gastrulation, mais son identité n'est pas maintenue. Il en résulte une disparition des structures axiales le long de l'axe AP des doubles morphants à 30 hpf. Chez le poisson zèbre, le gène *flh* est indispensable pour le développement de la notochorde et de l'hypochorde. Comme pour les morphants FoxA2-FoxA3, le mésoderme axial des mutants *flh* est induit mais son identité n'est pas maintenue pendant la gastrulation. Ces similarités phénotypiques laissent supposer que la disparition des structures axiales chez les morphants FoxA2-FoxA3 pourrait être le résultat de l'absence du facteur Flh. J'ai montré qu'en absence de FoxA2 et FoxA3, l'expression de *flh* est correctement induite et à 80 % d'épibolie, bien que son territoire d'expression soit réduit, l'expression de *flh* persiste dans le chordamésoderme. Seule la partie la plus postérieure/marginale de l'axe, à l'origine de la CNH, est dépourvue de l'expression de *flh*. Il est possible que FoxA2 et FoxA3 soient requis pour maintenir l'expression de *flh* dans cette structure et que l'absence de *flh* participe à la disparition des structures axiales du tronc et de la queue. Cependant, alors qu'à 30 hpf, j'ai observé une disparition totale des structures axiales chez les morphants FoxA2-FoxA3 les plus affectés, je n'ai jamais observé de perte totale de l'expression de *flh* pendant la gastrulation.

L'ensemble de ces éléments indique que le phénotype des morphants FoxA2-FoxA3 ne résulte pas d'une simple absence de Flh. En conclusion, il semble que l'activité de FoxA2 et FoxA3 dans la formation des structures axiales soit indépendante de celle de Flh.

III.2. Les facteurs FoxA2, FoxA3 et Flh ont des activités partiellement redondantes :

Alors que les activités de FoxA2, FoxA3 et Flh semblent être indépendantes les unes des autres, la similarité des phénotypes liés à leur perte de fonction suggère, néanmoins, que ces facteurs possèdent des activités redondantes pendant la gastrulation. J'ai montré que la diminution simultanée de ces trois facteurs de transcription amplifie fortement les phénotypes faibles liés à leur inactivation individuelle et cela dès le stade gastrula. En effet, chez les triples morphants Flh-FoxA2-FoxA3, le territoire axial, qui est correctement induit, est

entièrement éliminé au profit du mésoderme paraxial qui fusionne le long de la ligne médiane. Ces résultats démontrent que les facteurs Flh, FoxA2 et FoxA3 ont des activités redondantes dans le maintien de l'identité du mésoderme axial au cours de la gastrulation.

Les morphants Flh et FoxA2-FoxA3 présentent des phénotypes similaires pendant la gastrulation, cependant à 30 hpf, on note plusieurs différences remarquables. Premièrement, la perte de FoxA2 et FoxA3 abolit le développement de l'ensemble des structures axiales, alors que seulement deux d'entre elles (la notochorde et l'hypochorde) sont absentes chez les morphants Flh. Chez ces derniers, la plaque du plancher présente des interruptions le long de l'axe embryonnaire mais elle est tout de même présente. Deuxièmement, les morphants Flh ne développent pas de notochorde et d'hypochorde sur la totalité de l'axe AP. En revanche, chez les morphants FoxA2-FoxA3, les structures axiales disparaissent progressivement de la partie postérieure vers la partie antérieure de l'embryon.

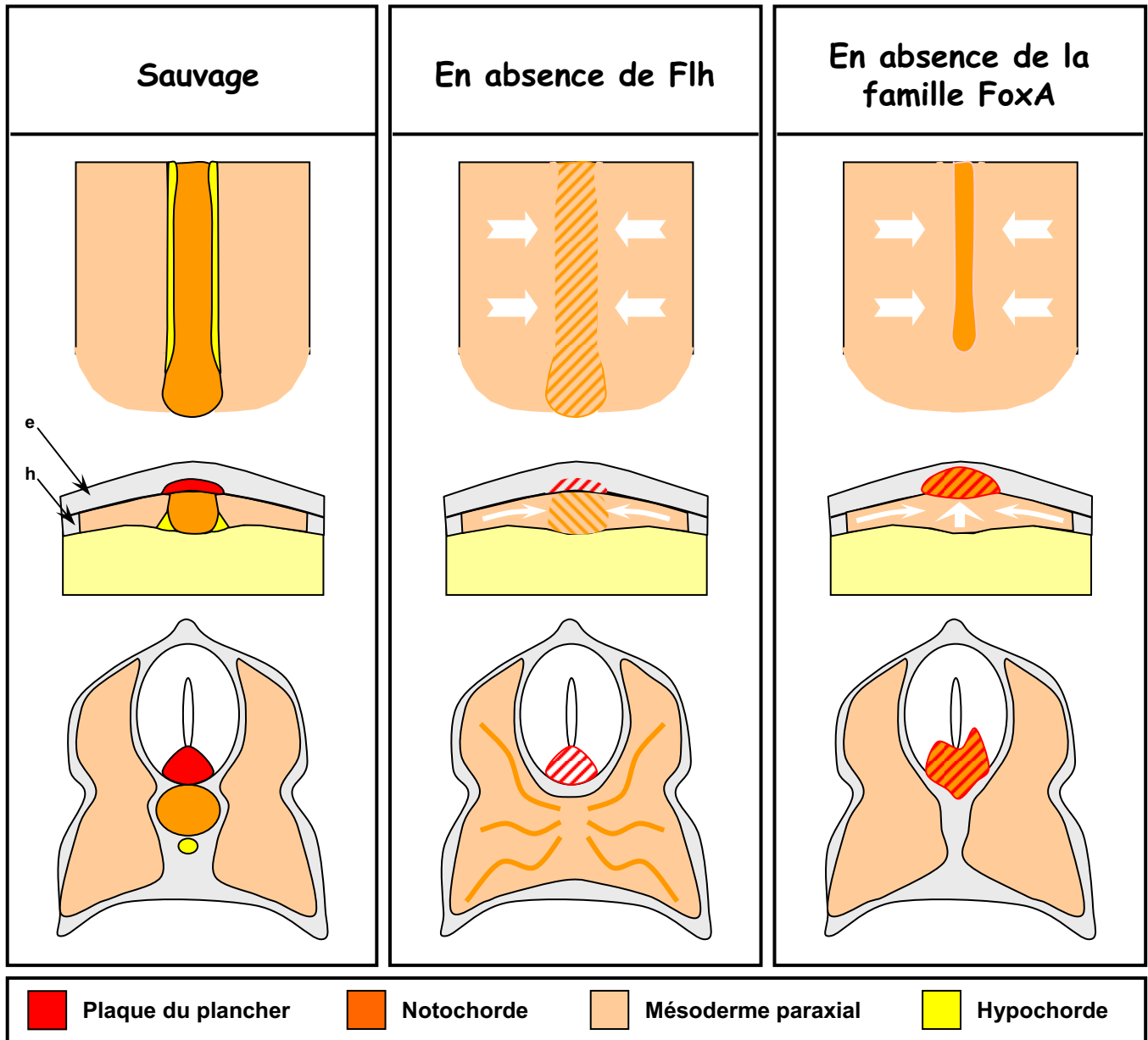
Ces observations indiquent que les facteurs Flh, FoxA2 et FoxA3 possèdent des activités qui ne sont que partiellement redondantes. Flh interviendrait spécifiquement pour promouvoir le développement des précurseurs de la notochorde et de l'hypochorde alors que FoxA2 et FoxA3 seraient requis pour maintenir une population de précurseurs à l'origine de l'ensemble des structures de l'axe du tronc et de la queue.

III.3. Modèle :

A partir des résultats accumulés pendant ma thèse, j'ai tenté d'établir un modèle de fonctionnement des facteurs de la famille FoxA dans le développement des structures axiales par rapport à celui de Flh. Ce modèle est présenté Figure 59.

Tout d'abord, en absence de Flh le mésoderme axial est correctement induit mais son identité n'est pas maintenue pendant la gastrulation. A la place, les cellules de l'axe adoptent l'identité du mésoderme paraxial qui fusionne le long de la ligne médiane. Ainsi, à 30 hpf, les précurseurs de l'axe se différencient en cellules musculaires au lieu de donner de la notochorde. Les précurseurs de l'hypochorde sont situés à la frontière entre le mésoderme axial à l'origine de la notochorde et le mésoderme paraxial. L'absence d'hypochorde chez les mutants *flh*, pourrait donc être une simple conséquence de l'expansion dorsale du mésoderme somitique dans le territoire axial.

En absence des facteurs FoxA, le développement du mésoderme axial est initié mais, comme en absence de Flh, son identité n'est pas maintenue au cours de la gastrulation. Cependant, sur la base des observations préliminaires réalisées avec la lignée transgénique *flh:gfp*, contrairement aux morphants Flh, chez les embryons dépourvus de FoxA2 et FoxA3, les



II-Figure 59 : Modèles expliquant le rôle des facteurs Flh et FoxA au cours du développement des structures axiales.

Schémas représentant le développement des structures axiales chez des embryons sauvages (panneau de gauche), dépourvus de l'activité de Flh (panneau du centre) ou de celle des facteurs de la famille FoxA (panneau de droite). Pour chaque condition, les embryons sont représentés à la fin de la gastrulation en vue dorsale (dessins du haut) et en coupe transversale (dessins du milieu); ou à 30 hpf en coupe transversale (dessins du bas).

En absence de Flh, le mésoderme axial est induit mais son identité n'est pas maintenue pendant la gastrulation. A la place, les cellules adoptent l'identité du mésoderme paraxial qui fusionne le long de la ligne médiane. A 30 hpf, les précurseurs des structures axiales se différencient en fibres musculaires au lieu de donner de la notochorde.

En absence des facteurs FoxA, le territoire mésodermique axial est induit mais son identité n'est pas maintenue au cours de la gastrulation. A 30 hpf, les précurseurs des structures axiales sont intégrés dans la partie ventrale du tube neural suggérant que, pendant la gastrulation, ils sont passés de la couche hypoblastique (h) (mésoderme), à la couche épiblastique (e) (neurectoderme).

cellules de l'axe ne participent pas au mésoderme somitique mais sont intégrées dans le tube neural ventral à 30 hpf. On peut donc supposer que, pendant la gastrulation, les précurseurs des structures axiales, normalement situés dans la couche hypoblastique (mésoderme), seraient intégrés à la couche épiblastique (neurectoderme). Dans ces conditions, l'expansion dorsale du mésoderme paraxial reflèterait simplement l'absence d'un territoire mésodermique axial. Ce modèle est valable essentiellement pour le développement des structures axiales du tronc et de la queue qui dérivent de la charnière chordo-neurale. En effet, en absence de FoxA2 et FoxA3, les structures axiales antérieures sont rarement éliminées indiquant que d'autres facteurs sont responsables de leur développement. J'ai montré que la simple diminution de Flh est capable d'éliminer ces structures résiduelles. Ces résultats suggèrent que le développement des structures axiales antérieures dépend plutôt de l'activité de Flh que de celles de FoxA2 et FoxA3. Cependant, on ne peut exclure que la persistance des structures axiales antérieures en absence de FoxA2 et FoxA3 ne soit une conséquence de la présence d'un dernier membre de la famille FoxA, le facteur FoxA4.

Bien que ce modèle soit très attractif, de nombreuses questions restent sans réponse. Tout d'abord, quelle est l'identité des précurseurs de l'axe qui sont présents dans le tube neural ventral des morphants FoxA2-FoxA3 ? S'agit-il de cellules mésodermiques qui ont simplement changé de localisation histologique ou s'agit-il de cellules ayant adopté une nouvelle identité, celle du neurectoderme ? En d'autres termes, la présence des précurseurs de l'axe dans le tube neural ventral est-elle due à un problème mécanique ou à une transdifférenciation ? La résolution de ces questions est essentielle à la compréhension de l'activité des facteurs de transcription de la famille FoxA au cours du développement des structures axiales. Deuxièmement, quelles sont les relations épistatiques entre les gènes *flh* et ceux de la famille *foxA*. Les phénotypes des simples morphants Flh et des doubles FoxA2-FoxA3 sont différents à 30 hpf. Dans les triples morphants Flh-FoxA2-FoxA3, quel est le phénotype qui prévaut ? L'ensemble des structures axiales est absent, comme chez les morphants FoxA2-FoxA3, mais que deviennent ces cellules : du mésoderme paraxial ou du tube neural ventral ? Enfin, quelle est la contribution relative de ces facteurs de transcription au cours du temps. Les structures axiales antérieures se développent à partir de l'écusson embryonnaire avant celles du tronc et de la queue qui dérivent de la CNH. Contrairement au facteur Flh, dont la présence est requise pour le développement des structures axiales sur toute la longueur de l'axe AP, les facteurs FoxA2 et FoxA3 ne semblent pas être nécessaires à leur développement

dans la région antérieure. Le maintien de l'identité des cellules du mésoderme axial dépend-il initialement de Flh puis de FoxA2 et FoxA3 ?

IV. Conclusions

Au cours de ma thèse, j'ai montré que les facteurs de la famille FoxA sont indispensables au développement des structures axiales. En effet, bien que la contribution individuelle des membres FoxA1, FoxA2 et FoxA3 pendant la formation de ces tissus, reste modérée, ces protéines fonctionnent de façon redondante afin de maintenir l'identité du mésoderme axial au cours de la gastrulation. De plus, j'ai démontré que l'activité de ces molécules est partiellement redondante à celle d'un autre facteur essentiel au développement de l'axe, la protéine Floating head. Ainsi, bien que l'induction du mésoderme axial requiert des mécanismes moléculaires indépendants de la présence de FoxA et Flh, le maintien de l'identité de ce tissu et sa différenciation ultérieure semble faire intervenir un nombre important de facteurs de transcription qui possèdent des activités redondantes.

Conclusion



Conclusion

Pendant mes trois années d'études doctorales, je me suis intéressée à deux fonctions essentielles de l'écusson embryonnaire du poisson zèbre, la structure analogue du centre organisateur de Spemann : sa participation dans la mise en place de l'axe DV et sa différenciation en structures axiales.

J'ai montré que la marge dorsale est le siège d'activités redondantes importantes. En effet, elle exprime de nombreux antagonistes des BMP qui coopèrent pour restreindre l'activité de ce morphogène à la face ventrale de l'embryon. De plus, plusieurs facteurs de transcription, qui fonctionnent de façon partiellement redondante lors du développement des structures axiales, sont aussi exprimés au niveau de la marge dorsale. Ainsi, qu'il s'agisse des régulations post-traductionnelles ou transcriptionnelles, l'activité de la marge dorsale au cours du développement embryonnaire précoce est prise en charge par de nombreuses molécules redondantes. On peut se demander pourquoi une telle redondance est présente au niveau de la marge dorsale et quel est son intérêt pour l'embryogenèse ?

Les fonctions de la marge dorsale, le développement d'un axe vertébral et la mise en place d'une polarité DV, sont essentielles au développement embryonnaire. On peut donc imaginer que la redondance fonctionnelle est une stratégie utilisée au cours de l'embryogenèse afin de préserver au maximum l'activité de cette région. Ainsi, si un stress environnemental, une mutation par exemple, affecte l'activité d'une des molécules exprimées au niveau de l'écusson embryonnaire, la fonction générale de cette structure peut néanmoins être maintenue. Deux stratégies peuvent être utilisées pour générer de la redondance fonctionnelle : soient l'organisme utilise des protéines ayant des origines différentes mais qui assurent une fonction identique (c'est le cas des protéines Chd, Nog1 et Fstl2); soient les protéines possèdent des activités redondantes car elles ont évolué à partir d'un ancêtre commun (c'est le cas des facteurs de transcription de la famille FoxA). Dans les deux cas, l'utilisation de molécules capables de se compenser mutuellement pour une fonction donnée de l'organisme n'est pas unique à la marge dorsale de l'embryon de poisson zèbre mais elle est utilisée chez la plupart des espèces et dans des systèmes biologiques très variés. Par exemple, la différenciation des cellules musculaires à partir des somites fait intervenir les protéines MyoD, Myf5, Myogenin et MRF4 qui sont des facteurs de transcription de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix) définissant la famille MRF (Myogenic Regulatory Factors). Ces facteurs possèdent à la fois des activités spécifiques mais aussi des activités redondantes

(Chanoine et al., 2004). Chez la souris, les facteurs Myf5 et MyoD sont requis dans la formation des myoblastes à partir des précurseurs somitiques et peuvent se compenser mutuellement. En effet, alors que les mutants *myf5* ou *myoD* présentent des muscles squelettiques apparemment correctement développés, les doubles mutants *myoD;myf5* sont complètement dépourvus de myoblastes et de muscles squelettiques (Rudnicki et al., 1993). De même les facteurs MRF4 et Myogenin possèdent des activités redondantes puisque l'expression de *MRF4* est capable de restaurer la différenciation des fibres musculaires à partir de cellules souches mutantes pour le gène *myogenin* (Sumariwalla and Klein, 2001).

Chez les vertébrés, un autre système faisant appel à une famille de protéines ayant une origine commune et possédant des activités partiellement redondantes est celle codée par les gènes *hox* (pour revue : Kmita and Duboule, 2003). Chez la drosophile, on distingue un seul et unique groupe de gènes *hox* composé de 8 membres. Les études menées chez les vertébrés ont montrées que ce groupe ancestral a été dupliqué deux fois de sorte que l'on distingue 4 groupes paralogues chez la souris. Parmi ces gènes paralogues, certains possèdent des activités identiques. En effet, des expériences de *Knock-In* réalisées chez la souris ont montrées que les gènes *hoxa3* ou *hoxa1* pouvaient être substituées par les paralogues *hoxd3* ou *hoxb1*, respectivement (Greer et al., 2000; Tvrdik and Capecchi, 2006). De plus, la perte progressive des différents paralogues *hox4* entraîne une augmentation, dose-dépendante, du nombre de vertèbres affectées (Horan et al., 1995). On peut mettre en parallèle ces données avec celles obtenues pour la famille des gènes *foxA*. Chez les vertébrés, il existe 3 à 4 membres (selon les espèces) qui composent la famille FoxA, alors que chez la drosophile on ne distingue qu'un seul et unique gène homologue, le gène *fork head*. On peut donc imaginer que ces facteurs possèdent des activités redondantes car ils ont évolués à partir d'un ancêtre commun. Ces quelques exemples illustrent le fait que la redondance fonctionnelle est une stratégie énormément utilisée chez les vertébrés afin de préserver les processus fondamentaux du développement embryonnaire.

Par ailleurs, une caractéristique particulière des téléostéens augmente encore cette redondance fonctionnelle. En effet, chez ces poissons une duplication génomique a permis la création de plusieurs paralogues pour un gène donné (pour revue : Hurley et al., 2005). Ainsi, chez le poisson zèbre, on ne distingue pas 4 groupes paralogues de gènes *hox* comme chez la souris mais 7 groupes paralogues (Amores et al., 1998). De plus, alors qu'il n'existe qu'un seul et unique gène *noggin* chez les mammifères, on en distingue 3 chez le poisson zèbre et la somme de leur patron d'expression récapitule tous les aspects de l'expression du gène *noggin* chez la souris (Furthauer et al., 1999). Ainsi, bien que la duplication du génome du poisson

zèbre ne puisse être responsable à elle seule de la redondance fonctionnelle observée chez cette espèce, elle participe néanmoins à cet aspect.

Revenons à la question fondamentale de la biologie du développement, c'est-à-dire : Comment une simple cellule œuf est-elle capable de donner un organisme multicellulaire complexe ?

Nous avons évoqué dans l'introduction différentes étapes essentielles permettant cette transformation : l'acquisition d'une pluricellularité par des divisions cellulaires, la diversification de l'identité cellulaire par des étapes de spécification et de différenciation, ainsi que la création d'une organisation par des évènements morphogénétiques complexes. Il existe donc une étape supplémentaire indispensable à la mise en œuvre des éléments cités précédemment, il s'agit du contrôle de l'embryogenèse. Les organismes ne se développent pas dans un environnement isolé mais ils sont soumis à de nombreuses contraintes et stress environnementaux. Par conséquent, il est fondamental pour le bon déroulement de l'embryogenèse que les fonctions moléculaires et cellulaires impliquées dans les différentes étapes du développement puissent être maintenues quelque soient les conditions environnementales. Pendant mon travail de thèse, j'ai observé qu'il existe de nombreuses molécules capables de se compenser mutuellement pour une fonction donnée et que cette redondance fonctionnelle est une stratégie largement utilisée au cours de l'embryogenèse des vertébrés.

Annexes

Matériel et Méthodes

I. Souches de poisson 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.

Les embryons homozygotes mutants ont été obtenus par simple croisement d'adultes hétérozygote des souches mutantes *ogon*^{m60} (Miller-Bertoglio et al., 1999), *chordino*^{tm84} (Hammerschmidt et al., 1996), *notail*^{b195} (Schulte-Merker et al., 1994b).

II. Déchorionnage et maintien 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 MgSO₄

0,6mM Ca(NO₃)₂

5mM HEPES pH7,6

III. Injections dans les embryons de poisson zèbre

III.1. Préparation de la solution d'injection

Les molécules à injecter (ARN 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⁺/Cl⁻ reproduisent les conditions osmotiques des cellules embryonnaires.

III.2. Injection généralisée

Les injections généralisées se font directement dans la partie centrale du vitellus, à l'endroit où le flux vitellin remonte vers les blastomères (entraînant de façon homogène les produits injectés dans les blastomères) aux stades 1 à 2 cellules. A partir du stade 4 cellules, la répartition des produits injectés est moins homogène.

III.3. Injection localisée et tri des embryons selon la répartition DV des clones injectés

Au stade 16 cellules, le blastoderme est plan et présente une organisation en carré de 4 x 4 cellules. Les blastomères situés les plus en périphérie se différencient préférentiellement en cellules marginales en début de gastrulation. Les injections se font à main levée dans un blastomère de la périphérie, avec la solution contenant les ARN à tester ainsi que celui codant pour la GFP (25 ng/μL). Pour trier les embryons en fonction de la position DV des cellules injectées, les embryons ont été observés sous un éclairage épi-fluorescent

III.4. Injection au pôle animal

A partir du stade 64 cellules le blastoderme est composé, en son centre, de 4 couches cellulaires le long de l'axe animal-marginal. Les cellules les plus animales se différencient préférentiellement en ectoderme (Kimmel et al., 1990).

Les expériences visant à sur-exprimer une molécule au pôle animal se font par des injections dans un blastomère animal du stade 64 cellules au stade 128 cellules. L'injection se fait à l'aide d'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. Au début de gastrulation, les embryons sont observés sous épifluorescence afin de vérifier que le clone issu du blastomère injecté a bien conservé une position animale.

III.5. 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).

IV. Synthèse des ARN sens

Tous les ARN qui ont été utilisés pour des expériences de sur-expression ont été clonés dans un vecteur *pCS2+*. Les ARN sens ont été synthétisés à partir du promoteur SP6 avec le kit AMBION (AMBION SP6 mMessage mMachin 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 mesure de la densité optique d'un échantillon et la "qualité" de l'ARN synthétisé visualisé sur gel d'agarose.

V. Utilisation des Morpholinos

Tous les morpholinos ont été commandés et synthétisés par GeneTools. Ils sont re-suspendus dans une solution de Danieau 1x, pour réaliser une solution stock de 4mM (75µL pour 300nmol).

Séquences des morpholinos utilisés:

MO-chd:	5' ATCCACAGCAGCCCCTCCATCATCC 3'	(couvre l'ATG)
MOa-nog1:	5' GCGGGAAATCCATCCTTTTGAAATC 3'	(couvre l'ATG)
MOb-nog1:	5' GAGATTAACGCGGGATTTATCCGT 3'	(couvre la région 5' UTR)
MOa-fst1:	5' CTGACGCTTTAGCATCCTTAGCATG 3'	(couvre l'ATG)
MOb-fst1:	5' GACGAGCAGCGCAAAGTAATCTTC 3'	(couvre la région 5' UTR)
MOa-fstl2:	5' AAACACGGGTAAACACCGAAACATC 3'	(couvre l'ATG)
MOb-fstl2:	5' AAAAAACGCCGCTGGGTGTCTGT 3'	(couvre la région 5' UTR)

MO-ogo:	5' ACAGCAGCAGACTGAATAGAGACAT 3'	(couvre l'ATG)
MO1-TSK	5' AGAAGAGGCACAGCAGAGACGCCAT 3'	(couvre l'ATG)
MO2-TSK	5' GGTGAGCATGTGCCGCGACTCGTCC 3'	(couvre la région 5' UTR)
MO1-Grm	5' TGACAGCTAATGCGTCTTTAGTCAT 3'	(couvre l'ATG)
MO2-Grm	5' CCTCAGTTTAATAGTGGTTTAA 3'	(couvre la région 5' UTR)
MO-b1	5' CCTCCATTTTGACAGCACCGAGCAT 3'	(couvre l'ATG)
MO-g1:	5' AGCTCAACATCCCCAAATAAAGTTG 3'	(couvre l'ATG)
MO-g3	5' CTCGTAAGAAACGGGATAGTGA CTG 3'	
MO-FoxA1a	5' CATTTCACTGCGCCCAACATTATG 3'	(couvre l'ATG)
MO-FoxA1b	5' GCACATGCAGTTCGCACACTCACAG 3'	(couvre la région 5' UTR)
MO-flh	5' GTAAGCTCTCCGGGAATCTGCATG 3'	(couvre l'ATG)

VI. Simple Hybridations *in situ*

Les embryons sont fixés durant 12 à 24 h au stade souhaité 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 anti-sens utilisées ont été synthétisées à partir du vecteur linéarisé ou de produits PCR. Les sondes utilisées et les informations utiles pour leur synthèse sont disponibles sur le site : <http://zfin.org>. Entre 50 et 150 ng d'ARN antisens sont utilisés par réaction.

VII. Doubles Hybridations *in situ* Fluorescentes (FISH):

La synthèse des sondes ARN anti-sens se fait selon le même protocole que celui décrit pour les simples hybridations *in situ*. Cependant, la première sonde est marquée à la digoxigénine (DIG) tandis que la deuxième est marquée avec le Dinitrophenyl (DNP) (DNP-11-UTP de Perkin Elmer, N° NEL555). La détection des sondes DNP étant moins efficace que celle des sondes DIG, il est préférable d'utiliser un marquage DNP pour la sonde donnant le signal le plus fort lors des simples hybridations *in situ*.

Les étapes de prétraitement des embryons pour les FISH sont identiques à celles réalisées pour les simples hybridations *in situ*, à l'exception d'une étape de blanchiment des embryons

au peroxyde d'hydrogène afin d'éliminer la peroxydase endogène (1% de H₂O₂ dans du PBT (0,8% NaCl ; 0.02% KCl ; 20 mM tampon phosphate; 0,1 % Tween-20 ; pH 7.3)) pendant une durée allant de 15 à 30 minutes selon le stade embryonnaire (15 minutes pour des embryons de stade 75% d'épibolie au stade 14-16 somites ; 25 minutes pour des embryons de 24 hpf ; 30 minutes pour des embryons de 48 hpf et plus).

Les embryons prétraités et bloqués, sont incubés sur la nuit en présence de 100 à 200 ng de chacune des sondes ARN antisens (sonde DIG et sonde DNP) diluée dans la solution d'hybridation (50 % formamide, 5x SSC (1x SSC : 0.15 M sodium chloride; 0.015 M trisodium citrate), 500 µg/ml tRNA, 50 µg/ml heparin, 0,1 % tween-20) à une température de 65 °C.

Le lendemain, les embryons subissent plusieurs lavages successifs de 20 minutes chacun à la température d'hybridation. Après avoir été rapidement rincés avec la solution d'hybridation, les embryons sont lavés successivement avec des solutions de concentration décroissante en formamide : 50 % de formamide/ 2xSSCT (2xSSC ; 0,1 % tween-20) (2 lavages), puis 25 % de formamide/ 2xSSCT (1 lavage). Les derniers lavages sont réalisés en absence de formamide avec une solution de 2x SSCT (2 lavages) puis 0,2 x SSCT (3 lavages de 30 minutes). Après avoir été rapidement rincés avec une solution tampon TNT (100 mM TrisHCl pH 7.5 ; 150 mM NaCl ; 0,5 % Tween-20), les embryons sont pré-incubés avec une solution bloquante contenant 1% d'agents bloquants (*blocking reagent* de Roche diagnostics, N°1096176) dilué du TNT à température ambiante pendant au minimum 1 heure. La détection de la sonde ARN antisens marquée à la digoxigénine est réalisée, sur la nuit et à 4°C, en incubant les embryons avec l'anticorps anti-DIG couplé à la peroxydase (Roche Diagnostics) dilué au 1/400^{ème} dans la solution bloquante.

Le lendemain, les embryons sont abondamment rincés avec le tampon TNT pour éliminer l'excès d'anticorps (8 lavages de 15 minutes). La révélation est réalisée en utilisant le système TSA selon les instructions du manuel (*TSA Kit N°12, Alexa Fluor 488 Tyramide* de Molecular Probe, N° T20922). La coloration est réalisée à l'abri de la lumière pendant 1 heure et stoppée par plusieurs lavages avec le tampon TNT. Pour préserver le marquage fluorescent, à partir de cette étape il est impératif de garder les embryons à l'abri de toutes sources lumineuses.

Pour la détection de la deuxième sonde ARN antisens (sonde DNP), les embryons sont à nouveau traités au peroxyde d'hydrogène afin d'inactiver la peroxydase couplée à l'anticorps anti-DIG (traitement de 30 minutes avec une solution de 1 % de H₂O₂ dilué dans le tampon TNT). Les embryons sont ensuite lavés puis bloqués pendant au minimum 1 heure avec une solution contenant 0,5 % d'agent bloquant (provenant du Kit *TSA-Plus DNP (HRP) System*,

50-150 slides de Perkin-Elmer, N° NEL747A) dilué dans du TNT. La sonde DNP est détectée à l'aide de l'anticorps anti-DNP couplé à la peroxydase (kit *TSA-Plus DNP (HRP) System*, 50-150 slides de Perkin-Elmer). Pour cela, les embryons sont incubés sur la nuit et à 4°C en présence de l'anticorps dilué au 1/200^{ème} dans le tampon TNT.

La deuxième révélation est réalisée selon le même protocole que la première, en utilisant le système TSA selon les instructions du manuel (*TSA Kit N°40, Alexa Fluor 555 Tyramide* de Molecular Probe, N° T30953).

VIII. Détection des cellules en apoptose sur des embryons entiers : méthode du TUNEL (Terminal transferase dUTP Nick End Labeling)

Ce protocole utilise le kit *In situ Cell Death Detection Kit, POD* (Roche Diagnostics, N°11684817910) ; et le tampon de dilution *TUNEL Dilution Buffer* (Roche Diagnostics, N°11966006001) vendu séparément.

Les embryons sont fixés et déshydratés selon le protocole décrit pour les simples hybridations *in situ*, puis conservés à -20°C. Après avoir été réhydratés par des bains croissants en TBST (0,1 M TrisHCl ; 1,5 M NaCl ; 0,1% Tween-20 ; pH 7.5) (75% Méthanol/25 % TBST 50 % Méthanol/50 % TBST ; 25% Méthanol/75 % TBST) les embryons sont traités au peroxyde d'hydrogène afin d'éliminer la peroxydase endogène (1% de H₂O₂ dans du TBST) pendant une durée allant de 15 à 30 minutes selon le stade embryonnaire (15 minutes pour des embryons de stade 75% d'épibolie au stade 14-16 somites ; 25 minutes pour des embryons de 24 hpf ; 30 minutes pour des embryons de 48 hpf et plus). Les embryons sont rapidement rincés dans du TBST (2 bains de 5 minutes) et perméabilisés par un traitement à la protéinase K (10 µg/mL dans du TBST). Le temps d'incubation dépend encore une fois du stade embryonnaire (30 secondes pour des embryons allant du stade gastrula au stade 14-16 somites, 10 minutes pour des embryons de 24 et 36 hpf, 30 minutes pour des embryons de 4 jours et plus). La protéinase K est inactivée par 2 bains successifs (de 5 minutes chacun) dans un tampon glycine (2 µg/µL de Glycine dans du PBT (0,8% NaCl ; 0.02% KCl ; 20 mM tampon phosphate; 0,1 % Tween-20 ; pH 7.3)) et les embryons sont rincés plusieurs fois dans du TTBST (0,1 M TrisHCl ; 1,5 M NaCl ; 0,5% Tween-20 ; 0,2 % Triton-X100 ; pH 7.5).

Les embryons prétraités sont re-fixés pendant 30 minutes dans une solution de para-formaldéhyde (PFA) (4% de PFA dans du PBS (0,8% NaCl ; 0.02% KCl ; 20 mM tampon phosphate ; pH 7.3)), puis rincés par 2 bains successifs (5 minutes chacun) dans le tampon de dilution *TUNEL Dilution Buffer*.

La réaction enzymatique est réalisée selon les instructions du manuel du kit *In situ Cell Death Detection Kit, POD* (Roche diagnostics, N° 11684817910), pendant 1 heure à l'abri de la lumière. A partir de là, il est impératif pour l'efficacité de la détection que les embryons soient manipulés à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique est stoppée par plusieurs lavages avec la solution tampon TBST (2 bains de 5 minutes) suivis d'une incubation sur la nuit avec ce même tampon.

Le lendemain, les embryons sont lavés plusieurs fois avec une solution de MABT (100 mM acide maléique ; 150 mM NaCl ; 0,1 % Tween-20 ; pH 7.5) et pré-incubés pendant, au minimum, 1 heure dans un tampon bloquant (2% d'agent bloquant (*blocking reagent* de Roche diagnostics, N°1096176) dissout dans du MABT). Les cellules apoptotiques marquées sont détectées à l'aide de l'anticorps anti-Fluorescein couplé à la peroxydase (fourni dans le kit). Pour cela, les embryons sont incubés, sur la nuit et à 4°C, avec l'anticorps dilué au 1/50^{ème} dans du MABT.

Après plusieurs lavages dans du MABT (4 bains de 15 minutes), l'activité peroxydase est révélée par incubation avec le substrat chromogène DAB (3,3'-Di-AminoBenzidine tetrahydrochloride, Dakocytomation, N° S3000). La coloration est stoppée par plusieurs lavages dans une solution de PBST. Pour l'analyse microscopique, les embryons montés en glycérol 100 % et conservés à 4°C, à l'abri de la lumière.

IX. Détection des cellules prolifératives sur des embryons entiers : immunohistochimie utilisant l'anticorps anti-phosphohistone H3

Les étapes de prétraitement des embryons pour la détection des cellules prolifératives sont identiques à celles réalisées pour la détection des cellules en apoptose excepté que la solution tampon utilisée n'est pas du TBST mais du PBT (0,8% NaCl ; 0.02% KCl ; 20 mM tampon phosphate; 0,1 % Tween-20 ; pH 7.3). Après avoir été re-fixés dans une solution de 4 % PFA, les embryons sont traités à l'acide chlorhydrique (2N HCl dans du PBT) pendant 30 minutes,

afin de dénaturer l'ADN et le rendre accessible à l'anticorps anti-phosphohistone H3 (Cell signaling technology, N° 9701S). Les embryons sont rincés rapidement avec le tampon PBT (2 bains de 5 minutes) puis pré-incubés pendant 4 heures avec une solution bloquante, contenant 0,25 % de BSA (Bovine Serum Albumine) diluée dans du PBT. Les embryons ainsi bloqués sont incubés, sur la nuit et à 4°C, avec l'anticorps anti-phosphohistone H3 dilué au 1/200^{ème} dans la solution bloquante.

Le lendemain, les embryons sont abondamment rincés avec la solution de PBT (6 lavages d'1 heure chacun). Le dernier lavage est réalisé avec une solution bloquante (2 % de ngs (*normal goat serum*) provenant du kit de détection *Vectastain Elite ABC* dilué dans du PBT) et les embryons sont incubés, sur la nuit et à 4°C, avec un anticorps anti-lapin biotynilé (Vector laboratories, N° PK6101) dilué au 1/500^{ème} dans la solution bloquante.

La révélation est réalisée à l'aide du kit *Vectastain Elite ABC (Rabbit IgG)* (Vector laboratories, N° PK6101) selon les instructions du manuel. Pour l'analyse microscopique, les embryons obtenus sont montés en glycérol 100 % et conservés à 4°C, à l'abri de la lumière.

Abréviations

ADN :	Acide Désoxyribo-Nucléique
AP :	Antéro-Postérieur
ARN :	Acide Ribo-Nucléique
BAMBI:	BMP and Activin receptor Membrane Bound Inhibitor
BMP :	Bone Morphogenetic Protein
Boz:	Bozozok
Bra:	Brachyury
Chd :	Chordin
CNH :	Charnière Chordo Neurale (ou Chordo Neural Hinge)
Cyc :	Cyclops
<i>dino</i> :	mutant <i>chordino</i> correspondant à <i>chordin</i>
DNP :	DiNitroPhenyl
Domaine GS :	domaine riche en Guanine et en Sérine
Domaine CR :	domaine Riche en Cystéines
Domaine TA :	domaine Trans-Activateur
Dpp :	Decapentaplegic
DV :	Dorso-Ventral
famille DSL :	famille Delta, Serrate et Lag2
famille CSL :	famille CBF1, Su (H) et Lag1
FGF :	Fibroblast Growth Factor
FISH :	Fluorescent In Situ Hybridization
Fkh :	Forkhead
Flh :	Floating head
Fox:	Forkhead box
FP :	Plaque du plancher (ou Floor Plate)
FRP :	Follistatin Related Protein
Fst :	Follistatin
Fstl :	Follistatin-like
GDF :	Growth and Differentiation Factor
GFP :	Green Fluorescent Protein

Grm :	Gremlin
Gsc :	Goosecoid
HC :	Hypochorde
HNF3 :	Hepatocyte Nuclear Factor 3
Her :	Hairy-enhancer of split
hpf :	heures post-fertilisation
<i>laf</i> :	mutant <i>lost a fin</i> correspondant <i>alk8</i>
MAD :	Mother Against Dpp
MBT :	Mid-Blastula Transition
MH1 et MH2 :	MAD Homology 1 et MAD Homology 2
MHB :	Midbrain-Hindbrain Boundary
MIS :	Mullerian Inhibiting Substance
M :	Maternel
MO :	Morpholino
LRR :	Leucine Rich Repeat
NC :	Notochorde
NICD :	Notch IntraCellular Domain
NLS :	Nuclear Localization Signal
Nog :	Noggin
Ntl :	Notail
Oep :	One eyed pinhead
PCP :	Planar Cell Polarity
PDGF:	Platelet Derived Growth Factor
PI3K :	Phospho Inositol 3 Kinase
PP :	Plaue Préchordale
R _I :	récepteur des TGF β de type I
R _{II} :	récepteur des TGF β de type II
<i>sbn</i> :	mutant <i>somitabun</i> correspondant à <i>smad5</i>
SFRP :	Secreted Frizzled Related Protein
Shh :	Sonic hedgehog
SLRP :	Small Leucin-Rich Proteoglycan
SMAD :	Homologues chez les vertébrés des protéines SMA du nématode et MAD de la drosophile
<i>snh</i> :	mutant <i>snailhouse</i> correspondant à <i>bmp7</i>

Sqt :	Squint
STAT3 :	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
<i>swl</i> :	mutant <i>swirl</i> correspondant à <i>bmp2b</i>
<i>syu</i> :	mutant <i>sonic you</i> correspondant à <i>shh</i>
TEM :	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF β :	Transforming Growth Factor β
TSK :	Tsukushi
TUNEL :	Terminal transferase dUTP Nick End Labeling
USAG-1 :	Uterine Sensitization Associated Gene1
UTR :	UnTranslated Region
YSL :	Yolk Syncytial Layer
Z :	Zygotique

Bibliographie

- Abdelkhalek, H. B., Beckers, A., Schuster-Gossler, K., Pavlova, M. N., Burkhardt, H., Lickert, H., Rossant, J., Reinhardt, R., Schalkwyk, L. C., Muller, I., *et al.* (2004). The mouse homeobox gene *Not* is required for caudal notochord development and affected by the truncate mutation. *Genes Dev* 18, 1725-1736.
- Agathon, A., Thisse, C., and Thisse, B. (2003). The molecular nature of the zebrafish tail organizer. *Nature* 424, 448-452.
- Albert, S., Muller, F., Fischer, N., Biellmann, D., Neumann, C., Blader, P., and Strahle, U. (2003). Cyclops-independent floor plate differentiation in zebrafish embryos. *Dev Dyn* 226, 59-66.
- Amores, A., Force, A., Yan, Y. L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R. K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y. L., *et al.* (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282, 1711-1714.
- Ang, S. L., and Rossant, J. (1994). HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78, 561-574.
- Ang, S. L., Wierda, A., Wong, D., Stevens, K. A., Cascio, S., Rossant, J., and Zaret, K. S. (1993). The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development* 119, 1301-1315.
- 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, 247-256.
- Bauer, H., Lele, Z., Rauch, G. J., Geisler, R., and Hammerschmidt, M. (2001). The type I serine/threonine kinase receptor *Alk8/Lost-a-fin* is required for *Bmp2b/7* signal transduction during dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* 128, 849-858.
- 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.
- Bennett, J. T., Joubin, K., Cheng, S., Aanstad, P., Herwig, R., Clark, M., Lehrach, H., and Schier, A. F. (2007). Nodal signaling activates differentiation genes during zebrafish gastrulation. *Dev Biol* 304, 525-540.
- Blader, P., Rastegar, S., Fischer, N., and Strahle, U. (1997). Cleavage of the BMP-4 antagonist *chordin* by zebrafish *tolloid*. *Science* 278, 1937-1940.

- Blum, M., Gaunt, S. J., Cho, K. W., Steinbeisser, H., Blumberg, B., Bittner, D., and De Robertis, E. M. (1992). Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene goosecoid. *Cell* *69*, 1097-1106.
- Bolce, M. E., Hemmati-Brivanlou, A., and Harland, R. M. (1993). XFKH2, a *Xenopus* HNF-3 alpha homologue, exhibits both activin-inducible and autonomous phases of expression in early embryos. *Dev Biol* *160*, 413-423.
- Catala, M., Teillet, M. A., De Robertis, E. M., and Le Douarin, M. L. (1996). A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* *122*, 2599-2610.
- 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.
- Chang, B. E., Blader, P., Fischer, N., Ingham, P. W., and Strahle, U. (1997). Axial (HNF3beta) and retinoic acid receptors are regulators of the zebrafish sonic hedgehog promoter. *Embo J* *16*, 3955-3964.
- Chanoine, C., Della Gaspera, B., and Charbonnier, F. (2004). Myogenic regulatory factors: redundant or specific functions? Lessons from *Xenopus*. *Dev Dyn* *231*, 662-670.
- Charrier, J. B., Lapointe, F., Le Douarin, N. M., and Teillet, M. A. (2001). Anti-apoptotic role of Sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development* *128*, 4011-4020.
- Charrier, J. B., Teillet, M. A., Lapointe, F., and Le Douarin, N. M. (1999). Defining subregions of Hensen's node essential for caudalward movement, midline development and cell survival. *Development* *126*, 4771-4783.
- Chen, W., Burgess, S., and Hopkins, N. (2001). Analysis of the zebrafish smoothed mutant reveals conserved and divergent functions of hedgehog activity. *Development* *128*, 2385-2396.
- Chesley, P. (1935). Development of the short-tailed mutant in the house mouse. *J. exp. Zool.* *70*, 429-435.
- Cho, K. W., Blumberg, B., Steinbeisser, H., and De Robertis, E. M. (1991). Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. *Cell* *67*, 1111-1120.
- Cirillo, L. A., Lin, F. R., Cuesta, I., Friedman, D., Jarnik, M., and Zaret, K. S. (2002). Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* *9*, 279-289.
- Cirillo, L. A., McPherson, C. E., Bossard, P., Stevens, K., Cherian, S., Shim, E. Y., Clark, K. L., Burley, S. K., and Zaret, K. S. (1998). Binding of the winged-helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. *Embo J* *17*, 244-254.

- Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E., and Burley, S. K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* *364*, 412-420.
- Cleaver, O., and Krieg, P. A. (1998). VEGF mediates angioblast migration during development of the dorsal aorta in *Xenopus*. *Development* *125*, 3905-3914.
- Cleaver, O., Seufert, D. W., and Krieg, P. A. (2000). Endoderm patterning by the notochord: development of the hypochord in *Xenopus*. *Development* *127*, 869-879.
- Conlon, F. L., Sedgwick, S. G., Weston, K. M., and Smith, J. C. (1996). Inhibition of Xbra transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of Xbra in dorsal mesoderm. *Development* *122*, 2427-2435.
- 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*, 3119-3130.
- Connors, S. A., Tucker, J. A., and Mullins, M. C. (2006). Temporal and spatial action of tolloid (mini fin) and chordin to pattern tail tissues. *Dev Biol* *293*, 191-202.
- Costa, R. H., Grayson, D. R., and Darnell, J. E., Jr. (1989). Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol* *9*, 1415-1425.
- Coutinho, P., Parsons, M. J., Thomas, K. A., Hirst, E. M., Saude, L., Campos, I., Williams, P. H., and Stemple, D. L. (2004). Differential requirements for COPI transport during vertebrate early development. *Dev Cell* *7*, 547-558.
- Cunliffe, V., and Smith, J. C. (1992). Ectopic mesoderm formation in *Xenopus* embryos caused by widespread expression of a Brachyury homologue. *Nature* *358*, 427-430.
- Dale, L., Howes, G., Price, B. M., and Smith, J. C. (1992). Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development* *115*, 573-585.
- Dal-Pra, S., Furthauer, M., Van-Celst, J., Thisse, B., and Thisse, C. (2006). Noggin1 and Follistatin-like2 function redundantly to Chordin to antagonize BMP activity. *Dev Biol* *298*, 514-526.
- De Robertis, E. M., and Kuroda, H. (2004). Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* *20*, 285-308.
- De Robertis, E. M., Larrain, J., Oelgeschlager, M., and Wessely, O. (2000). The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nat Rev Genet* *1*, 171-181.

- Dick, A., Hild, M., Bauer, H., Imai, Y., Maifeld, H., Schier, A. F., Talbot, W. S., Bouwmeester, T., and Hammerschmidt, M. (2000). Essential role of Bmp7 (snailhouse) and its prodomain in dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* *127*, 343-354.
- Dirksen, M. L., and Jamrich, M. (1992). A novel, activin-inducible, blastopore lip-specific gene of *Xenopus laevis* contains a fork head DNA-binding domain. *Genes Dev* *6*, 599-608.
- Dirksen, M. L., and Jamrich, M. (1995). Differential expression of fork head genes during early *Xenopus* and zebrafish development. *Dev Genet* *17*, 107-116.
- Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1997). Bmp-4 acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*. *Development* *124*, 2325-2334.
- 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*, 1837-1851.
- Duncan, S. A., Navas, M. A., Dufort, D., Rossant, J., and Stoffel, M. (1998). Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* *281*, 692-695.
- Ehebauer, M., Hayward, P., and Martinez-Arias, A. (2006). Notch signaling pathway. *Sci STKE* *2006*, cm7.
- Eimon, P. M., and Harland, R. M. (1999). In *Xenopus* embryos, BMP heterodimers are not required for mesoderm induction, but BMP activity is necessary for dorsal/ventral patterning. *Dev Biol* *216*, 29-40.
- Epstein, D. J., McMahon, A. P., and Joyner, A. L. (1999). Regionalization of Sonic hedgehog transcription along the anteroposterior axis of the mouse central nervous system is regulated by Hnf3-dependent and -independent mechanisms. *Development* *126*, 281-292.
- Eriksson, J., and Lofberg, J. (2000). Development of the hypochord and dorsal aorta in the zebrafish embryo (*Danio rerio*). *J Morphol* *244*, 167-176.
- Fainsod, A., Deissler, K., Yelin, R., Marom, K., Epstein, M., Pillemer, G., Steinbeisser, H., and Blum, M. (1997). The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech Dev* *63*, 39-50.
- 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*, 181-185.

- Feng, X. H., and Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 659-693.
- Ferreiro, B., Artinger, M., Cho, K., and Niehrs, C. (1998). Antimorphic goosecoids. *Development* 125, 1347-1359.
- Filosa, S., Rivera-Perez, J. A., Gomez, A. P., Gansmuller, A., Sasaki, H., Behringer, R. R., and Ang, S. L. (1997). Goosecoid and HNF-3beta genetically interact to regulate neural tube patterning during mouse embryogenesis. *Development* 124, 2843-2854.
- Friedman, J. R., and Kaestner, K. H. (2006). The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol Life Sci* 63, 2317-2328.
- 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, 170-174.
- 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, 2175-2186.
- 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, 181-196.
- Furthauer, M., Thisse, C., and Thisse, B. (1997). A role for FGF-8 in the dorsoventral patterning of the zebrafish gastrula. *Development* 124, 4253-4264.
- Furthauer, M., Van Celst, J., Thisse, C., and Thisse, B. (2004). Fgf signalling controls the dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* 131, 2853-2864.
- Gardiner, M. R., Daggett, D. F., Zon, L. I., and Perkins, A. C. (2005). Zebrafish KLF4 is essential for anterior mesendoderm/pre-polster differentiation and hatching. *Dev Dyn* 234, 992-996.
- Glickman, N. S., Kimmel, C. B., Jones, M. A., and Adams, R. J. (2003). Shaping the zebrafish notochord. *Development* 130, 873-887.
- Gong, Y., Mo, C., and Fraser, S. E. (2004). Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature* 430, 689-693.
- Gont, L. K., Fainsod, A., Kim, S. H., and De Robertis, E. M. (1996). Overexpression of the homeobox gene Xnot-2 leads to notochord formation in *Xenopus*. *Dev Biol* 174, 174-178.

Greer, J. M., Puetz, J., Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (2000). Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. *Nature* 403, 661-665.

Gritsman, K., Talbot, W. S., and Schier, A. F. (2000). Nodal signaling patterns the organizer. *Development* 127, 921-932.

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, 121-132.

Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W. W., Belmonte, J. C., and Choe, S. (2002). Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* 420, 636-642.

Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., van Eeden, F. J., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P., *et al.* (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., Hatta, K., Amacher, S. L., Talbot, W. S., Yan, Y. L., Thisse, B., Thisse, C., Postlethwait, J. H., and Kimmel, C. B. (1997). Genetic interactions in zebrafish midline development. *Dev Biol* 187, 154-170.

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, 4257-4264.

Hammerschmidt, M., Pelegri, F., Mullins, M. C., Kane, D. A., van Eeden, F. J., Granato, M., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Heisenberg, C. P., *et al.* (1996). *dino* and *mercedes*, two genes regulating dorsal development in the zebrafish embryo. *Development* 123, 95-102.

Heisenberg, C. P., Tada, M., Rauch, G. J., Saude, L., Concha, M. L., Geisler, R., Stemple, D. L., Smith, J. C., and Wilson, S. W. (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405, 76-81.

Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G., and Melton, D. A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 77, 283-295.

Hemmati-Brivanlou, A., and Thomsen, G. H. (1995). Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. *Dev Genet* 17, 78-89.

Herrmann, B. G., Labeit, S., Poustka, A., King, T. R., and Levrach, H. (1990). Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 343, 617-622.

- Hild, M., Dick, A., Rauch, G. J., Meier, A., Bouwmeester, T., Haffter, P., and Hammerschmidt, M. (1999). The *smad5* mutation *somitabun* blocks *Bmp2b* signaling during early dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* *126*, 2149-2159.
- Hoodless, P. A., Pye, M., Chazaud, C., Labbe, E., Attisano, L., Rossant, J., and Wrana, J. L. (2001). *FoxH1* (Fast) functions to specify the anterior primitive streak in the mouse. *Genes Dev* *15*, 1257-1271.
- Horan, G. S., Ramirez-Solis, R., Featherstone, M. S., Wolgemuth, D. J., Bradley, A., and Behringer, R. R. (1995). Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev* *9*, 1667-1677.
- Howell, M., and Hill, C. S. (1997). *XSmad2* directly activates the activin-inducible, dorsal mesoderm gene *XFKH1* in *Xenopus* embryos. *Embo J* *16*, 7411-7421.
- Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M., and Harland, R. M. (1998). The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* *1*, 673-683.
- Hurley, I., Hale, M. E., and Prince, V. E. (2005). Duplication events and the evolution of segmental identity. *Evol Dev* *7*, 556-567.
- 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*, 9337-9342.
- Inohaya, K., Yasumasu, S., Araki, K., Naruse, K., Yamazaki, K., Yasumasu, I., Iuchi, I., and Yamagami, K. (1997). Species-dependent migration of fish hatching gland cells that express astacin-like proteases in common [corrected]. *Dev Growth Differ* *39*, 191-197.
- Inohaya, K., Yasumasu, S., Ishimaru, M., Ohyama, A., Iuchi, I., and Yamagami, K. (1995). Temporal and spatial patterns of gene expression for the hatching enzyme in the teleost embryo, *Oryzias latipes*. *Dev Biol* *171*, 374-385.
- Izpisua-Belmonte, J. C., De Robertis, E. M., Storey, K. G., and Stern, C. D. (1993). The homeobox gene *goosecoid* and the origin of organizer cells in the early chick blastoderm. *Cell* *74*, 645-659.
- Jeong, Y., and Epstein, D. J. (2003). Distinct regulators of *Shh* transcription in the floor plate and notochord indicate separate origins for these tissues in the mouse node. *Development* *130*, 3891-3902.

- Jessen, J. R., Topczewski, J., Bingham, S., Sepich, D. S., Marlow, F., Chandrasekhar, A., and Solnica-Krezel, L. (2002). Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements. *Nat Cell Biol* 4, 610-615.
- 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, 639-647.
- Jones, C. M., and Smith, J. C. (1998). Establishment of a BMP-4 morphogen gradient by long-range inhibition. *Dev Biol* 194, 12-17.
- Kaestner, K. H., Hiemisch, H., and Schutz, G. (1998). Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol Cell Biol* 18, 4245-4251.
- Kaestner, K. H., Katz, J., Liu, Y., Drucker, D. J., and Schutz, G. (1999). Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3alpha affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo. *Genes Dev* 13, 495-504.
- Kaestner, K. H., Knochel, W., and Martinez, D. E. (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 14, 142-146.
- Kaufmann, E., Paul, H., Friedle, H., Metz, A., Scheucher, M., Clement, J. H., and Knochel, W. (1996). Antagonistic actions of activin A and BMP-2/4 control dorsal lip-specific activation of the early response gene XFD-1' in *Xenopus laevis* embryos. *Embo J* 15, 6739-6749.
- Kawahara, A., and Dawid, I. B. (2000). Expression of the Kruppel-like zinc finger gene *bik1f* during zebrafish development. *Mech Dev* 97, 173-176.
- Kilian, B., Mansukoski, H., Barbosa, F. C., Ulrich, F., Tada, M., and Heisenberg, C. P. (2003). The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech Dev* 120, 467-476.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., and Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253-310.
- Kimmel, C. B., Warga, R. M., and Schilling, T. F. (1990). Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development* 108, 581-594.
- Kishimoto, Y., Lee, K. H., Zon, L., Hammerschmidt, M., and Schulte-Merker, S. (1997). The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning. *Development* 124, 4457-4466.

- Kmita, M., and Duboule, D. (2003). Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science* *301*, 331-333.
- Knochel, S., Lef, J., Clement, J., Klocke, B., Hille, S., Koster, M., and Knochel, W. (1992). Activin A induced expression of a fork head related gene in posterior chordamesoderm (notochord) of *Xenopus laevis* embryos. *Mech Dev* *38*, 157-165.
- Koos, D. S., and Ho, R. K. (1999). The *nieuwkoid/dharma* homeobox gene is essential for *bmp2b* repression in the zebrafish pregastrula. *Dev Biol* *215*, 190-207.
- 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*, 1431-1444.
- Kusu, N., Laurikkala, J., Imanishi, M., Usui, H., Konishi, M., Miyake, A., Thesleff, I., and Itoh, N. (2003). Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity. *J Biol Chem* *278*, 24113-24117.
- Kwan, K. M., and Kirschner, M. W. (2003). *Xbra* functions as a switch between cell migration and convergent extension in the *Xenopus* gastrula. *Development* *130*, 1961-1972.
- Lai, E., Prezioso, V. R., Smith, E., Litvin, O., Costa, R. H., and Darnell, J. E., Jr. (1990). HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev* *4*, 1427-1436.
- Lai, E. C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* *131*, 965-973.
- Larrain, J., Oelgeschlager, M., Ketpura, N. I., Reversade, B., Zakin, L., and De Robertis, E. M. (2001). Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling. *Development* *128*, 4439-4447.
- Latimer, A. J., and Appel, B. (2006). Notch signaling regulates midline cell specification and proliferation in zebrafish. *Dev Biol* *298*, 392-402.
- Latimer, A. J., Dong, X., Markov, Y., and Appel, B. (2002). Delta-Notch signaling induces hypochord development in zebrafish. *Development* *129*, 2555-2563.
- Latimer, A. J., Shin, J., and Appel, B. (2005). *her9* promotes floor plate development in zebrafish. *Dev Dyn* *232*, 1098-1104.

- Le Douarin, N. M., and Halpern, M. E. (2000). Discussion point. Origin and specification of the neural tube floor plate: insights from the chick and zebrafish. *Curr Opin Neurobiol* *10*, 23-30.
- 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*, 909-916.
- Lef, J., Dege, P., Scheucher, M., Forsbach-Birk, V., Clement, J. H., and Knochel, W. (1996). A fork head related multigene family is transcribed in *Xenopus laevis* embryos. *Int J Dev Biol* *40*, 245-253.
- Leung, T., Bischof, J., Soll, I., Niessing, D., Zhang, D., Ma, J., Jackle, H., and Driever, W. (2003). *bozozok* directly represses *bmp2b* transcription and mediates the earliest dorsoventral asymmetry of *bmp2b* expression in zebrafish. *Development* *130*, 3639-3649.
- Lin, F., Sepich, D. S., Chen, S., Topczewski, J., Yin, C., Solnica-Krezel, L., and Hamm, H. (2005). Essential roles of G α _{12/13} signaling in distinct cell behaviors driving zebrafish convergence and extension gastrulation movements. *J Cell Biol* *169*, 777-787.
- Little, S. C., and Mullins, M. C. (2004). Twisted gastrulation promotes BMP signaling in zebrafish dorsal-ventral axial patterning. *Development* *131*, 5825-5835.
- Little, S. C., and Mullins, M. C. (2006). Extracellular modulation of BMP activity in patterning the dorsoventral axis. *Birth Defects Res C Embryo Today* *78*, 224-242.
- Lofberg, J., and Collazo, A. (1997). Hypochord, an enigmatic embryonic structure: study of the axolotl embryo. *J Morphol* *232*, 57-66.
- Martynova, N., Eroshkin, F., Ermakova, G., Bayramov, A., Gray, J., Grainger, R., and Zarsky, A. (2004). Patterning the forebrain: *FoxA4a/Pintallavis* and *Xvent2* determine the posterior limit of *Xanfl* expression in the neural plate. *Development* *131*, 2329-2338.
- Matsui, M., Mizuseki, K., Nakatani, J., Nakanishi, S., and Sasai, Y. (2000). *Xenopus kielin*: A dorsalizing factor containing multiple chordin-type repeats secreted from the embryonic midline. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 5291-5296.
- Melby, A. E., Warga, R. M., and Kimmel, C. B. (1996). Specification of cell fates at the dorsal margin of the zebrafish gastrula. *Development* *122*, 2225-2237.
- Miller-Bertoglio, V., Carmany-Rampey, A., Furthauer, M., Gonzalez, E. M., Thisse, C., Thisse, B., Halpern, M. E., and Solnica-Krezel, L. (1999). Maternal and zygotic activity of the zebrafish *ogon* locus antagonizes BMP signaling. *Dev Biol* *214*, 72-86.

- Miller-Bertoglio, V. E., Fisher, S., Sanchez, A., Mullins, M. C., and Halpern, M. E. (1997). Differential regulation of chordin expression domains in mutant zebrafish. *Dev Biol* *192*, 537-550.
- Mintzer, K. A., Lee, M. A., Runke, G., Trout, J., Whitman, M., and Mullins, M. C. (2001). Lost-a-fin encodes a type I BMP receptor, Alk8, acting maternally and zygotically in dorsoventral pattern formation. *Development* *128*, 859-869.
- Monaghan, A. P., Kaestner, K. H., Grau, E., and Schutz, G. (1993). Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development* *119*, 567-578.
- Montero, J. A., Kilian, B., Chan, J., Bayliss, P. E., and Heisenberg, C. P. (2003). Phosphoinositide 3-kinase is required for process outgrowth and cell polarization of gastrulating mesendodermal cells. *Curr Biol* *13*, 1279-1289.
- Morgan, T. H. (1917). The theory of the gene. *Am. Nat.* *51*, 513-544.
- Muller, F., Chang, B., Albert, S., Fischer, N., Tora, L., and Strahle, U. (1999). Intronic enhancers control expression of zebrafish sonic hedgehog in floor plate and notochord. *Development* *126*, 2103-2116.
- Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Heisenberg, C. P., *et al.* (1996). Genes establishing dorsoventral pattern formation in the zebrafish embryo: the ventral specifying genes. *Development* *123*, 81-93.
- Muraoka, O., Shimizu, T., Yabe, T., Nojima, H., Bae, Y. K., Hashimoto, H., and Hibi, M. (2006). Sizzled controls dorso-ventral polarity by repressing cleavage of the Chordin protein. *Nat Cell Biol* *8*, 329-338.
- Myers, D. C., Sepich, D. S., and Solnica-Krezel, L. (2002). Convergence and extension in vertebrate gastrulae: cell movements according to or in search of identity? *Trends Genet* *18*, 447-455.
- Nasevicius, A., and Ekker, S. C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* *26*, 216-220.
- Neave, B., Holder, N., and Patient, R. (1997). A graded response to BMP-4 spatially coordinates patterning of the mesoderm and ectoderm in the zebrafish. *Mech Dev* *62*, 183-195.
- Nguyen, V. H., Schmid, B., Trout, J., Connors, S. A., Ekker, M., and Mullins, M. C. (1998). Ventral and lateral regions of the zebrafish gastrula, including the neural crest progenitors, are established by a *bmp2b/swirl* pathway of genes. *Dev Biol* *199*, 93-110.

- Nicoli, S., Gilardelli, C. N., Pozzoli, O., Presta, M., and Cotelli, F. (2005). Regulated expression pattern of gremlin during zebrafish development. *Gene Expr Patterns* 5, 539-544.
- Niehrs, C. (2004). Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer. *Nat Rev Genet* 5, 425-434.
- Nikaido, M., Tada, M., Saji, T., and Ueno, N. (1997). Conservation of BMP signaling in zebrafish mesoderm patterning. *Mech Dev* 61, 75-88.
- Nishizaki, Y., Shimazu, K., Kondoh, H., and Sasaki, H. (2001). Identification of essential sequence motifs in the node/notochord enhancer of *Foxa2* (*Hnf3beta*) gene that are conserved across vertebrate species. *Mech Dev* 102, 57-66.
- Norton, W. H., Mangoli, M., Lele, Z., Pogoda, H. M., Diamond, B., Mercurio, S., Russell, C., Teraoka, H., Stickney, H. L., Rauch, G. J., *et al.* (2005). *Monorail/Foxa2* regulates floorplate differentiation and specification of oligodendrocytes, serotonergic raphe neurones and cranial motoneurones. *Development* 132, 645-658.
- Odenthal, J., Haffter, P., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., *et al.* (1996). Mutations affecting the formation of the notochord in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 103-115.
- Odenthal, J., and Nusslein-Volhard, C. (1998). fork head domain genes in zebrafish. *Dev Genes Evol* 208, 245-258.
- Odenthal, J., van Eeden, F. J., Haffter, P., Ingham, P. W., and Nusslein-Volhard, C. (2000). Two distinct cell populations in the floor plate of the zebrafish are induced by different pathways. *Dev Biol* 219, 350-363.
- Ohta, K., Kuriyama, S., Okafuji, T., Gejima, R., Ohnuma, S., and Tanaka, H. (2006). *Tsukushi* cooperates with *VG1* to induce primitive streak and Hensen's node formation in the chick embryo. *Development* 133, 3777-3786.
- Ohta, K., Lupo, G., Kuriyama, S., Keynes, R., Holt, C. E., Harris, W. A., Tanaka, H., and Ohnuma, S. (2004). *Tsukushi* functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with *chordin*. *Dev Cell* 7, 347-358.
- Okabayashi, K., Shoji, H., Onuma, Y., Nakamura, T., Nose, K., Sugino, H., and Asashima, M. (1999). cDNA cloning and distribution of the *Xenopus* follistatin-related protein. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 42-48.
- O'Reilly, M. A., Smith, J. C., and Cunliffe, V. (1995). Patterning of the mesoderm in *Xenopus*: dose-dependent and synergistic effects of *Brachyury* and *Pintallavis*. *Development* 121, 1351-1359.

- Pani, L., Overdier, D. G., Porcella, A., Qian, X., Lai, E., and Costa, R. H. (1992). Hepatocyte nuclear factor 3 beta contains two transcriptional activation domains, one of which is novel and conserved with the *Drosophila* fork head protein. *Mol Cell Biol* *12*, 3723-3732.
- Parsons, M. J., Pollard, S. M., Saude, L., Feldman, B., Coutinho, P., Hirst, E. M., and Stemple, D. L. (2002). Zebrafish mutants identify an essential role for laminins in notochord formation. *Development* *129*, 3137-3146.
- Pearce, J. J., Penny, G., and Rossant, J. (1999). A mouse cerberus/Dan-related gene family. *Dev Biol* *209*, 98-110.
- Phillips, D. J., and de Kretser, D. M. (1998). Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol* *19*, 287-322.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E. M. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* *86*, 589-598.
- Placzek, M., and Briscoe, J. (2005). The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat Rev Neurosci* *6*, 230-240.
- Placzek, M., Dodd, J., and Jessell, T. M. (2000). Discussion point. The case for floor plate induction by the notochord. *Curr Opin Neurobiol* *10*, 15-22.
- Placzek, M., Jessell, T. M., and Dodd, J. (1993). Induction of floor plate differentiation by contact-dependent, homeogenetic signals. *Development* *117*, 205-218.
- Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T., Jessell, T., and Dodd, J. (1990). Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord. *Science* *250*, 985-988.
- Pollard, S. M., Parsons, M. J., Kamei, M., Kettleborough, R. N., Thomas, K. A., Pham, V. N., Bae, M. K., Scott, A., Weinstein, B. M., and Stemple, D. L. (2006). Essential and overlapping roles for laminin alpha chains in notochord and blood vessel formation. *Dev Biol* *289*, 64-76.
- Qian, X., and Costa, R. H. (1995). Analysis of hepatocyte nuclear factor-3 beta protein domains required for transcriptional activation and nuclear targeting. *Nucleic Acids Res* *23*, 1184-1191.
- 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*, 261-272.
- 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*, 9932-9937.

Reversade, B., Kuroda, H., Lee, H., Mays, A., and De Robertis, E. M. (2005). Depletion of Bmp2, Bmp4, Bmp7 and Spemann organizer signals induces massive brain formation in *Xenopus* embryos. *Development* 132, 3381-3392.

Rissi, M., Wittbrodt, J., Delot, E., Naegeli, M., and Rosa, F. M. (1995). Zebrafish Radar: a new member of the TGF-beta superfamily defines dorsal regions of the neural plate and the embryonic retina. *Mech Dev* 49, 223-234.

Rivera-Perez, J. A., Mallo, M., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., and Behringer, R. R. (1995). Goosecoid is not an essential component of the mouse gastrula organizer but is required for craniofacial and rib development. *Development* 121, 3005-3012.

Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T. M., and et al. (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 761-775.

Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H., and Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351-1359.

Ruiz i Altaba, A., Cox, C., Jessell, T. M., and Klar, A. (1993). Ectopic neural expression of a floor plate marker in frog embryos injected with the midline transcription factor Pintallavis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8268-8272.

Ruiz i Altaba, A., and Jessell, T. M. (1992). Pintallavis, a gene expressed in the organizer and midline cells of frog embryos: involvement in the development of the neural axis. *Development* 116, 81-93.

Ruiz i Altaba, A., Placzek, M., Baldassare, M., Dodd, J., and Jessell, T. M. (1995). Early stages of notochord and floor plate development in the chick embryo defined by normal and induced expression of HNF-3 beta. *Dev Biol* 170, 299-313.

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, 185-189.

Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., and De Robertis, E. M. (1995). Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 376, 333-336.

Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K., and De Robertis, E. M. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79, 779-790.

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*, 3407-3417.

Sawada, A., Nishizaki, Y., Sato, H., Yada, Y., Nakayama, R., Yamamoto, S., Nishioka, N., Kondoh, H., and Sasaki, H. (2005). Tead proteins activate the *Foxa2* enhancer in the node in cooperation with a second factor. *Development* *132*, 4719-4729.

Schafer, M., Kinzel, D., and Winkler, C. (2007). Discontinuous organization and specification of the lateral floor plate in zebrafish. *Dev Biol* *301*, 117-129.

Schauerte, H. E., van Eeden, F. J., Fricke, C., Odenthal, J., Strahle, U., and Haffter, P. (1998). Sonic hedgehog is not required for the induction of medial floor plate cells in the zebrafish. *Development* *125*, 2983-2993.

Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Helde, K. A., Talbot, W. S., and Driever, W. (1997). The one-eyed pinhead gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with *no tail*. *Development* *124*, 327-342.

Schmid, B., Furthauer, M., Connors, S. A., Trout, J., Thisse, B., Thisse, C., and Mullins, M. C. (2000). Equivalent genetic roles for *bmp7/snailhouse* and *bmp2b/swirl* in dorsoventral pattern formation. *Development* *127*, 957-967.

Schmidt, J. E., Suzuki, A., Ueno, N., and Kimelman, D. (1995). Localized BMP-4 mediates dorsal/ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Dev Biol* *169*, 37-50.

Schulte-Merker, S., Hammerschmidt, M., Beuchle, D., Cho, K. W., De Robertis, E. M., and Nusslein-Volhard, C. (1994a). Expression of zebrafish *gooseoid* and *no tail* gene products in wild-type and mutant *no tail* embryos. *Development* *120*, 843-852.

Schulte-Merker, S., Ho, R. K., Herrmann, B. G., and Nusslein-Volhard, C. (1992). The protein product of the zebrafish homologue of the mouse *T* gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development* *116*, 1021-1032.

Schulte-Merker, S., Lee, K. J., McMahon, A. P., and Hammerschmidt, M. (1997). The zebrafish organizer requires *chordino*. *Nature* *387*, 862-863.

Schulte-Merker, S., van Eeden, F. J., Halpern, M. E., Kimmel, C. B., and Nusslein-Volhard, C. (1994b). *no tail* (*ntl*) is the zebrafish homologue of the mouse *T* (*Brachyury*) gene. *Development* *120*, 1009-1015.

- Scott, A., and Stemple, D. L. (2005). Zebrafish notochordal basement membrane: signaling and structure. *Curr Top Dev Biol* 65, 229-253.
- Seiliez, I., Thisse, B., and Thisse, C. (2006). FoxA3 and gooseoid promote anterior neural fate through inhibition of Wnt8a activity before the onset of gastrulation. *Dev Biol* 290, 152-163.
- Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- Shih, D. Q., Navas, M. A., Kuwajima, S., Duncan, S. A., and Stoffel, M. (1999). Impaired glucose homeostasis and neonatal mortality in hepatocyte nuclear factor 3alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10152-10157.
- Shih, J., and Fraser, S. E. (1995). Distribution of tissue progenitors within the shield region of the zebrafish gastrula. *Development* 121, 2755-2765.
- Shih, J., and Fraser, S. E. (1996). Characterizing the zebrafish organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage. *Development* 122, 1313-1322.
- Slack, J. M., Holland, P. W., and Graham, C. F. (1993). The zootype and the phylotypic stage. *Nature* 361, 490-492.
- Smith, J. C., Price, B. M., Green, J. B., Weigel, D., and Herrmann, B. G. (1991). Expression of a Xenopus homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 67, 79-87.
- Smith, W. C., and Harland, R. M. (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos. *Cell* 70, 829-840.
- Spemann, H., and Mangold, H. (1924). Über induktion von embryonalanlagen durch implantation artfremder organisatoren. *Archiv. für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik* 100, 599-638.
- Stachel, S. E., Grunwald, D. J., and Myers, P. Z. (1993). Lithium perturbation and gooseoid expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish. *Development* 117, 1261-1274.
- Stein, S., and Kessel, M. (1995). A homeobox gene involved in node, notochord and neural plate formation of chick embryos. *Mech Dev* 49, 37-48.
- Stein, S., Niss, K., and Kessel, M. (1996). Differential activation of the clustered homeobox genes CNOT2 and CNOT1 during notogenesis in the chick. *Dev Biol* 180, 519-533.

Steinbeisser, H., Fainsod, A., Niehrs, C., Sasai, Y., and De Robertis, E. M. (1995). The role of *gsc* and BMP-4 in dorsal-ventral patterning of the marginal zone in *Xenopus*: a loss-of-function study using antisense RNA. *Embo J* 14, 5230-5243.

Stemple, D. L. (2005). Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development* 132, 2503-2512.

Stemple, D. L., Solnica-Krezel, L., Zwartkruis, F., Neuhauss, S. C., Schier, A. F., Malicki, J., Stainier, D. Y., Abdelilah, S., Rangini, Z., Mountcastle-Shah, E., and Driever, W. (1996). Mutations affecting development of the notochord in zebrafish. *Development* 123, 117-128.

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, 1436-1446.

Strahle, U., Lam, C. S., Ertzer, R., and Rastegar, S. (2004). Vertebrate floor-plate specification: variations on common themes. *Trends Genet* 20, 155-162.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., and Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291, 293-296.

Sumariwalla, V. M., and Klein, W. H. (2001). Similar myogenic functions for myogenin and MRF4 but not MyoD in differentiated murine embryonic stem cells. *Genesis* 30, 239-249.

Suri, C., Haremake, T., and Weinstein, D. C. (2004). Inhibition of mesodermal fate by *Xenopus* HNF3beta/FoxA2. *Dev Biol* 265, 90-104.

Tada, M., Concha, M. L., and Heisenberg, C. P. (2002). Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin Cell Dev Biol* 13, 251-260.

Talbot, W. S., Trevarrow, B., Halpern, M. E., Melby, A. E., Farr, G., Postlethwait, J. H., Jowett, T., Kimmel, C. B., and Kimelman, D. (1995). A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature* 378, 150-157.

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, 11733-11738.

Thisse, B., Heyer, V., Lux, A., Alunni, V., Degraeve, 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. *Methods Cell Biol* 77, 505-519.

Thisse, B., and Thisse, C. (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* 287, 390-402.

Thisse, B., Wright, C. V., and Thisse, C. (2000). Activin- and Nodal-related factors control antero-posterior patterning of the zebrafish embryo. *Nature* 403, 425-428.

Thisse, C., and Thisse, B. (1999). Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development* 126, 229-240.

Thisse, C., Thisse, B., Halpern, M. E., and Postlethwait, J. H. (1994). Goosecoid expression in neurectoderm and mesendoderm is disrupted in zebrafish cyclops gastrulas. *Dev Biol* 164, 420-429.

Topczewski, J., Sepich, D. S., Myers, D. C., Walker, C., Amores, A., Lele, Z., Hammerschmidt, M., Postlethwait, J., and Solnica-Krezel, L. (2001). The zebrafish glypican knypek controls cell polarity during gastrulation movements of convergent extension. *Dev Cell* 1, 251-264.

Tvrđik, P., and Capecchi, M. R. (2006). Reversal of Hox1 gene subfunctionalization in the mouse. *Dev Cell* 11, 239-250.

Ulrich, F., Concha, M. L., Heid, P. J., Voss, E., Witzel, S., Roehl, H., Tada, M., Wilson, S. W., Adams, R. J., Soll, D. R., and Heisenberg, C. P. (2003). Slb/Wnt11 controls hypoblast cell migration and morphogenesis at the onset of zebrafish gastrulation. *Development* 130, 5375-5384.

von Dassow, G., Schmidt, J. E., and Kimelman, D. (1993). Induction of the *Xenopus* organizer: expression and regulation of Xnot, a novel FGF and activin-regulated homeo box gene. *Genes Dev* 7, 355-366.

Wallingford, J. B., Fraser, S. E., and Harland, R. M. (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell* 2, 695-706.

Wang, S., Krinks, M., Kleinwaks, L., and Moos, M., Jr. (1997). A novel *Xenopus* homologue of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7). *Genes Funct* 1, 259-271.

Weigel, D., and Jackle, H. (1990). The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell* 63, 455-456.

Weigel, D., Jurgens, G., Kuttner, F., Seifert, E., and Jackle, H. (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* 57, 645-658.

- Weinstein, D. C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W. S., Hoodless, P., Prezioso, V. R., Jessell, T. M., and Darnell, J. E., Jr. (1994). The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 78, 575-588.
- Wienholds, E., van Eeden, F., Kusters, M., Mudde, J., Plasterk, R. H., and Cuppen, E. (2003). Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res* 13, 2700-2707.
- Wilkinson, D. G., Bhatt, S., and Herrmann, B. G. (1990). Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343, 657-659.
- Wilson, P. A., and Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* 376, 331-333.
- Yabe, T., Shimizu, T., Muraoka, O., Bae, Y. K., Hirata, T., Nojima, H., Kawakami, A., Hirano, T., and Hibi, M. (2003). Ogon/Secreted Frizzled functions as a negative feedback regulator of Bmp signaling. *Development* 130, 2705-2716.
- Yamada, G., Mansouri, A., Torres, M., Stuart, E. T., Blum, M., Schultz, M., De Robertis, E. M., and Gruss, P. (1995). Targeted mutation of the murine goosecoid gene results in craniofacial defects and neonatal death. *Development* 121, 2917-2922.
- Yamanaka, Y., Mizuno, T., Sasai, Y., Kishi, M., Takeda, H., Kim, C. H., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). A novel homeobox gene, dharma, can induce the organizer in a non-cell-autonomous manner. *Genes Dev* 12, 2345-2353.
- Yamashita, S., Miyagi, C., Carmany-Rampey, A., Shimizu, T., Fujii, R., Schier, A. F., and Hirano, T. (2002). Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. *Dev Cell* 2, 363-375.
- Yamashita, S., Miyagi, C., Fukada, T., Kagara, N., Che, Y. S., and Hirano, T. (2004). Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature* 429, 298-302.
- Yanagita, M. (2005). BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 309-317.
- Yanagita, M., Oka, M., Watabe, T., Iguchi, H., Niida, A., Takahashi, S., Akiyama, T., Miyazono, K., Yanagisawa, M., and Sakurai, T. (2004). USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 490-500.
- Yao, J., and Kessler, D. S. (2001). Goosecoid promotes head organizer activity by direct repression of Xwnt8 in Spemann's organizer. *Development* 128, 2975-2987.

Yasuo, H., and Lemaire, P. (2001). Role of Goosecoid, Xnot and Wnt antagonists in the maintenance of the notochord genetic programme in *Xenopus* gastrulae. *Development* 128, 3783-3793.

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, 241-251.

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

Résumé

Etude des mécanismes contrôlant la formation de l'axe dorso-ventral et analyse de l'établissement et du maintien des structures axiales au cours de l'embryogenèse précoce du poisson zèbre (*Danio rerio*).

Chez les vertébrés, la spécification de l'identité des tissus et leur arrangement coordonné dans l'espace sont en partie contrôlés par l'activité du centre organisateur de Spemann. Cette région embryonnaire qui est à l'origine des structures axiales (notochorde, plaque du plancher et hypochorde), participe à l'établissement de l'axe dorso-ventral (DV) au cours de l'embryogenèse précoce. Pendant ma thèse, j'ai tiré profit de l'utilisation du poisson zèbre afin d'étudier ces deux aspects de l'écusson embryonnaire, la structure analogue à l'organisateur de Spemann.

La régionalisation DV des embryons de vertébrés résulte de l'interaction des Bone Morphogenic Protein (BMP) sécrétés ventralement avec leurs antagonistes sécrétés par le centre organisateur de Spemann. Dans la première partie de ma thèse, j'ai étudié le rôle des antagonistes Noggin1 (Nog1) et Follistatin like-2 (Fstl2) dans ce processus. Alors que leur simple inactivation n'affecte pas le développement de l'axe DV, leur perte de fonction amplifie le phénotype de ventralisation lié à l'absence d'un autre antagoniste des BMP, le facteur Chordin (Chd). Ces résultats indiquent que Chd, Nog1 et Fstl2 fonctionnent de façon redondante pendant les stades Blastula/Gastrula afin d'établir un gradient DV d'activité BMP. Cependant, l'absence simultanée de ces trois facteurs n'abolit pas entièrement le développement de l'axe DV suggérant que d'autres molécules participent à la restriction ventrale des BMP. C'est dans cet objectif que je présente des résultats préliminaires concernant deux candidats potentiels : les antagonistes Gremlin et Tsukushi.

Dans la deuxième partie de ma thèse, j'ai étudié le rôle des facteurs de transcriptions de la famille FoxA au cours du développement des structures de l'axe. Ces facteurs, dont les séquences protéiques et les territoires d'expression sont conservés chez les vertébrés, sont présents dans l'écusson embryonnaire et les structures axiales qui en dérivent. J'ai montré par une approche de perte de fonction que les membres de cette famille sont requis pendant la gastrulation afin de maintenir l'identité des précurseurs des structures axiales. De plus, j'ai montré que leur activité est partiellement redondante à celle du facteur de transcription Floating head, homologue de XNot chez le xénope.

En conclusion, l'écusson embryonnaire participe à la formation de l'axe dorso-ventral et au développement des structures axiales, via l'utilisation de nombreuses molécules qui possèdent des activités redondantes.

Mots clés :

poisson zèbre, polarité dorso-ventrale, BMP, Chordin, Noggin, Follistatin like, Gremlin, Tsukushi, mésoderme axial, notochorde, plaque du plancher, hypochorde, FoxA, Floating head.