



**HAL**  
open science

# Ségrégation cellulaire lors de la neurogenèse précoce : les cadhérines font Sécession

Alwyn Dady

► **To cite this version:**

Alwyn Dady. Ségrégation cellulaire lors de la neurogenèse précoce : les cadhérines font Sécession. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66377 . tel-00828190

**HAL Id: tel-00828190**

**<https://theses.hal.science/tel-00828190>**

Submitted on 30 May 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Ecole doctorale Complexité du Vivant (ED 515)

Présentée par

**Mr Alwyn DADY**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Biologie Cellulaire et Développement

**Ségrégation cellulaire lors de la neurogenèse précoce :  
les cadhérines font Sécession**

soutenue le 18 Septembre 2012

devant le jury composé de :

M. René-Marc MEGE	Directeur de Recherche au CNRS, Paris	<u>Président du Jury</u>
M. Lionel LARUE	Directeur de Recherche à l'INSERM, Orsay	<u>Rapporteur</u>
M. Pierre SAVAGNER	Chargé de Recherche au CNRS, Montpellier	<u>Rapporteur</u>
M. Martin CATALA	Professeur des Universités à l'UPMC, Paris	<u>Examineur</u>
Mme. Sylvie DUFOUR	Directeur de Recherche au CNRS, Paris	<u>Examineur</u>
M. Jean-Loup DUBAND	Directeur de Recherche au CNRS, Paris	<u>Directeur de thèse</u>

## *Remerciements*

Mes premiers remerciements vont tout naturellement à mon Directeur de Thèse, Maître et Ami, **Jean-Loup Duband**. Il y a parfois des rencontres dans la Vie qui vous marquent et vous changent, celle-ci en fait partie. Merci de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire, de m'avoir soutenu pendant les moments de doute que la vie nous réserve (Dieu sait qu'il y en a eu durant ces cinq années !), de m'avoir fait confiance me permettant ainsi de m'épanouir humainement et scientifiquement. Ces cinq années à vos côtés remplies de rires et de nombreuses discussions ayant rapport à la science ou non furent vraiment extraordinaires ! Vous m'avez vraiment tout appris ! J'espère - même si je connais pertinemment la réponse – retrouver un jour ces conditions de travail si propices à l'épanouissement personnel et professionnel. Je vous souhaite également de vous amuser dans votre nouvelle équipe mais je ne m'inquiète pas trop. Même si la gentillesse semble être un défaut dans notre société actuelle, ne changez pas. Vous savez les Gentils finissent toujours par gagner à la fin du film ! Et je crois sincèrement que c'est une véritable Force ! Cette Thèse en est la meilleure preuve ! Merci pour TOUT !

Je tiens à remercier bien évidemment les membres de mon Jury de Thèse : Merci à **René-Marc Mège** d'avoir accepté la présidence du jury, à **Sylvie Dufour** et **Martin Catala** d'avoir accepté d'y faire parti.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mes rapporteurs **Lionel Larue** et **Pierre Savagner** qui ont accepté de juger mon travail.

Je remercie sincèrement mon « odieux » Professeur d'Embryologie de la Faculté de Médecine, **Martin Catala**. Vos nombreuses discussions au cours de ces cinq années, votre expertise, vos traits d'esprit, votre humour si fin mais surtout votre bienveillance envers moi ont largement contribué à l'aboutissement et à la réussite de cette Thèse. Merci infiniment!

Je remercie également **Thierry Jaffredo** qui ne se rend peut-être pas compte à quel point il a contribué à l'aboutissement de cette Thèse. Je ne parle pas uniquement scientifiquement (Merci infiniment pour la lipofection !!). Merci beaucoup d'avoir accepté que je fasse quasiment partie de ton équipe !! J'étais si souvent dans ton Labo que tu voulais y mettre un strapontin... Ton soutien et ton amitié ont véritablement été une force tout au long de cette Thèse. Merci !

Je tiens à remercier bien évidemment les membres de l'équipe de Jean-Loup, **Claire Fournier-Thiebault** pour ses conseils en début de Thèse, **Sophie Escot** qui fut une voisine de bureau et une camarade de galère exemplaire (encore mille excuses pour le bruit !!!), **Johanna Simkin** à la positive attitude exemplaire et surtout **Cédrine Blavet** pour ta patience (et il en a fallu pour m'apprendre les techniques du Labo !!!), ta gentillesse et surtout ta disponibilité. Ma Thèse n'aurait pas la même allure sans ton aide !! Mille Merci convertibles en chouquettes bien-sûr!!

Quand on passe cinq merveilleuses années au sein d'un établissement, vos collègues deviennent de véritables amis. Je remercie du fond du cœur mes compagnons de cantine (et bien plus en fait) **Rodolphe Gautier** à l'humour ravageur (et ravagé !!!) ; le nouveau papa, **Pierre-Yves Canto** (qui a dans son carnet d'adresses un député, La Classe Internationale !!!) ; notre artiste, **Sophie Gournet** (merci pour Photoshop !!! Je pense que tu vas apprécier mes planches !!).

Des remerciements tout particuliers à **Viviane Peltier** ! Merci pour ton soutien indéfectible au cours de ces années !!! Tu as été une véritable oreille attentive et bienveillante au cours de mes longues et nombreuses séances de coupes au cryostat. Ton rire tonitruant va me manquer.

Je remercie l'ensemble des habitants de ce village gaulois que représente le 6<sup>ème</sup> étage du Laboratoire de Biologie du Développement : **Delphine Duprez** à l'énergie débordante, **Marie-Ange Bonnin** qui mérite vraiment d'être connue, **Isabel Olivera Martinez** à la timidité légendaire, **Laurence Petit** et **Michèle Souyri** jaffredettes forever (Barracuuuudaaaaa !!!), **Cécile Drevon** à la gentillesse désarmante, **Charles Durand** champion du monde du mangeur du plus gros steack tartare (Et oui !!! Qui l'eût cru !?) et le Professeur **Saddredine Fellah** (qui fait pleurer les filles toujours vers la fin de l'année universitaire !! ;-P).

Un grand merci égelement aux membres du PSG – Pôle Secrétariat Gestion (et non raté !! Ce n'est pas l'équipe de football...) : **Isabelle Angelchic** au dynamisme exubérant, **Hafida Amiri** au sourire réconfortant, **Danièle Rocca** à la gentillesse explosive et **Maïté Lusquinhos** aux départs éphémères (mais surtout à l'humour désopilant !!!). Bref, je remercie l'ensemble des membres du Laboratoire de Biologie du Développement.

J'adresse des remerciements vraiment particuliers à mon ancienne collègue mais surtout Amie **Christine Vincent**. Merci pour tout soutien Christine, ma Thèse n'aurait jamais été la même sans celui-ci. Ton amitié m'a vraiment aidé lors des moments de doute. Merci du fond du cœur !!!

J'adresse un remerciement très chaleureux à ma Tutrice lors de mes comités de Thèse, **Sophie**. Merci pour tes encouragements et ta bienveillance. Ton enthousiasme a été un véritable moteur.

J'ai pu, au cours de cette Thèse, croiser le chemin de personnes vraiment remarquables et **Marie-Aimée Teillet** fait indéniablement partie de cette catégorie de gens. Merci pour votre enseignement et vos conseils. Votre humilité déconcertante après une telle carrière doit être un exemple pour tous.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du club des Doc' passés et présent pour tous ces supers moments scientifiques (ou pas) autour d'une puis deux puis trois... bières !!! Toutes ces discussions et trips participent vraiment au dynamisme et à la cohésion des troupes !! Merci à **Augustin** pour ces délires sur la variéation... **Jérémie** et son cycle qui déraile... **Khaled** et tous les autres !!! A vous de jouer maintenant **Mélinée** et **Anne** !! Je pense qu'on se souvient tous du baptême du feu lors de nos répétitions pour le Master !! **Nicolas aka** « Tourments d'Amour » encore bravo pour ta combativité : Ta Thèse va être éblouissante !! Avec qui je vais parler des mangas maintenant !! **Audrey**, une Nana qui allie Grâce et gentillesse, bon courage !! La pire s'en est allée... Hakuna Matata !! **Marianne aka** Bébé-canard, j'espère que Tu trouveras ta voie !! Bon courage pour la Cucaracha !!

Un énorme MERCI à tous les étudiants du 6<sup>ème</sup> !!! Et oui, c'est essentiellement avec eux que j'ai passé le plus de temps : **Noémie**, bravo pour ta persévérance ;-P, **Marion**, Bravo, Tu as fini par trouver ta voie !! **Charlotte**, j'ai hate que tu lises ma Thèse pour savoir si ça correspond à tes prévisions !! Merci !! **Aveline**, Tu es brillante, je suis certain que Tu vas pondre une super Thèse !! **Joana**, ton sourire est ta meilleure arme ! **Adeline aka** La Teutonnette, amuse-toi bien avec les Curry Wurst !! **Benjamin aka** L'Homme au Foie de Fer : merci pour toutes ces discussions, conseils et ton soutien. Promis la prochaine je viens me dépouiller avec Toi au Merle Bleu (je crois...) !!

Alors là, je ne sais même pas si le terme « remerciement » pourrait suffir !!! La fine épuipe, Toujours accoudé au bar du coin (au sens propre comme au figuré !!) : Merci **Justine** pour tes séances motivations... pour aller au bar !! Merci **Phillipe**, tous ces moments et trips me manquent vraiment !! **Céline**, ton enthousiasme et ton dynamisme manque tout de même... Et si on frappe à ta porte, surtout n'ouvre pas... C'est ta conscience !!! ;)

Un MERCI infini à **Laurent**, des amis comme toi, il en existe peu !! Merci vraiment pour ton soutien lors des pires moments de cette Thèse... Je ne sais sincèrement pas comment j'aurais pu m'en sortir sans Toi !! Malgré ta fin de post-doc, je reste persuadé qu'un type aussi brillant et avec autant de compétences (Tu fais naître des poussins-chimères quand même !!!) que Toi va rebondir et exploser aux yeux du monde !! Bravo encore l'Ami !!

Je tiens à te remercier **Julie aka La Soviet** !! Merci pour tes conseils et ton extrême gentillesse !! Tu as été un véritable soutien et une véritable amie !! Merci pour tout !! Je te souhaite vraiment le Meilleur pour la suite de tes aventures !!

Je tiens à remercier LE canal historique !! Mes compagnons de bataille... connus sur les bancs de la Fac... voilà maintenant 6 ans !!! On a tout connu !! Honneur aux Dames : Merci **Julie**, j'espère que l'Australie t'apportera tout l'espoir que tu n'avais plus ici !!! Merci à Ma Très Chère **Vanessa**, Tu te rends bien compte que nous avons perdu un pari imperdable !! Merci pour ton soutien indéfectible, Ton amitié à vraiment été une bouée de sauvetage ces dernières années... merci du fond du cœur !! Merci à mon **Julien aka Hairy-Flamby-etc...**, que de chamailleries et de compétitions débiles !! Merci pour ton soutien !! Et bon courage en Hollande !! Je te souhaite le meilleur !! Bref, vous vous rendez compte qu'on finit tous Docteur tout de même !! Nous, la petite bande de dissipés au fond de la salle !! Bravo encore !! Suis très fier !!

Merci à ma Bande de Fous de la Pitié-Salpêtrière, merci à vous mes frères : **Tao aka** le Taïkonauta aux oursins dans les poches !! Tu as une Fille superbe !! **Paul-Bao aka BigBang Theory**, Courage !! Tu vas finir par LA trouver !! **Rédha aka** le muslim parce qu'il en faut un !! Merci !! Nos soirées pizzas-DivX-Jeux vidéo sont de véritables Oasis !!!

Merci à l'Allemand **Michel** !! Mon plus fidèle amis depuis 18 ans... On s'en sort pas trop mal je pense !!! ;)

Bon je crois que les merci ne se mangent malheureusement pas... donc je vous Saucisse **Emmanuelle-Bulle Tropicassée** !! Je n'avais jamais rencontré quelqu'un à l'esprit aussi tordu que le vôtre... à part moi !! Comment peut-on trouver autant de talents dans un si petit corps !! Merci infiniment pour ta patience, ton soutien, ton humour, ton expertise (Ah ben voui !!! La CHIP et la RT-qPCR c'est Vous !!)... et bien plus encore !! Vous êtes vraiment Extraordinaire !! Bouca-Bouca-Boucané !! Et le plus extraordinaire dans ce film... c'est que l'écureuil ... c'est Lui !! Il y a des rencontres qui vous marquent... Merci pour tout...

Je remercie infiniment ma Famille !!! Merci à ma **Mère** pour sa compréhension, son soutien indéfectible (ben oui c'est ma Moman quand même) et qui m'a appris que la Gentillesse et le don de soi n'était en fait que la seule véritable force pour s'en sortir dans la Vie ! Merci à mon **Père** pour ses conseils, son soutien et qui m'a appris la Force de la Volonté ! Merci à mes trois Sœurs, **Alexandra**, **Annabelle** et **Adeline** pour les fous rires et tous ses moments qui forment des bouffées d'oxygène dans une vie qui va trop vite !! Merci aussi à **Morgan** de supporter ma Sœur Alex !! Merci à mon **Parrain** qui m'a fait grandir beaucoup plus qu'il ne peut l'imaginer !! Courage à Toi !! Cette Thèse c'est un peu la vôtre !!

Je tiens à remercier également des personnes formidables qui m'ont soutenu depuis tout ce temps, **Jean-Michel**, **Micheline** et **Steve**. Merci pour vos rires, votre soutien, pour tous ces moments si inoubliables !! Cette Thèse, je vous la dois également !! Merci infiniment...

Il y a une partie de vous tous dans cette Thèse !!!

C'est enfin à ton tour !! Nous nous étions rencontrés près des pistes de l'aéroport d'Orly il y a maintenant un peu plus de sept ans !! J'étais un petit étudiant rêveur et un peu perdu. Toi, fraîchement diplômée et embauchée mais à l'allure pas très sûre non plus !! Puis on a pénétré dans le tourbillon de la Vie, avec ses hauts heureux et ses bas qui font mal (voir très mal parfois) !! Tu as toujours été une épaule sur laquelle je pouvais m'appuyer, Tu m'as toujours soutenu malgré les coups bas du destin... Cette Thèse c'est notre travail à nous deux !! Elle est à Toi !! Merci infiniment **Ingrid**... Je n'aurai jamais été la personne que je suis aujourd'hui sans ton aide... Chaque mot de ce manuscrit est à Toi !! MERCI !!

## *Sommaire*

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>2</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>7</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>14</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>18</b>
CHAPITRE I.....	19
<i>LES CADHERINES.....</i>	<i>.....</i>
<i>REGULATION ET IMPLICATIONS AU COURS DU DEVELOPPEMENT.....</i>	<i>.....</i>
I. Généralités.....	19
II. Structure des cadhérines classiques (E-cadhérine/ N-cadhérine/ Cadhérine-6B/ Cadhérine-7).....	22
III. Régulation transcriptionnelle des cadhérines classiques.....	23
1) Régulation de l'expression de la E-cadhérine.....	23
a. Les facteurs de transcription de la famille Snail.....	23
b. Les facteurs de transcription de la famille ZEB.....	24
c. Les facteurs de transcription à motif Hélice-boucle-Hélice.....	26
2) Régulation de l'expression de la N-Cadhérine.....	27
a. Les facteurs de transcription SOX du groupe B1.....	28
b. Les facteurs de transcription à boîte Forkhead (Fox).....	28
3) Régulation de l'expression de la Cadhérine-6B.....	29
IV. Régulation Post-transcriptionnelle : au niveau du transport et du recyclage après clivage protéolytique.....	30
V. Cadhérines et signalisation.....	31
1) Le Rôle de pivot de la $\beta$ -caténine.....	31
2) Les Rho-GTPases.....	32
3) La voie de signalisation des Récepteurs à tyrosine Kinase.....	33
VI. Rôles des cadhérines au cours du développement embryonnaire.....	34
1) Cadhérines classiques et phénomène d'exclusion cellulaire et tissulaire....	34
2) Cadhérines classiques et mouvements cellulaires coordonnés.....	36
3) Cadhérines classiques dans l'orientation du plan de division cellulaire.....	36
4) Transition de cadhérines au cours du développement.....	37



CHAPITRE II.....	39
<i>LA FORMATION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL DES AMNIOTES :</i> .....	
<i>LA NEURULATION</i> .....	
I. <i>Définition et Généralités</i> .....	39
II. <i>La Neurulation dite « Primaire »</i> .....	42
1) Formation de la plaque neurale.....	42
a. Au niveau tissulaire.....	42
b. Au niveau cellulaire .....	42
2) « Façonnage » ou « Modelage » ( <i>shaping</i> ) de la plaque neurale.....	45
a. Au niveau tissulaire.....	45
b. Au niveau cellulaire .....	46
3) « Courbure » ou « Enroulement » ( <i>bending</i> ) de la plaque neurale.....	47
a. Au niveau tissulaire.....	47
b. Au niveau cellulaire .....	50
c. Au niveau moléculaire .....	51
4) Fusion des bourrelets neuraux et fermeture du tube neural .....	52
a. Au niveau tissulaire.....	52
b. Au niveau cellulaire .....	54
III. <i>La neurulation « Secondaire »</i> .....	57
1) Mécanismes cellulaires .....	57
2) Le Bourgeon caudal : constitué de cellules souches pluripotentes ? .....	61
a. Au niveau tissulaire et cellulaire.....	61
b. Au niveau moléculaire .....	64
IV. <i>Anomalies de fermeture du tube neural et pathologies associées</i> .....	66
1) Les ATN céphaliques (Exencéphalie/Anencéphalie) (Figure 20).....	66
2) Les ATN spinales ( <i>Spina Bifida</i> ).....	67
3) Craniorachischisis (Figure 22).....	68
4) Les défauts du tube neural issu de la neurulation secondaire.....	69
5) <i>Spina Bifida occulta</i> .....	69
6) Multiple causes responsables des Anomalies de fermeture du Tube Neural.....	70
a. Les facteurs non-génétiques.....	70
b. Les facteurs génétiques .....	70
c. Rôle de la signalisation induite par les acteurs de la PCP dans les ATN.....	71
i. Flamingo (Fmi ) / Starry night (Stan) / Celsr1 .....	73
ii. Prickle (Pk).....	74
iii. Strabismus (Stbm) / Vang Gogh (Vang) / Vangl .....	74

CHAPITRE III .....	76
<i>CONTROLE DE LA TRANSITION EPITHELIUM-MESENCHYME</i> .....	
<i>DES CELLULES DE LA CRETE NEURALE :</i> .....	
<i>UN MODELE DE DISSEMINATION CELLULAIRE</i> .....	
<i>I. Généralités et Définition</i> .....	76
<i>II. Induction des Cellules de Crêtes Neurales</i> .....	79
1) Formation des Crêtes Neurales et type de neurulation .....	79
2) Interactions tissulaires et source des signaux inducteurs .....	80
a. Rôle du mésoderme paraxial .....	80
b. Les interactions ectoderme-plaque neurale .....	81
3) Mise en place d'une région frontière entre plaque neurale et ectoderme non-neural .....	83
a. Les facteurs de transcription spécificateurs des régions-frontières .....	84
b. Les facteurs de transcription spécificateurs des Cellules de Crêtes Neurales .....	85
4) Contrôle de la prolifération des précurseurs des CCN .....	88
<i>III. La délamination des CCN nécessite une Transition Epithélium-Mésenchyme</i> .....	89
1) Rôles des cadhérines au cours de la Transition Epithélium-Mésenchyme des CCN .....	90
2) Désorganisation des jonctions serrées .....	94
3) Réorganisation de la Matrice Extra-Cellulaire .....	94
4) Délamination et contrôle du cycle cellulaire .....	96
<b>MATERIEL</b> .....	<b>97</b>
<b>ET</b> .....	
<b>METHODES</b> .....	
<i>I. Embryons d'oiseau</i> .....	98
<i>II. Expérimentations sur embryons</i> .....	98
1) Transgénèse transitoire par Électroporation <i>in ovo</i> .....	98
a. Protocole expérimental .....	98
b. Fixation des embryons électroporés .....	99
c. Inclusion et coupes au cryostat .....	99
2) Expériences de cartographie par utilisation de cristaux de DiI sur embryons en culture .....	100
a. Culture d'embryons d'oiseau .....	100
b. Formation de cristaux de DiI .....	100

c. Dépôt de cristal.....	100
3) Etude du mouvement des cellules de surface par utilisation de CFDA-SE sur embryons en culture .....	101
a. Principe.....	101
b. Protocole expérimental.....	102
4) Expériences de perte de fonction par lipofection sur embryons en culture	103
a. SiRNA .....	103
b. Formation des vecteurs lipidiques ou lipoplexes .....	104
c. Protocole expérimental.....	105
<i>III. Hybridation In Situ.....</i>	<i>105</i>
1) Plasmides .....	105
2) Sondes.....	105
a. Transformation Bactérienne.....	105
b. Linéarisation.....	106
c. Synthèse de sonde .....	106
3) HIS in Toto .....	107
4) HIS sur coupes .....	108
<i>IV. Immunohistochimie.....</i>	<i>108</i>
1) Immunohistochimie <i>in Toto</i> .....	108
2) Immunohistochimie sur coupes .....	109
3) Marquage de la F-actine sur des coupes histologiques froides d'embryons	109
<i>V. Immunoprécipitation de chromatine .....</i>	<i>111</i>
1) Extraction du matériel nucléaire d'embryons d'oiseau .....	111
2) Sonication .....	111
3) Immunoprécipitation de la chromatine .....	111
4) Analyse des résultats par PCR.....	112
<i>VI. Acquisition et traitement des images.....</i>	<i>113</i>

<b>RESULTATS</b> .....	<b>114</b>
PARTIE 1.....	115
<i>CINETIQUE DE LA TRANSITION E-/N-CADHERINE AU COURS DE LA NEURULATION CHEZ L'OISEAU</i> .....	
PARTIE 2.....	134
<i>LES CELLULES DE LA CRETE ECTODERMIQUE ?</i> .....	
<i>LA PREUVE PAR LES CADHERINES !</i> .....	
I. <i>Un répertoire spécifique de cadhérines ségrège les Cellules de la Crête des tissus avoisinants</i> .....	136
A. <i>Cinétique des transitions de Cadhérines au cours de la spécification des cellules de la Crête</i> .....	136
B. <i>Profils d'expression des cadhérines lors de la délamination des Cellules de la Crête</i> .....	143
C. <i>Profils d'expression des cadhérines après délamination des cellules de la Crête</i> .....	150
II. <i>Sox-2 induit l'expression de la N-cadhérine à la surface des cellules du tube neural en se fixant directement sur son enhancer N2</i> .....	152
III. <i>L'expression de la N-cadhérine à la surface des cellules du tube neural induite par le facteur de transcription Sox-2 détermine un destin neural canonique</i> .....	156
IV. <i>Le morphogène BMP-4 définit le territoire des cellules de la Crête en réprimant l'expression de Sox-2 et en induisant l'expression de la cadhérine-6B</i> 158	
V. <i>Les FGF définissent le territoire neural en induisant l'expression de Sox-2 et en réprimant l'expression de la cadhérine-6B</i> .....	163
VI. <i>Conclusion</i> .....	165
PARTIE 3.....	167
<i>UNE NEURULATION ANTERIEURE EN 2D,</i> .....	
<i>UNE NEURULATION POSTERIEURE EN 3D,</i> .....	
<i>UNE NEURULATION INTERMEDIAIRE EN 4D !</i> .....	
I. <i>La formation du système nerveux central de la région troncale et postérieure de l'embryon d'oiseau met en jeu une cinétique précise d'expression de gènes spécifiques</i> .....	169
A. <i>Le profil d'expression du facteur de transcription Snail-2 laisse supposer que les précurseurs neuraux effectuent une transition épithélium-mésenchyme dans une fenêtre temporelle très étroite au cours de la neurogenèse précoce</i> ...	170

B. Paradoxalement, l'expression du facteur de transcription ZEB-2 coïncide plutôt avec l'arrêt supposé de la TEM des précurseurs neuraux postérieurs ....	173
C. L'expression d'un répertoire spécifique de molécules d'adhérence va ségréger les cellules neurales mésenchymateuses des cellules mésodermiques	175
D. La ré-épithélialisation des cellules neurales mésenchymateuses dans la région postérieure au Nœud de Hensen définit un nouveau mode de formation du système nerveux central : c'est la neurulation intermédiaire .....	175
<i>II. La formation du système nerveux troncal et postérieur met en jeu un phénomène de transition épithélium-mésenchyme des précurseurs neuraux de la région postérieure au Nœud de Hensen uniquement dans une fenêtre temporelle très précise.....</i>	<i>180</i>
<i>III. La neurulation intermédiaire conduit à la formation de la moelle épinière de la région des vertèbres thoraciques.....</i>	<i>188</i>
<i>IV. Des anomalies de fermeture du tube neural (ATN) de la région thoracique conduisent à des formes sévères de Spina Bifida chez l'Homme.....</i>	<i>190</i>
<i>V. Les molécules de la polarité planaire semblent être des acteurs majeurs non seulement de la neurulation intermédiaire mais également de la neurulation secondaire.....</i>	<i>193</i>
A. Les profils d'expression de Flamingo, Vangl-2 et Prickle semblent complémentaires au cours de la neurulation de la région troncale et postérieure de l'embryon d'oiseau .....	193
B. L'expression dynamique de la fibronectine au cours de la neurulation intermédiaire et secondaire suggère une nécessaire régulation de la matrice extra-cellulaire pour la migration dirigée des cellules neurales mésenchymateuses vers la région postérieure de l'embryon .....	196
<i>VI. La perte de fonction de Prickle conduit à un Spina Bifida du tube neural de la région thoracique, conséquence de défauts dans la migration dirigée et la ré-épithélialisation des cellules neurales mésenchymateuses.....</i>	<i>197</i>

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>202</b>
<i>LES DIFFERENTES STRATEGIES DE FORMATION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL CHEZ LES VERTEBRES .....</i>	<i>203</i>
I. <i>Chez l'oiseau .....</i>	<i>203</i>
II. <i>Chez l'Homme .....</i>	<i>207</i>
III. <i>Chez la souris .....</i>	<i>209</i>
IV. <i>Chez les anamniotes .....</i>	<i>211</i>
V. <i>Neurulation et contraintes spatiales.....</i>	<i>212</i>
<i>MAIS EN FIN DE COMPTE COMMENT SE MET EN PLACE L'AXE DORSO-VENTRAL DU TUBE NEURAL ? .....</i>	<i>215</i>
I. <i>Formation du plancher du tube neural et origine du signal ventralisant Shh</i>	<i>216</i>
II. <i>Origine du signal dorsalisant induit par les BMP.....</i>	<i>218</i>
III. <i>Formation du toit du tube neural .....</i>	<i>219</i>
<i>PEUT-ON ENCORE PARLER DE CELLULES DE LA CRETE « NEURALE » ? .....</i>	<i>223</i>
I. <i>Cellules de la Crête Neurale et idées reçues.....</i>	<i>225</i>
II. <i>Les Cellules de la Crête ou le paradigme du « ni ni » .....</i>	<i>227</i>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>233</b>

## *Avant-propos*

*« A l'origine des découvertes, il y a toujours un eldorado, une route des Indes, une pierre philosophale, une question trop grande, un mythe dont seuls des illuminés osent parler sans sourire. »*

Roland Omnès

Cette Thèse conte avant tout un rite initiatique, l'aventure scientifique et humaine d'un maître et de son disciple essayant simplement de comprendre certains mécanismes fondamentaux de la nature, de la biologie et de la médecine. Celle-ci n'a pas l'arrogance de vouloir révolutionner la face du monde mais juste d'apporter certaines vérités permettant de nous rapprocher au mieux de la réalité biologique et ainsi de poursuivre le grand œuvre initié par mes maîtres depuis des générations. La Science moderne a cette faculté prodigieuse d'avancer à une vitesse hallucinante. Des idées se vérifient par des observations expérimentales, ces observations deviennent des faits immuables, ces faits conduisent à des concepts puis ceux-ci vont forger des dogmes dont les origines ne sont parfois même pas vérifiées ! Gilbert Keith Chesterton dit dans les *Hérétiques* : « *Le monde moderne est plein d'hommes qui s'en tiennent aux dogmes si fermement qu'ils ignorent même que ce sont des dogmes* ». L'histoire des cadhérines au cours de la formation du système nerveux central des vertébrés en est le plus parfait exemple. Les travaux de Jean-Paul Thiéry sur le profil d'expression de la E-cadhérine combinés à ceux de Masatoshi Takeichi sur celui de la N-cadhérine au cours du développement embryonnaire d'oiseau, dans les années 80, ont conduit à la création d'un des dogmes les plus solides de la biologie du développement : les mouvements de la neurulation seraient les conséquences d'une transition E-/N-cadhérine à la surface des cellules du futur tube neural (Hatta et al., 1987) (Thiery et al., 1984). En effet, les cellules de l'ectoderme de surface conduisant à la plaque neurale expriment la E-cadhérine puis les cellules du tube neural formé expriment la N-cadhérine.

**Ce dogme a ainsi été établi alors même que la cinétique de la transition E-/N-cadhérine n'est pas du tout connu au cours de la neurulation !?** Ce dogme a eu également des conséquences sur le champ d'investigation des Cellules de la Crête Neurale, une population transitoire très particulière de la région du toit du tube neural, conduisant à des concepts de

régulation de l'expression de la N-cadhérine à la surface de ces cellules tirés par les cheveux (Shoval et al., 2007). Nous avons ainsi entrepris d'analyser précisément la cinétique des transitions des cadhérines impliqués au cours de la neurulation d'oiseau et dans la biologie des cellules de la Crête Neurale afin d'en comprendre réellement la régulation et les réelles conséquences de ces changements de cadhérines à la surface de ces cellules.

La formation du système nerveux central appelée neurulation a été l'enjeu de très nombreuses investigations depuis des décennies. Chez les amniotes, le système nerveux central se forme selon deux modes très différents selon l'axe antéro-postérieur de l'embryon : la neurulation primaire dans la région céphalo-cervico-thoracique et la neurulation secondaire dans la région lombo-sacrée (Colas and Schoenwolf, 2001). **Cependant, aussi surprenant que cela puisse paraître, nous ne connaissons toujours pas quand ni comment se fait la transition entre ces deux formes de neurulation.** Nous avons ainsi réalisé une étude très rigoureuse dans l'espace et le temps des mouvements morphogénétiques liés aux neurulations observés chez l'oiseau afin de comprendre précisément comment se fait cette transition entre neurulation primaire et secondaire mais également de définir les régulateurs moléculaires contrôlant ces processus. Cette nécessaire compréhension nous permettant par conséquent de mieux appréhender les mécanismes conduisant aux Anomalies de fermeture du Tube Neural, l'une des malformations congénitales du nouveau-né les plus souvent observées chez l'Homme.

Cette merveilleuse et passionnante aventure scientifique nous a ainsi tout d'abord apporté un éclairage nouveau sur la régulation des cadhérines au cours de la neurogenèse précoce conduisant *de facto* à des concepts originaux concernant les Cellules de la Crête Neurale mais nous a également conduits à identifier et décrire un nouveau mode de neurulation chez l'oiseau.

Je vais ainsi conclure cet avant-propos par une citation d'Albert Einstein résumant parfaitement l'initiation de nos projets scientifiques présentés dans cette thèse.

**« *L'imagination est plus importante que le savoir* »**



## *Résumé*

Les transitions de cadhérines sont souvent impliquées dans des phénomènes de ségrégation cellulaire mettant en jeu un phénomène de Transition Epithélium-Mésenchyme (TEM). Cependant, lors de la formation du système nerveux central, la transition E-/N-cadhérine n'entraîne pas de TEM et, contrairement au modèle en vigueur, **nos résultats montrent que celle-ci n'est absolument pas un prérequis nécessaire aux mouvements morphogénétiques de la neurulation. Dans la région antérieure de l'embryon d'oiseau, elle a lieu bien après la fermeture du tube neural tandis que dans la région postérieure, le tube neural ne se forme qu'à partir de cellules exprimant uniquement la N-cadhérine.** Le point important lors de la formation du système nerveux central semble surtout être le contrôle de la cinétique de cette transition E-/N-Cadhérine. **En effet, cette transition ne s'effectue pas de façon rapide comme lors des carcinomes mais de manière très progressive au cours de la formation du système nerveux central.**

Le système nerveux central d'oiseau se forme au cours du développement selon des modes bien distincts : dans la région antérieure de l'embryon, la neurulation primaire caractérisée par l'enroulement d'une plaque neurale ; dans la région postérieure, la neurulation dite secondaire conduit à un tube nerveux généré par accréction cellulaire dont la lumière centrale est créée par cavitation. **Nous décrivons un nouveau mode de neurulation à la jonction entre les deux autres. Dans la région thoracique, le tube neural se forme selon un mode totalement original ayant certaines caractéristiques des deux modes classiques, c'est la neurulation intermédiaire. Les précurseurs neuraux du tube neural intermédiaire et secondaire effectuent une TEM puis migrent postérieurement de manière coordonnée et dirigée grâce au dépôt polarisé de fibronectine induit par la protéine de la polarité planaire, Prickle, puis se ré-épithélialisent.** De plus, ces cellules neurales mésenchymateuses expriment un répertoire spécifique de molécules d'adhérence les ségrégant du mésoderme voisin : la N-cadhérine comme les cellules mésodermiques mais surtout la cadhérine-6B et également une protéine des jonctions serrées, la claudine-1.

Les Cellules de la Crête Neurale (CCN) constituent un tissu à part du tube neural. **Nous montrons que ces cellules se distinguent du reste du neuroépithélium par un répertoire d'expression de cadhérines spécifiques** : la E-cadhérine exprimée par les cellules de l'ectoderme de surface non-neural, la cadhérine-6B exprimée par les CCN et enfin la N-cadhérine exprimée par les cellules neurales canoniques. Cette ségrégation tissulaire met en jeu une combinaison subtile de morphogènes : **BMP4 inhibe l'expression de la N-cadhérine par les CCN en réprimant l'expression de Sox-2 mais induit également celle de la cadhérine-6B favorisant ainsi le programme de délamination de ces cellules ; FGF4 induit l'expression de la N-cadhérine par l'ensemble des cellules du tube neural et favorise ainsi un destin cellulaire neural canonique.**

**Il apparaît que la ségrégation cellulaire et tissulaire orchestrée par un répertoire d'expression spécifique de cadhérines est un des événements majeurs et indispensables à la neurogenèse précoce au cours du développement embryonnaire.**

## *Abstract*

Very often, Cadherin transitions play a part in cell segregation phenomenon, involving an Epithelium Mesenchyme Transition phenomenon (EMT). However, during the development of the central nervous system, the E-/N-cadherin transition doesn't cause an EMT and, unlike the current model, **our results show that the E-/N-cadherin switch is not a necessary element in morphogenetic movements of neurulation. In the anterior part of the avian embryo, it happens long after the neural tube closing, while, in the posterior region, the neural tube is based from cells expressing only N-cadherin.** The important part in the central nervous system development seems to be mainly the control of the kinetic of this E-/N-Cadherin switch. **Indeed, it doesn't occur so fast, like it does during the carcinomas. Instead, it happens progressively during the development of the embryo.**

Avian central nervous system develops according to specific ways: in the anterior part of the embryo, the primary neurulation characterized by bending of the neural plate; the secondary neurulation which ends to the development of the neural tube by cells accretion which central lumen is created by cavitation. **We describe a new neurulation process, between the two others. In the thoracic part of the body, the neural tube develops in an original way, with few characteristics from the two classic processes. It is the transition neurulation. The neural precursor of the transition neural tube and secondary neural tube make an EMT, and then migrate in a coordinated and directed way thanks to the polarized deposit of fibronectin, induced by the protein of the planar cell polarity, Prickle, and then re-epithelialized themselves.** Moreover, specific repertory of adherence molecules is expressed by the mesenchymal neural cells, and then separate from the mesoderm cells.

Neural Crest cells represent a specific population of the neural tube cells. **We show that these cells are different from the rest of neuroépithélium thanks to a repertory of expression of specific cadherins:** E-Cadherin expressed by non-neural ectodermal cells, Cadherin-6B expressed by neural crest cells and N-cadherin expressed by canonical neural cells. This segregation is orchestrated by a subtle balance between two morphogens: **BMP4 inhibits Sox-2 expression, resulting in non-expression of N-Cadherin by the neural crest cells. BMP4 induces Cadherin-6B and then promotes neural crest fate. Moreover, BMP4 promotes EMT of the neural crest cells by inducing Snail2 and ZEB2. On the other hand, FGF4 promotes neural fate by inducing Sox-2.**

**We found that cells segregation orchestrated by specific repertory of Cadherins, is a major event in the early neurogenesis.**

# **INTRODUCTION**

# Chapitre I

## *Les cadhérines*

### *Régulation et implications au cours du développement*

#### **I. Généralités**

Les cadhérines, mises en évidence durant la compaction de l'embryon de souris et lors du développement de l'embryon d'oiseau (Yoshida and Takeichi, 1982) (Gallin et al., 1983) (Peyrieras et al., 1983), sont des glycoprotéines de surface responsables des liaisons intercellulaires caractérisées par leur liaison exclusive, de type homophilique, dont la stabilité structurelle est dépendante du calcium (Geiger and Ayalon, 1992) (Halbleib and Nelson, 2006) (Yagi and Takeichi, 2000). Les cadhérines sont importantes pour l'ensemble des organismes vivants, des plus simples aux plus complexes. Ces molécules d'adhérence sont non seulement observées chez les vertébrés, les insectes ou le nématode mais également chez les organismes unicellulaires tels que les choanoflagellés (King et al., 2003), des organismes diploblastiques comme l'Hydre (Hobmayer et al., 2000), des spongiaires *Oscarella carmela* (Nichols et al., 2006) ou encore des échinodermes comme l'oursin (Gherzi and Vittorelli, 1990).

Ces protéines ont été décrites non seulement pour leur rôle dans l'adhérence cellulaire, mais également pour leur implication dans de nombreux phénomènes de morphogénèse tissulaire, tels que la reconnaissance cellulaire, la délamination, les mouvements cellulaires coordonnés et la mise en place et le maintien d'une polarité cellulaire.

Il existe cinq grands types de cadhérines (Wheelock and Johnson, 2003) (Figure 1) :

- a. Les cadhérines classiques
- b. Les cadhérines desmosomales
- c. Les cadhérines atypiques
- d. Les protocadhérines
- e. Les « cadhérines-like », mises en évidence dans la polarité planaire

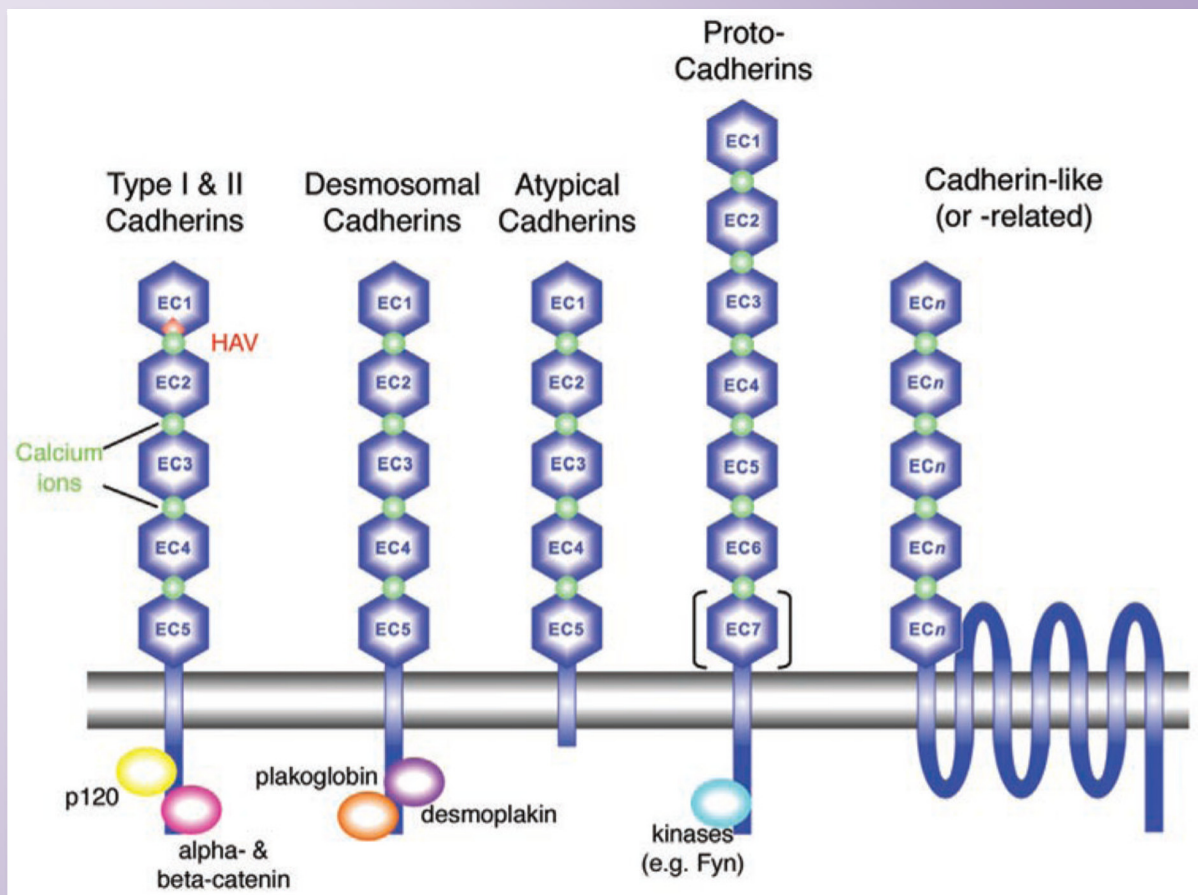
Ces différentes cadhérines se distinguent par des divergences structurales : les cadhérines classiques (de type I ou de type II) possèdent cinq domaines « Cadhérine Extracellulaire » (EC) et constituent les Jonctions Adhérentes (JA), localisées au pôle apical de la cellule, nécessaires aux liaisons intercellulaires.

Les cadhérines desmosomales (desmogléine et desmocolline) permettent à la cellule d'adhérer à la lame basale ou à une autre cellule. Ces molécules d'adhérence forment des liaisons homophiliques et homotypiques via leur partie N-terminale. Dans leur région C-terminale, elles s'associent aux filaments intermédiaires (kératine dans les cellules épithéliales et vimentine dans les cellules mésenchymateuses) par le biais de protéines de liaisons que sont la plakoglobine et la desmoplakine.

Les cadhérines atypiques (T-Cadhérine) interagissent également de manière homophile mais ne s'associent pas au cytosquelette à cause d'un domaine cytoplasmique tronqué.

Les protocadhérines ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  pcdhs, PAPC, AXPC) ont été uniquement observées chez les vertébrés. Ces molécules d'adhérence sont constituées de six à sept domaines EC. Il existe également des divergences au niveau du domaine intracellulaire, notamment au niveau des molécules de liaison. En effet, les protocadhérines ne se lient pas aux caténines mais interagissent avec des kinases (Fyn,...).

Les « cadhérines-like » (Fat, Daschous, Flamingo) forment une classe particulière. Elles ont été découvertes lors d'études de mutants affectant la polarité planaire (Halbleib and Nelson, 2006) (Yagi and Takeichi, 2000). Les « cadhérines-like » les plus connues, Dachsous et Fat possèdent respectivement 27 et 34 domaines EC alors que Flamingo est constituée de sept domaines transmembranaires et d'un domaine extracellulaire constitué de 9 motifs EC. Ces molécules d'adhérence n'interagissent pas avec les caténines ni avec le cytosquelette d'actine et ont divers rôles au cours du développement (ciliogenèse, fermeture du tube neural au cours de la neurogenèse précoce,...) et dans certains mécanismes pathologiques (spina bifida, pathologies neurologiques,...).



**Figure 1 :** Représentation schématique des différents membres de la famille des Cadhérines

La famille des cadhérines, molécules d'adhérence intercellulaire dépendante du calcium, comportent plusieurs membres. Les cadhérines classiques de type I constituées de cinq domaines extramembranaires EC avec un motif "HAV" dans le premier domaine EC1 responsable de liaisons homophiliques fortes contrairement aux cadhérines de type II possédant un motif "XAV" (X étant un acide aminé quelconque). Ces cadhérines classiques comportent un complexe d'adaptateurs protéiques (les caténines alpha, beta et p120) les reliant au cytosquelette d'actine. Les cadhérines desmosomales et les cadhérines atypiques sont également constituées de cinq motifs. Cependant les cadhérines constitutives des desmosomes interagissent avec les filaments intermédiaires (kératine dans le cas des cellules épithéliales et vimentine dans celui des cellules mésenchymateuses) *via* les protéines plakoglobine et desmoplakine alors que les cadhérines atypiques ne possèdent pas de régions cytoplasmiques suggérant aucune interaction avec le cytosquelette. Les protocadhérines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  constituées de six domaines transmembranaires interagissent par leur partie cytoplasmique avec des kinases. Les « cadhérines-like », constituées de sept domaines transmembranaires, sont surtout décrites dans le développement de la drosophile et participent au mécanisme de polarité planaire (d'après *Taneyhill 2008*).

## II. Structure des cadhérines classiques (E-cadhérine/ N-cadhérine/ Cadhérine-6B/ Cadhérine-7)

Le groupe des cadhérines classiques est divisé en deux sous-groupes : les cadhérines de type I (comprenant notamment la E-cadhérine et la N-cadhérine) et les cadhérines de type II (comprenant entre autres la Cadhérine-6B et la Cadhérine-7). Bien que les deux types de cadhérines classiques comportent une partie extracellulaire composée de cinq motifs EC dont la cohésion est maintenue par les ions  $Ca^{++}$ , chaque type se distingue par la structure du dernier motif extracellulaire EC1. En effet, contrairement aux cadhérines de type II, les cadhérines de type I possèdent un tripeptide « HAV » responsable de liaison homophile forte (Halbleib and Nelson, 2006) (Yagi and Takeichi, 2000). La structure des cadhérines et leur mode d'association en *cis* et en *trans* ont été en grande partie élucidés grâce aux techniques de cristallographie ou de RMN et plus récemment par une technique de tomographie sur des coupes vitrifiées d'épidermes humains qui a permis d'observer la structure tridimensionnelle des interactions médiées par les cadhérines (Al-Amoudi et al., 2007). Il apparaît ainsi que lors des contacts cellulaires, les cadhérines exprimées à la surface d'une même cellule interagissent entre elles en *cis* par leur domaine EC et en *trans* avec les cadhérines situées à la surface de la cellule en vis-à-vis, de manière à constituer un complexe très stable.

Le domaine cytoplasmique est très conservé parmi les différents groupes de cadhérines classiques et interagit directement avec de nombreuses protéines telles que la  $\beta$ -caténine, l' $\alpha$ -caténine,  $\gamma$ -caténine et la protéine p120 (Figure 1) (Wheelock and Johnson, 2003) (Gumbiner, 2005). Ces protéines servent d'interface avec le cytosquelette d'actine. La protéine p120 régule ainsi la cohésion entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine en se fixant à la petite GTPase RhoA. En effet, cette liaison va conduire à l'inhibition de RhoA et à l'activation indirecte des petites GTPases Rac-1 et Cdc-42 entraînant ainsi une stabilisation des cadhérines à la membrane cytoplasmique de la cellule (Anastasiadis and Reynolds, 2001).

Au niveau cellulaire, les cadhérines classiques sont essentiellement localisées dans la région apicale et constituent les jonctions adhérentes ou les desmosomes dans les épithélia matures, permettent ainsi à la cellule d'interagir de manière cohérente avec ses voisines, de maintenir sa polarité apico-basale et d'intégrer des signaux provenant de l'environnement tissulaire (Gumbiner, 2005).

L'expression des cadhérines classiques est régulée à plusieurs niveaux : au niveau transcriptionnel, au niveau post-transcriptionnel (transport et recyclage).

### **III. Régulation transcriptionnelle des cadhérines classiques**

#### 1) Régulation de l'expression de la E-cadhérine

La régulation de la E-cadhérine est la mieux connue et la plus étudiée car sa répression est observée dans de nombreux contextes pathologiques, au cours de certains cancers par exemple. En effet, la perte de la E-cadhérine est observée lors de la dissémination métastatique (Huber et al., 2005). L'expression de la E-cadhérine est ainsi réprimée par des facteurs de transcription capables de se fixer au site de régulation du promoteur codant pour cette molécule d'adhérence, E Box : Snail-1, Slug/Snail-2 (Batlle et al., 2000) (Cano et al., 2000) (Nieto, 2002); ZEB-1, ZEB-2/Smad Interacting Protein-1 (SIP-1) (Vandewalle et al., 2005) (Vandewalle et al., 2009), des facteurs de transcription à motif Hélice-Boucle-Hélice (Twist, E47, ...) (Peinado et al., 2007).

##### *a. Les facteurs de transcription de la famille Snail*

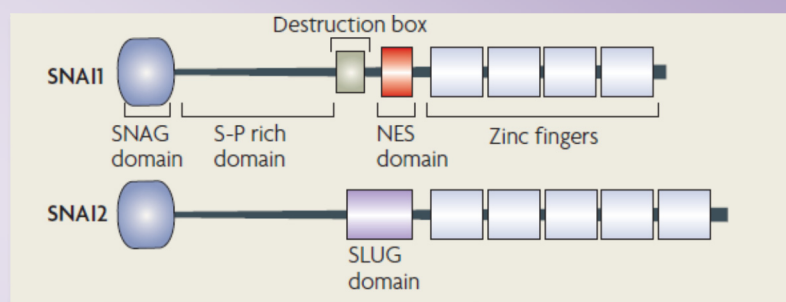
La famille des facteurs de transcription à doigt de zinc des Snail comporte trois membres connus à ce jour chez les vertébrés : Snail-1, Snail-2 (aussi appelé Slug) et Snail-3 (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005). Ce sont des facteurs de transcription, comportant tous dans leur région C-terminale très conservée quatre à six motifs à doigt-de-zinc, ne différant que dans leur région N-terminale (Figure 2). Ces motifs à doigt-de-zinc vont ainsi permettre à ces facteurs de transcription de reconnaître et ainsi de se fixer à des séquences spécifiques consensus de l'ADN, les E-Box C/A(CAGGTG) (Nieto, 2002). Les facteurs de transcription Snail sont avant tout connus comme étant des répresseurs transcriptionnels dont le potentiel répressif dépend de la séquence SNAG décrite dans la région N-Terminale.

La région centrale des protéines Snail est constituée d'une région riche en Sérine-Proline très peu conservée parmi les membres de cette famille de facteur de transcription. La protéine Snail-2 comporte un domaine « slug » dans cette région dont la fonction n'est pas encore bien définie. Néanmoins, deux domaines à la fonction bien caractérisée ont été identifiés dans la région centrale de la protéine Snail-1 : un domaine nécessaire à l'adressage au noyau cellulaire (domaine NES ou Nuclear Export Signal) et un domaine lié à la dégradation de la protéine (Destuction Box). Les jeux de Phosphorylation/Déphosphorylation des répétitions Sérine-Proline de ces deux régions sont responsables de la localisation cellulaire, de la



stabilité structurale et de l'activité de répresseur de Snail-1 (Dominguez et al., 2003) (Zhou et al., 2004) (Peinado et al., 2005).

Le Facteur de Transcription Snail-1 est exprimé lors de la gastrulation, lors de la mise en place des Cellules de Crêtes Neurales (CCN) et plus généralement dans la plupart des stades du développement mettant en jeu des mécanismes de Transition Epithélium-Mésenchyme (TEM) (Thiery, 2002) (Nieto, 2002) (Carver et al., 2001) (Duband, 2010) (Thiery et al., 2009). L'expression de Snail-2/Slug est associée à la gastrulation, la somitogenèse et la migration des CCN (Nieto et al., 1992) (Nieto et al., 1994) (Acloque et al., 2011) (Dale et al., 2006) (Duband, 2010). Ces deux facteurs de transcription, Snail-1 et Snail-2, sont requis pour la mise en place et la délamination des CCN respectivement chez l'amphibien et chez l'oiseau (Nieto, 2002) (Duband, 2010). Cependant, ces deux protéines ne semblent pas indispensables à la formation des CCN chez la souris mais seraient plutôt impliquées dans la mise en place de l'asymétrie droite-gauche (Murray and Gridley, 2006).



**Figure 2 :** Structure et domaines connus des Facteurs de Transcription Snail1 et Snail2

Ces facteurs de transcription, comportant tous dans leur région C-terminale très conservée quatre à six motifs à doigt-de-zinc, ne diffèrent que dans leur région N-terminale. Ces motifs à doigt-de-zinc vont ainsi permettre à ces facteurs de transcription de reconnaître et de se fixer à des séquences spécifiques consensus de l'ADN, les E-Box C/A(CAGGTG) (Nieto, 2002). Les facteurs de transcription Snail sont avant tout connus comme étant des répresseurs transcriptionnels dont le potentiel répressif dépend de la séquence SNAG décrite dans la région N-Terminale. La région centrale des protéines Snail est constituée d'une région riche en Sérine-Proline très peu conservée parmi les membres de cette famille de facteur de transcription. La protéine Snail-2 comporte un domaine « slug » dans cette région dont la fonction n'est pas encore bien définie. Néanmoins, deux domaines à la fonction bien caractérisée ont été identifiés dans la région centrale de la protéine Snail-1 : un domaine nécessaire à l'adressage au noyau cellulaire (domaine NES ou Nuclear Export Signal) et un domaine lié à la dégradation de la protéine (Destruction Box) (d'après Peinado et al. 2007)

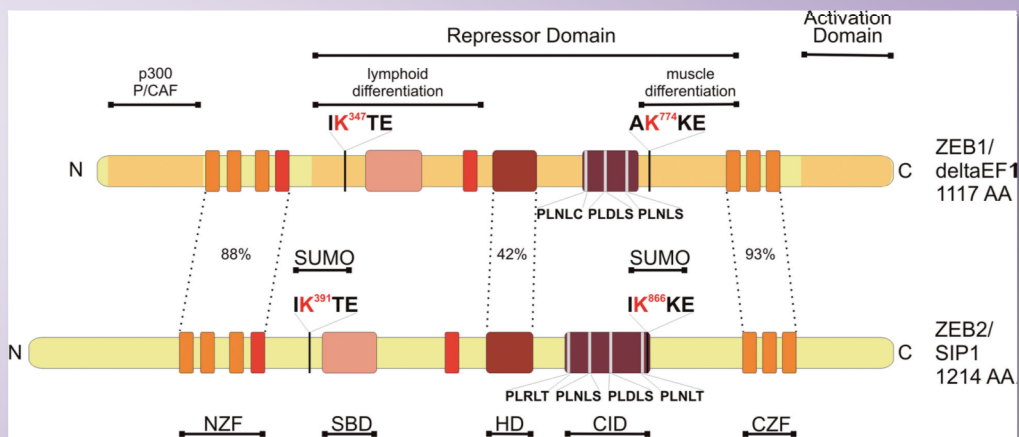
#### b. Les facteurs de transcription de la famille ZEB

La famille des facteurs de transcription ZEB comporte deux membres ZEB-1, aussi nommé  $\delta$ EF1 et ZEB-2/SIP-1 (Smad Interacting Protein 1). Ces facteurs de transcription sont

caractérisés par la présence de deux groupements de trois à quatre motifs doigt-de-zinc à chaque extrémité N- et C-terminale entourant un homéodomaine central (Figure 3). D'autres domaines peuvent être décrits, comme des séquences de reconnaissance et de fixation à CTBP (Carboxy-Terminal Binding Protein) ou une région d'interaction avec la protéine SMAD dans la séquence protéique de ZEB-2 (d'où l'autre nom de ce facteur de transcription, SIP-1) (Postigo et al., 2003) (Remacle et al., 1999). Les protéines ZEB interagissent avec l'ADN simultanément avec leurs deux domaines doigt-de-zinc qui se fixent aux séquences E-Box (CACCT et CACCTG) (Remacle et al., 1999) (Comijn et al., 2001) (Eger et al., 2005) (Vandewalle et al., 2005) et peuvent recruter soit des facteurs co-activateurs (P/CAF or p300 pour ZEB-1) soit des facteurs co-répresseurs (CTBP pour ZEB-2) (Postigo et al., 2003) (Vandewalle et al., 2005) (Vandewalle et al., 2009).

Lors du développement embryonnaire, les facteurs de transcription ZEB sont exprimés très précocement. Chez l'amphibien et l'oiseau, ZEB-2/SIP-1 est nécessaire à l'induction neurale, permettant ainsi la formation de la future plaque neurale (Sheng et al., 2003) (van Grunsven et al., 2000) (van Grunsven et al., 2007) en réprimant l'expression du facteur de transcription à boîte T, Brachyury, impliqué dans le déterminisme mésodermique (Verschueren and Huylebroeck, 1999) (Papin et al., 2002). ZEB-2/SIP-1 est exprimé dans les cellules du système nerveux central, les cellules de la crête neurale, les cellules myocardiques, les myocytes et les cellules hématopoïétiques (Van de Putte et al., 2003) (Delalande et al., 2008) (Bassez et al., 2004) (Vandewalle et al., 2009). De plus, dans ces tissus, a été observée une compensation au-moins partielle de l'un des membres de la famille ZEB par l'autre lors d'expériences de perte de fonction suggérant ainsi une fonction commune à ces deux facteurs de transcription (Postigo and Dean, 2000). Cependant, les souris transgéniques *Zeb 2* *-/-* connaissent un retard sévère de développement. A 9.5 jours, les embryons ne se retournent pas, présentent un défaut de migration des cellules de la crête neurale au niveau vagal et meurent (Van de Putte et al., 2003). Chez l'Homme, il a été montré que les patients atteints d'une forme sévère de la Maladie d'Hirschsprung appelé le syndrome de Mowat-Wilson, une neurocristopathie congénitale rare (1/1000000 naissances) entraînant un retard mental, une dysmorphie faciale, des anomalies cardiaques et des défauts sévères d'innervation de l'intestin, présentaient des mutations pour le gène *ZFHX1B* codant pour ZEB-2 (Amiel and Lyonnet, 2001) (Cacheux et al., 2001) (Wakamatsu et al., 2001) (Yamada et al., 2001) (Zweier et al., 2002). Plus récemment, l'utilisation de souris transgéniques mutées de façon spécifique pour ZEB-2 dans l'étude des Cellules Souches ainsi que les Cellules Progénitrices

Hématopoïétiques (utilisation de souris Tie-Cre et Vav-iCre) a pu mettre en évidence que ce facteur de transcription n'est pas requis lors de la mise en place des bourgeonnements (ou *clusters*) hématopoïétiques au niveau de l'aorte mais est indispensable à la différenciation hématopoïétique. En effet, ces souris transgéniques présentent un défaut de colonisation à la fois du foie fœtal où a lieu l'amplification de la population des progéniteurs hématopoïétiques et de la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse adulte (Goossens et al., 2011).



**Figure 3 : Structure et domaines connus des Facteurs de Transcription ZEB-1 et ZEB-2**

Ces facteurs de transcription sont caractérisés par la présence de deux groupements de trois à quatre motifs doigt-de-zinc à chaque extrémité N- et C-terminale entourant un homéodomaine central. D'autres domaines peuvent être décrits, comme des séquences de reconnaissance et de fixation à CTBP (Carboxy-Terminal Binding Protein) ou une région d'interaction avec la protéine SMAD dans la séquence protéique de ZEB-2. Les protéines ZEB interagissent avec l'ADN simultanément avec leurs deux domaines doigt-de-Zinc qui se fixent aux séquences E-Box (CACCT et CACCTG) (d'après Wandevallé 2009)

### c. Les facteurs de transcription à motif Hélice-Boucle-Hélice

Les facteurs de transcription à motif Hélice-Boucle-Hélice (HLH) tels que les membres de la famille des Id contiennent trois domaines importants : un domaine basique de liaison à l'ADN, deux hélices  $\alpha$  séparées par une boucle. Le motif Hélice-Boucle-Hélice ainsi constitué sert aux interactions protéine-protéine. En effet, les membres de cette famille de facteurs de transcription n'agissent uniquement qu'en formant des dimères. Cependant, certaines protéines peuvent comporter une région basique (bHLH).

Ces protéines bHLH se fixent à l'ADN en reconnaissant la séquence régulatrice E-box soit en formant des homodimères soit des hétérodimères (Ellenberger et al., 1994).

Les facteurs de transcription à motif bHLH sont classés en 7 groupes en fonction de leur distribution tissulaire, leur capacité à se dimériser et à se fixer à l'ADN (Massari and Murre, 2000). Les plus connus et mieux étudiés en terme de répression de la E-cadhérine sont les facteurs de transcription de la classe I tel que le facteur E47 qui agissent soit sous forme soit d'homodimère soit d'hétérodimère avec les protéines de la classe II. Contrairement aux protéines de la classe I, les facteurs de transcription de la classe II n'agissent qu'en formant des hétérodimères avec les bHLH de classe I. Les plus connus sont Twist-1 et Twist-2. Le facteur de transcription Twist est exprimé par les cellules de la crête neurale chez l'amphibien, l'oiseau, le poisson-zèbre et la souris (Hopwood et al., 1989) (Soo et al., 2002) (Germanguz et al., 2007) (Duband, 2010), par le dermatome, le sclérotome mais jamais par le myotome suggérant un rôle d'inhibiteur de différenciation musculaire (Hebrok et al., 1994) (Chen and Behringer, 1995) (Gitelman, 1997) (Tavares et al., 2001) (O'Rourke and Tam, 2002). Récemment, il a été montré chez le poisson que Twist contrôle le développement du squelette ainsi que la mise en place de l'axe dorso-ventral en régulant Runx2b (Yang et al., 2011).

## 2) Régulation de l'expression de la N-Cadhérine

Paradoxalement, contrairement à celle de la E-cadhérine, la régulation de l'expression de la N-Cadhérine a été peu étudiée. Le mécanisme métastatique s'accompagne d'un changement dans le répertoire des cadhérines. La plupart du temps, une perte d'expression de la E-cadhérine par les cellules cancéreuses s'accompagne d'une induction de celle de la N-cadhérine lors de leur départ en migration (Thiery et al., 2009) (Duband, 2010). Cependant, en se tournant vers la biologie du développement, Matsumata et ses collaborateurs du laboratoire de Hisato Kondoh ont disséqué le promoteur du gène codant pour la N-cadhérine, molécule d'adhérence exprimée dans le tissu neural (Hatta and Takeichi, 1986) (Hatta et al., 1987) (Takeichi, 1988). Ils ont observé la présence de plusieurs régions activatrices dont quatre (*enhancers* 2 à 4) comportent des séquences de fixation aux facteurs de transcription Sox dont les membres du groupe B1, représenté par le facteur de transcription Sox-2 et également exprimé dans l'ensemble du Système Nerveux Central (SNC) (Uchikawa et al., 1999) (Uchikawa et al., 2003) (Uchikawa et al., 2011). L'expression de la N-cadhérine dans le SNC est ainsi contrôlée selon l'axe antéro-postérieur par l'activation des différents *enhancers* après fixation de Sox-2 (Matsumata et al., 2005).

La N-cadhérine est également exprimée dans l'ensemble des dérivés mésodermiques (Hatta and Takeichi, 1986) (Hatta et al., 1987) (Takeichi, 1988) et la présence d'*enhancers* ne comportant pas de séquences de fixation aux SOX laisse suggérer une régulation par d'autres facteurs de transcription dans ces tissus (Matsumata et al., 2005). Les facteurs de transcription à boîte Forkhead semblent être de bons candidats (Kaestner et al., 2000) (Cheung et al., 2005).

*a. Les facteurs de transcription SOX du groupe B1*

*Sry* (sex-determining region of Y chromosome), le premier gène impliqué dans la détermination du sexe mâle a été le premier gène décrit de la famille *Sox* (SRY-related HMG box) (Sinclair et al., 1990). Les facteurs de transcription Sox possèdent une séquence de 79 acides aminés, la boîte HMG, impliquée dans la reconnaissance et la fixation à l'ADN (Gubbay et al., 1990) (Wright et al., 1993). Il existe 30 gènes *Sox* regroupés en huit groupes annotés de A à H selon des comparaisons phylogénétiques du domaine HMG. Le groupe B est lui-même divisé en deux sous-familles : les protéines SoxB1 (Sox1, 2 et 3) possédant une activité transcriptionnelle activatrice et les protéines SoxB2 (Sox14 et 21) ayant elles une activité répressive (Bowles et al., 2000).

Les protéines Sox reconnaissent une séquence spécifique de l'ADN (50-A/TA/TCAAA/TG-30), s'y fixent par leur domaine HMG (Wright et al., 1993) (Harley et al., 1994) (van de Wetering et al., 1993) et peuvent avoir soit un rôle activateur ou répresseur d'expression transcriptionnel (Kiefer, 2007) (Kamachi et al., 2000).

Les facteurs de transcription SoxB1 sont exprimés très tôt au cours du développement embryonnaire, dès la fin du stade gastrula. Les protéines Sox-3 puis Sox-2 sont exprimés lors de l'induction neurale puis tout au long de la mise en place du système nerveux central. De plus, ces facteurs de transcription ont un rôle important dans le déterminisme neuro-ectodermique et la différenciation cellulaire au cours de l'embryogenèse murine (Pevny and Lovell-Badge, 1997) (Wegner, 1999) (Avilion et al., 2003) (Graham et al., 2003) (Uchikawa et al., 1999) (Uchikawa et al., 2003) (Uchikawa et al., 2011) (Thomson et al., 2011).

*b. Les facteurs de transcription à boîte Forkhead (Fox)*

Les facteurs de transcription à boîte Forkhead ou à motif hélice ailée sont caractérisés par une séquence de 100 acides aminés nécessaire à la fixation à l'ADN. Ce domaine spécifique est

une variante du motif Hélice-Tour-Hélice et est constitué de trois hélices  $\alpha$  reliées par deux grandes boucles ou ailes (d'où leur nom). Des analyses phylogénétiques ont permis de définir 15 classe de facteurs de transcription à boîte forkhead (Kaestner et al., 2000).

Le facteur de transcription *FoxD3* est un des gènes exprimés spécifiquement par les précurseurs des CCN de tous les vertébrés (Sasai et al., 2001) (Kos et al., 2001) (Dottori et al., 2001) (Odenthal and Nusslein-Volhard, 1998). Des expériences de gain de fonction de *Foxd3* ont montré une augmentation spatiale du territoire des CCN (Sasai et al., 2001) (Kos et al., 2001) (Dottori et al., 2001), une augmentation de l'intégrine  $\beta 1$  et une répression de l'expression de la N-cadhérine (Cheung et al., 2005). Les expériences inverses de perte de fonction ont montré une réduction voire une disparition des précurseurs des CCN (Sasai et al., 2001) (Kos et al., 2001).

Récemment, Rouso et ses collaborateurs ont montré que *Foxp2* et *Foxp4*, deux autres membres de la famille des facteurs de transcription à motif hélice ailée, sont progressivement exprimés au cours de la différenciation neurale de la moelle épinière. Ils ont également démontré qu'une expression élevée de ces deux *Foxp* entraîne une répression de celle de la N-cadhérine et ainsi un détachement des neurones différenciés du neuroépithélium (Rouso et al., 2012).

### 3) Régulation de l'expression de la Cadhérine-6B

La cadhérine-6B, une cadhérine classique de type II, est exprimée lors du développement par les cellules de la Crête Neurale (CCN) (Duband, 2006; Nakagawa and Takeichi, 1998) (Taneyhill, 2008). Des approches par perte de fonction de la cadhérine-6B réalisées chez l'oiseau par l'équipe de Marianne Bronner-Fraser ont permis de mettre en évidence un départ en migration prématuré des CCN. Inversement, une surexpression de cette molécule d'adhérence entrave la délamination de ces mêmes cellules (Coles et al., 2007). Cette même équipe a montré ensuite que le promoteur du gène codant pour la Cadhérine-6B comporte plusieurs séquences régulatrices E-Box (CAGGTA) permettant des interactions directes avec le facteur de transcription Snail-2/Slug et ainsi sa répression (Taneyhill et al., 2007). Cette étude a été la première à identifier une cible directe, une molécule d'adhérence - la cadhérine-6B - de Snail-2/Slug lors de la délamination des Cellules de la Crête Neurale (CCN) et permet une avancée majeure dans la compréhension d'une des fonctions de ce facteur de transcription si important dans la biologie de cette population cellulaire.

#### IV. Régulation Post-transcriptionnelle : au niveau du transport et du recyclage après clivage protéolytique

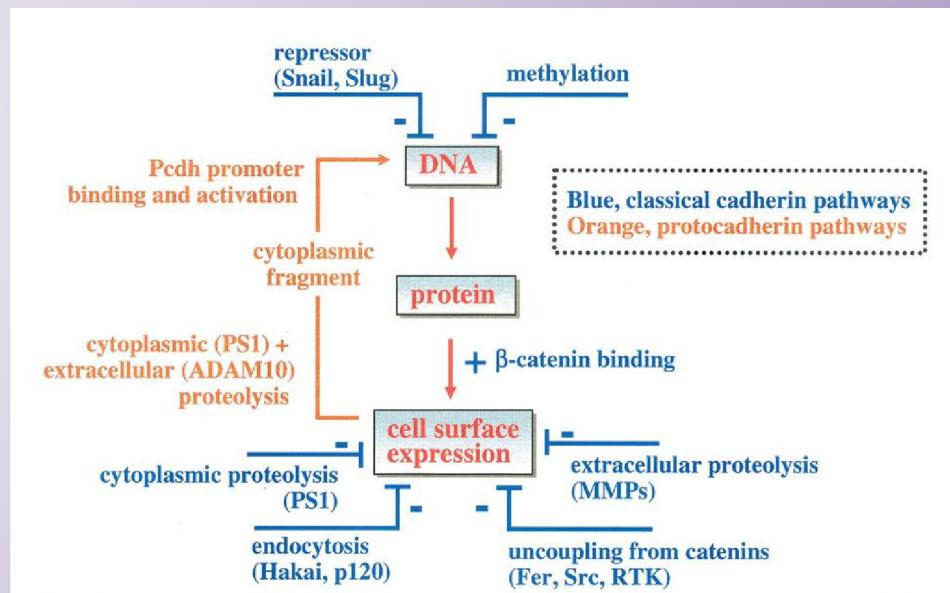
Les interactions cellule-cellule peuvent être modulées par la quantité de cadhérine à la surface de la cellule (Foty and Steinberg, 2005). Cette quantité de cadhérine à la membrane cytoplasmique peut être régulée à différents niveaux et par différents mécanismes.

Le transport de la E-cadhérine néosynthétisée à la membrane plasmique par exemple nécessite la liaison à la  $\beta$ -caténine (Chen et al., 1999). Une fois adressée à la membrane, la molécule d'adhérence est régulée par des mécanismes de phosphorylation (stabilisation ou inhibition), de protéolyse et d'ubiquitination notamment par la E3 ubiquitin ligase, Hakai (Fujita et al., 2002).

Les protéines ADAM 10 (A Desintegrin And Metalloprotease Domain) peuvent cliver les cadhérines dans leur domaine extracellulaire proche de la région transmembranaire (Maretzky et al., 2005) (Reiss et al., 2005). Cette partie extracellulaire issue du clivage protéolytique peut également servir d'inhibiteur compétitif en se fixant en *trans* avec les cadhérines endogènes non clivées et entraîner ainsi une perte d'adhérence cellulaire (Wheelock et al., 1987).

La région cytoplasmique des cadhérines classiques est aussi la cible de clivage protéolytique. La Presenilin-1 et son activité  $\gamma$ -secretase peut cliver la E-cadhérine dans la région cytoplasmique entraînant *de facto* une perte d'adhérence cellule-cellule (Marambaud et al., 2002).

La E-cadhérine va également être rapidement endocytée *via* des vésicules entourées de clathrine afin d'être recyclée (redistribution/réassociation dans une autre région cellulaire ou dégradée). Cette internalisation est tout d'abord précédée par une ubiquitination effectuée par la E3 ubiquitin ligase, Hakai (Fujita et al., 2002) (Figure 4).



**Figure 4 : Régulation des Cadhérines**

Les cadhérines classiques sont régulées au niveau transcriptionnel par des facteurs de transcription à doigt-de-zinc tels que les membres de la famille Snail et ceux de la famille ZEB, par des facteurs de transcription à motif Hélice-Boucle-Hélice (Twist, E 47,...) ou des facteurs de transcription à boîte HMG (Sox 1, 2, 3). L'adressage à la membrane des cadhérines néo-synthétisées nécessite une fixation à la  $\beta$ -caténine. La quantité de cadhérines à la surface de la cellule est finement régulée par des phénomènes d'endocytose causés par des mécanismes d'ubiquitination effectuée par la E3 ubiquitin ligase, Hakai, des phosphorylations des caténines entraînant leur détachement et la déstabilisation du complexe cadhérine-caténines. Enfin les cadhérines peuvent être clivées dans leur région extramembranaire par les ADAM et dans leur partie cytoplasmique par la  $\gamma$ -secretase (d'après Hableib et al.2007).

## V. Cadhérines et signalisation

Bien que nécessaires à l'établissement de contacts cellulaires stables et à la réorganisation du cytosquelette d'actine, les protéines des complexes cadhérine-caténines peuvent être des acteurs clés de la régulation de certaines voies de signalisation et ainsi en moduler les effets sur le destin de la cellule.

### 1) Le Rôle de pivot de la $\beta$ -caténine

La  $\beta$ -caténine est une des molécules majeures impliquées dans la voie de signalisation Wnt. Quand la  $\beta$ -caténine est localisée dans le cytoplasme, cette protéine est rapidement dégradée par un complexe protéique impliquant l'Axine et l'Adenomatous polyposis Coli (APC). En présence de Wnt, le complexe de destruction est inactivé et la  $\beta$ -caténine va pouvoir se transloquer au noyau où elle va jouer le rôle de cofacteur en se liant au T Cell Factor (TCF) et



au Lymphoid enhancer Factor (LEF) (Clevers, 2006) (Grigoryan et al., 2008) (Angers and Moon, 2009). Ainsi, l'interaction cadhérine- $\beta$ -caténine au niveau des jonctions adhérentes va limiter mécaniquement la translocation vers le noyau de la  $\beta$ -caténine (Piedra et al., 2003) (Brembeck et al., 2004) (Brembeck et al., 2006) (van Buul et al., 2005) (Coluccia et al., 2007) (Daugherty and Gottardi, 2007) (Kajiguchi et al., 2007) (Rhee et al., 2007). La régulation de l'affinité de la  $\beta$ -caténine aux cadhérines est donc primordiale et dépend de l'état de phosphorylation de cette protéine. En plus d'une séquestration mécanique, les cadhérines peuvent moduler l'activité de facteur de transcription de la  $\beta$ -caténine en augmentant sa dégradation au niveau de la surface cellulaire en formant un complexe de dégradation associé à la membrane (Maher et al., 2009). Enfin, la  $\beta$ -caténine se lie de manière constitutive aux cadhérines et cette interaction a lieu également dans une cellule indépendamment de toute activité adhésive (Stepniak et al., 2009) (Heuberger and Birchmeier, 2010).

De manière analogue à la  $\beta$ -caténine, les cadhérines peuvent également séquestrer à la membrane d'autres protéines pouvant jouer le rôle de facteur de transcription (p120 et la plakoglobine). Dans le cytoplasme, la protéine p120 peut se lier au répresseur transcriptionnel Kaiso. Cette interaction protéique va permettre le déplacement de Kaiso des promoteurs de certains gènes et entraîner *de facto* une répression transcriptionnelle (McCrea et al., 2009) (Daniel, 2007). L'activité transcriptionnelle de la plakoglobine n'a pas été aussi bien étudiée que celle de la  $\beta$ -caténine (Yin et al., 2005) (McCrea et al., 2009). L'effet de la plakoglobine sur l'expression génique est sujet à controverse. En effet, des études ont montré que la plakoglobine peut se lier aux facteurs de transcription LEF/TCF et avoir une activité transcriptionnelle, d'autres études ont montré que le complexe plakoglobine-TCF est incapable de se fixer à l'ADN (soit l'inverse !!) (McCrea et al., 2009) (Zhurinsky et al., 2000).

## 2) Les Rho-GTPases

Les protéines Rho sont des molécules de signalisation impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires (Kjoller and Hall, 1999) (Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997) (Braga, 2000) (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Elles sont surtout impliquées dans la régulation des filaments d'actine et dans l'ensemble des mécanismes cellulaires nécessitant une réorganisation du cytosquelette. Dans les épithélia, ces petites GTPases jouent un rôle important dans la formation et la stabilité des jonctions adhérentes et serrées (Braga, 2000). La famille des petites GTPases inclut Cdc-42 (molécule impliquée dans la formation des filopodes), Rac (impliquée dans la formation de lamellipodes) et Rho (impliquée dans

l'organisation des cables d'actine) (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Ces GTPases transitent continuellement d'un état actif avec fixation et utilisation de GTP à un état inactif. L'activation de ces molécules est finement régulée par de nombreux acteurs moléculaires tels que les *Guanine nucleotide Exchange Factors* (GEFs) qui catalysent l'échange GDP/GTP ; les *GTPase Activating Proteins* (GAPs) qui augmentent l'hydrolyse de la GTP ; et les *Guanine Dissociation Inhibitors* (GDIs) qui inhibe la libération de GDP (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Les cadhérines interagissent et peuvent recruter à la membrane cellulaire des protéines pouvant réguler l'action de petites GTPases et moduler ainsi l'organisation de l'actine.

La protéine de la famille des caténines p120 en est un très bon exemple, cette protéine est un puissant inhibiteur de RhoA quand elle est libérée dans le cytoplasme (Noren et al., 2000) (Grosheva et al., 2001) (Anastasiadis and Reynolds, 2001) (Anastasiadis, 2007). La protéine p120 peut également recruter à la membrane la protéine activatrice de GTPase p190RHO (Rho-guanine nucleotide exchange factor), ce qui aura pour conséquence de réguler encore plus drastiquement le rôle de RhoA dans la mise en place des jonctions d'adhérence ainsi que leur stabilité. L'inhibition de RhoA par p120 peut avoir des conséquences à la fois positives et négatives sur la motilité cellulaire. Cette inhibition va d'une part permettre une réorganisation du cytosquelette d'actine au niveau du front de migration et une perte d'adhésion dans la partie arrière, tractée, de la cellule, et d'autre part réduire la dynamique et la contractilité des filaments d'actine dans le corps cellulaire (Anastasiadis, 2007). D'autres études ont montré que la molécule p120 active Rac1 et Cdc42 probablement en activant Vav2, un facteur d'échange de guanine nécessaire à l'activation de ces GTPases (Noren et al., 2000) (Grosheva et al., 2001).

### 3) La voie de signalisation des Récepteurs à tyrosine Kinase

De nombreuses études suggèrent des associations entre les cadhérines et les récepteurs à Tyrosine Kinase. Les travaux des groupes de Walsh et de Doherty suggèrent que la N-cadhérine stabilise la dimérisation des récepteurs au *Fibroblast Growth Factor* (FGF) et induit ainsi une activation de cette voie de signalisation indépendamment de tout ligand (Williams et al., 1994) (Williams et al., 2001) (Skaper et al., 2001). De manière assez intéressante, le groupe de Hazan a montré que les interactions entre N-cadhérine et récepteurs au FGF prolongent l'activation de cette voie de signalisation en stabilisant les récepteurs au FGF à la surface cellulaire. Cette étude démontre ainsi que la N-cadhérine est également

impliquée dans l'activation de la voie de signalisation FGF de manière dépendante du ligand (Suyama et al., 2002). De plus la N-cadhérine interagit directement avec les récepteurs au FGF *via* son 4<sup>ème</sup> domaine EC (Williams et al., 2001) (Williams et al., 2002) (Kim et al., 2000). Le but des études d'interactions entre la N-cadhérine et les récepteurs aux FGF a été de mieux comprendre et de mieux définir le pouvoir de migration et d'invasion de cellules cancéreuses isolées, ce qui exclut *de facto* le rôle de la N-cadhérine dans les interactions intercellulaires. Ainsi, la N-cadhérine est impliquée dans des interactions aux récepteurs au FGF et induit l'activation de cette voie de signalisation à la fois de manière ligand-dépendant et ligand-indépendant.

Pece et Gutkind ont également observé que la E-cadhérine peut activer les récepteurs à l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) de manière ligand-indépendant et induire une activation des MAPK (Pece and Gutkind, 2000).

Il apparaît ainsi que l'activation de la voie de signalisation FGF facilitée par la N-cadhérine et celle des EGF renforcée par la E-cadhérine est à la fois dépendante de l'activité catalytique des récepteurs de ces facteurs de croissance mais peut également être indépendante de toute liaison de ligand. Ces travaux suggèrent donc que le répertoire de cadhérines exprimées peut directement moduler la réponse cellulaire à l'une ou l'autre des voies de signalisation et jouer directement sur le devenir de la cellule.

## VI. Rôles des cadhérines au cours du développement embryonnaire (Figure 5)

### 1) Cadhérines classiques et phénomène d'exclusion cellulaire et tissulaire

Les cadhérines classiques sont exprimées dans de nombreux types tissulaires durant le développement. Par exemple, la E-cadhérine est présente dès le stade morula lors du développement murin, où elle est nécessaire au phénomène de compaction et au développement préimplantatoire du blastocyste. En effet, des expériences d'extinction du gène codant pour cette molécule d'adhérence chez la souris ont montré un taux élevé de létalité embryonnaire et un défaut de formation du trophectoderme (Larue et al., 1994) (Kan et al., 2007). De plus, La E-cadhérine est exprimée dans l'ensemble des épithélia et cette molécule d'adhérence est importante à la mise en place et au maintien d'une polarité apico-basale. La N-cadhérine est exprimée dans l'ensemble du système nerveux ainsi que dans les

muscles squelettiques et le myocarde (Duband et al., 1988) (Hatta et al., 1987). L'inactivation du gène codant pour cette protéine conduit chez la souris à une létalité précoce due à de nombreuses anomalies développementales : des somites plus petits, de forme irrégulière et à l'organisation épithéliale perturbée ; un tube neural ondulant ; un défaut de développement du cœur (Radice et al., 1997). Cette molécule est également un acteur majeur de la morphogénèse des somites. Des travaux ont ainsi montré qu'une inhibition de liaison de la N-cadhérine par utilisation d'anticorps spécifiques entraîne de lourdes malformations de structure des somites (Duband et al., 1987). La R-cadhérine est exprimée par les cellules du prosencéphale et de l'os. La P-cadhérine est observée dans la couche profonde de l'épiderme. Enfin, la VE-cadhérine est exprimée par les cellules endothéliales (Takeichi, 1988) (Hirano et al., 2003). Les cadhérines classiques de type II telles que la cadhérine-6B, la cadhérine 6, la cadhérine-7 ou la cadhérine-11 sont respectivement exprimées par les progéniteurs des CCN, les lames latérales (splanchnopleure), les CCN lors de leur migration et le rein (Taneyhill, 2008) (Nollet et al., 2000). La propriété homophile des liaisons établies par ces molécules d'adhérence peut expliquer l'exclusion de certains types cellulaires spécifiques au sein d'un tissu donné. Ce phénomène d'exclusion et de tri cellulaire a été tout d'abord mis en évidence en transfectant différentes cadhérines dans des cellules en culture (Nose et al., 1988) (Steinberg and Takeichi, 1994) (Foty and Steinberg, 2005). Cependant, les travaux majeurs réalisés par l'équipe de Malcolm S. Steinberg sur le rôle dans l'adhérence et les propriétés physiques des liaisons impliquant les cadhérines ont montré tout d'abord que deux populations de cellules exprimant chacune soit la E-cadhérine soit la N-cadhérine peuvent, à des niveaux faibles d'expression de chacune de ces molécules, tout à fait se mélanger sans s'exclure mutuellement (les cadhérines formant ainsi des liaisons hétérophiliques) remettant ainsi en cause l'idée d'une ségrégation stricte de tissus dont les cellules expriment ces deux cadhérines classiques comme lors de la neurulation. Dans le cas des cadhérines de type I, ces expériences *in vitro* suggèrent ainsi que le type de molécules d'adhérence exprimées par les cellules de différents tissus n'est pas nécessairement la cause de la ségrégation cellulaire et tissulaire mais plutôt leur niveau d'expression (Duguay et al., 2003) (Foty and Steinberg, 2005). Néanmoins, alors que cette véritable tolérance moléculaire semble vérifiée dans le cas d'interactions entre cadhérines classiques de type I (avec formation de liaisons hétérophiliques possibles dans certaines conditions), Katsamba et collaborateurs ont montré lors d'études similaires sur des cellules transfectées avec différentes cadhérines que ce phénomène n'est absolument pas possible entre populations cellulaires exprimant des cadhérines de type I et de type II (Katsamba et al., 2009). Il apparaît ainsi que la ségrégation

cellulaire au sein d'un tissu dont les cellules expriment toutes le même type de cadhérine classique de type I à des niveaux équivalents d'expression ne peut se faire qu'avec le concours d'autres molécules d'adhérence comme l'expression à des niveaux plus faibles de cadhérines de type II par exemple (Katsamba et al., 2009). Au cours du développement, la ségrégation cellulaire causée par les cadhérines est un phénomène indispensable. Par exemple, au cours de l'ovogenèse chez la drosophile, l'ovocyte doit être situé dans la partie postérieure du sac germinale et les liaisons homophiliques de la DE-cadhérine (homologue de la E-cadhérine) exprimée par l'ovocyte et les cellules folliculaires postérieures sont seules responsables de cette position (Godt and Tepass, 1998). Ce phénomène de tri cellulaire a été également observé lors de la gastrulation (Stern, 2004) (Oda et al., 1998) et la formation des membres chez les vertébrés (Gumbiner, 2005).

## 2) Cadhérines classiques et mouvements cellulaires coordonnés

Lors de la gastrulation, l'ectoderme exprimant la E-cadhérine va effectuer des mouvements morphogénétiques complexes tels que des mouvements de convergence et d'extension causés par des intercalations radiales et médiolatérales de cellules (Keller et al., 2000) (Keller et al., 2003) (Stern, 2004). Au cours de l'épibolie chez le poisson, la perte de la E-cadhérine n'entraîne pas de défaut d'intercalation des cellules de l'épiblaste. Néanmoins, la couche externe n'est pas stable et les cellules qui viennent de s'intercaler se détachent suggérant ainsi un rôle important de cette molécule d'adhérence lors du processus (Kane et al., 2005) (Shimizu et al., 2005).

## 3) Cadhérines classiques dans l'orientation du plan de division cellulaire

Les analyses du rôle des cadhérines dans l'étalement et l'intercalation cellulaire ont montré que la E-cadhérine peut orienter le plan de division cellulaire. La régulation du plan de division des cellules va permettre une extension dirigée selon un même axe de certains tissus (Lu et al., 2001) (Wang et al., 2004). Dans le testicule de drosophile, la mitose des cellules souches germinales (CSG) va engendrer une cellule souche et une gonialblaste. Le maintien d'une population de CSG requiert ainsi un contrôle strict de l'orientation du plan de division des cellules. L'adhérence spécifique des cadhérines entre les CSG et le « hub », une population de cellules somatiques, va ainsi déterminer ce plan de division (Yamashita et al., 2003).

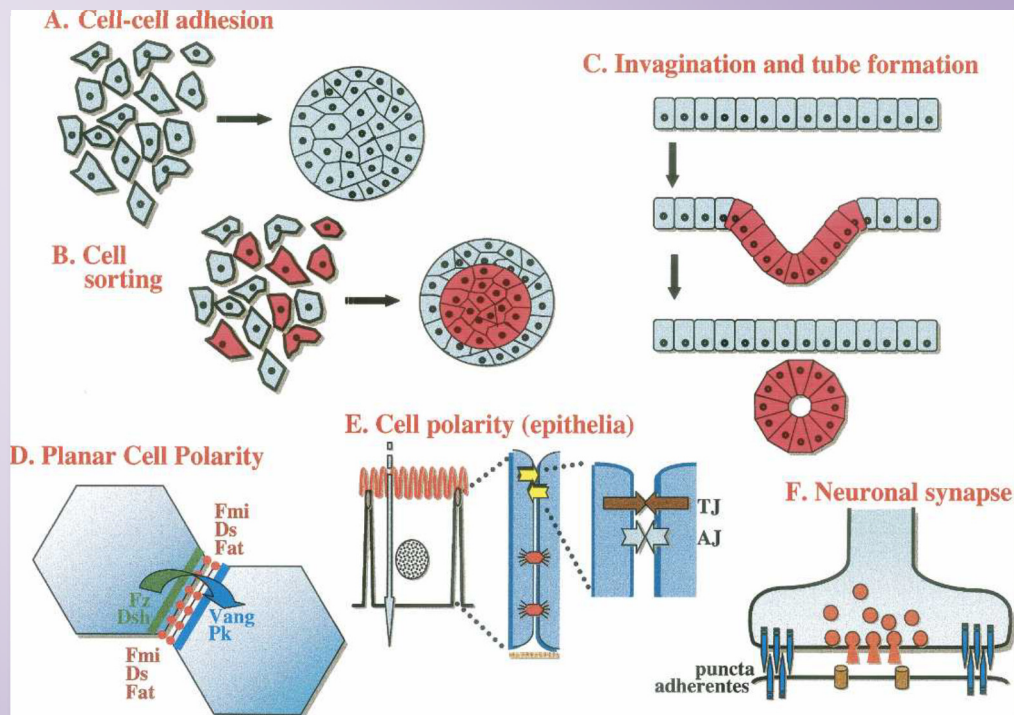
#### 4) Transition de cadhérines au cours du développement

La transition entre type de cadhérines est un événement majeur mais courant au cours du développement embryonnaire. La première de ces transitions de type de cadhérines a lieu lors de la gastrulation, les cellules du mésoderme expriment tout d'abord la E-cadhérine puis la N-cadhérine après avoir été internalisées (Stern, 2004) (Oda et al., 1998) (Hatta and Takeichi, 1986) (Thiery et al., 1984). Ce changement dans le répertoire de cadhérines entraîne *de facto* des modifications profondes dans la morphologie cellulaire. En effet, les cellules perdent leur forme épithéliale (caractérisée par une polarité apico-basale, présence de jonctions serrées, de desmosomes et d'une lame basale sous-jacente), se détachent du tissu d'origine, prennent une forme mésenchymateuse (ou fibroblastique) et acquièrent la capacité à migrer, ce phénomène est appelé la Transition Epithélium-Mésenchyme (TEM) (Thiery et al., 2009) (Duband, 2010). Ce mécanisme très important non seulement au cours du développement embryonnaire mais décrit lors de processus pathologiques tels que la formation de métastases tumorales sera développé plus tard.

Un autre exemple de transition de cadhérines a lieu lors la formation du système nerveux central. Au début des mouvements de neurulation, les futures cellules du neuroépithélium, de formes cuboïdes et organisées en épithélium simple, expriment la E-cadhérine. Après formation d'un tube neural, ces mêmes cellules changent de forme, deviennent fusiformes, allongées, expriment la N-cadhérine et s'organisent en épithélium pseudo-stratifié (Hatta and Takeichi, 1986) (Hatta et al., 1987) (Thiery et al., 1984). Mais contrairement à la gastrulation ou à la progression tumorale, il est à noter que cette transition de cadhérines n'est pas suivie d'une transition épithélium-mésenchyme, suggérant des mécanismes de régulation différents entre ces mécanismes morphogénétiques.

De plus, alors que la transition E-/N-cadhérine semble rapide et brutale lors de la gastrulation, la cinétique du changement de répertoire de cadhérines au cours de la neurulation n'est pas du tout connu !?

Notre premier projet a donc consisté à étudier très précisément l'expression des cadhérines-E, -N et -6B ainsi que celle de leurs régulateurs au cours du développement précoce de l'embryon d'oiseau. Nous avons ainsi analysé de manière très précise ces différents profils d'expression au cours de la gastrulation et lors de la neurogénèse précoce lors du développement d'oiseau.



**Figure 5 : Divers rôles des Cadhérines au cours du développement embryonnaire**

(A): les cadhérines sont mises en jeu dans l'adhérence intercellulaire ; (B) : l'expression par les cellules de différentes cadhérines ou de la même cadhérine à des niveaux d'expression différents induit un phénomène de tri cellulaire ; (C) : les changements dans le répertoire d'expression de cadhérines permet des mouvements tissulaires coordonnés conduisant à une ségrégation tissulaire observée lors de la neurulation ; (D) : Rôle dans la mise en place d'une polarité planaire ; (E) : Mise en place d'une polarité cellulaire. Les cadhérines classiques sont exprimées au niveau des jonctions adhérentes. Ces structures délimitent ainsi le pôle apical et baso-latéral de la cellule ; (F) : participe à la mise en place de l'espace synaptique (d'après Hableib et al.2007)

## **Chapitre II**

### ***La formation du système nerveux central des amniotes :***

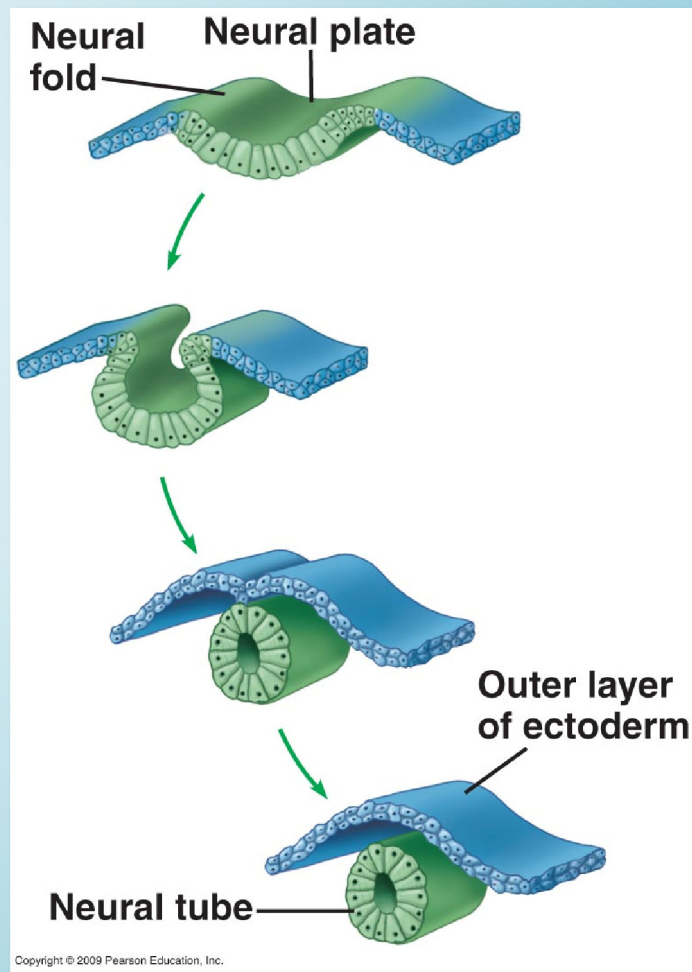
#### ***La neurulation***

##### **I. Définition et Généralités**

Le système nerveux central des vertébrés se forme au cours du développement à partir du tube neural, un épithélium pseudostratifié entourant une lumière centrale. Les mécanismes de formation du tube neural, appelé neurulation, ont fait l'objet de nombreuses investigations depuis des décennies et sur de très nombreux modèles animaux (l'oiseau-*Gallus gallus*, l'amphibien-*Xenopus laevis*, la souris *mus musculus* et plus récemment le poisson-*Danio rerio*).

La neurulation est un processus morphogénétique majeur du développement embryonnaire des chordés qui voit la transformation d'une région spécifique de l'ectoderme, entraînant la formation d'un tube neural et son internalisation (Figure 6) (Le Douarin et al., 1998) (Colas and Schoenwolf, 2001) (Copp et al., 2003) (Harrington et al., 2009). Elle débute alors que la gastrulation n'est pas achevée : chez l'oiseau, les plis neuraux apparaissent après 20-21 heures d'incubation (stade du développement Hamburger-Hamilton 6-HH6), de part et d'autre du neuroépithélium, délimitant la plaque neurale puis se rencontrent dans l'axe médian au niveau du cerveau moyen après 26 heures de développement pour former l'ébauche du tube neural. La fermeture progresse vers l'avant, isolant le cerveau antérieur vers 30-33 heures. La fermeture du tube neural s'achève au niveau caudal après 44 heures d'incubation (stade HH12-HH13) (Criley, 1969) (Schoenwolf and Franks, 1984) (Colas and Schoenwolf, 2001).





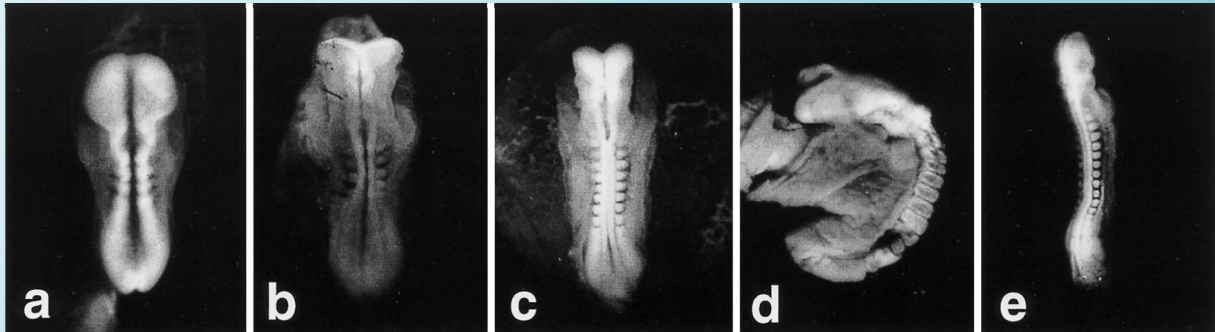
**Figure 6 : Représentation schématique des principales étapes de la neurulation**

1: stade plaque neurale; 2: fermeture du tube neural; 3: fusion des bourrelets neuraux; 4: internalisation du tube neural

Chez les amniotes, le tube neural à l'origine de la tête et du tronc antérieur (région des vertèbres cervicales) se forment par un mécanisme appelé « neurulation primaire », le tube neural postérieur (région des vertèbres lombo-sacrées) est issu d'une neurulation appelée « neurulation secondaire ». Cependant, il apparaît que les modes de neurulation au niveau macroscopique varient selon les espèces de vertébrés malgré des mécanismes cellulaires assez similaires. Il paraît ainsi important de garder à l'esprit que les mécanismes tissulaires et cellulaires observés chez chacun des modèles animaux ne sont représentatifs que de cette espèce donnée. Il faut donc être très prudent et ne pas céder trop facilement à la tentation de faire de généraliser à partir d'un seul organisme modèle. Les techniques de microscopie optique classique, de microscopie électronique à balayage combinées aux techniques de biologie moléculaire utilisées chez les modèles aviaires et murins ont ainsi permis d'avoir une vision globale et générale des mécanismes morphogénétiques mis en jeu lors de la neurulation

primaire et secondaire. A l'inverse, les techniques d'imagerie et de vidéomicroscopie chez l'embryon d'amphibien et de poisson ont récemment apporté une dimension temporelle au mécanisme de neurulation en permettant d'observer en direct la dynamique cellulaire et tissulaire au cours de ce processus.

Toutes ces études réalisées sur l'ensemble de ces modèles animaux peuvent ainsi permettre d'imaginer et de mieux comprendre la neurulation chez l'Homme. En effet, malgré les avancées fantastiques de l'imagerie médicale (Echographie et reconstruction en 3D à haute résolution), le développement humain reste encore très difficile à étudier. Chez l'Homme la neurulation débute à la fin de la 3<sup>ème</sup> semaine de développement (17-18 jours post-fécondation; stade Carnegie-CS10) et s'achève en fin de 6<sup>ème</sup> semaine (approximativement 28 jours post-fécondation ; stade CS12) (Figure 7) (O'Rahilly and Muller, 1994) (O'Rahilly and Muller, 2002). Même si pour certains « un tube est un tube », minimisant les mécanismes morphogénétiques de formation du tube neural et privilégiant la fin du processus, comment comprendre précisément l'étiologie des anomalies de fermeture du tube neural chez l'Homme, une des malformations les plus fréquentes du nouveau-né, concernent ainsi 1 à 2/1000 naissances viables ?



**Figure 7 : La neurulation au cours du développement Humain**

**a** : Embryon humain de 5 somites en début de stade Carnegie 10 (CS10). La plaque neurale a commencé à se soulever mais est encore ouverte le long de l'axe antéropostérieur (taille de l'embryon 2 mm); **b** : Embryon de 5 somites en fin de stade CS10. Les vésicules céphaliques sont maintenant bien déterminées et observables (proscéphale, mésencéphale et rhombencéphale), les bourrelets neuraux commencent à s'accoler au niveau du premier somite (taille de l'embryon 2,2 mm); **c** : Embryon de 10 somites (stade CS10 tardif). La fusion des bourrelets neuraux a commencé au niveau du premier somite. Le tube neural est encore bien ouvert au niveau très rostral et très caudal (longueur de l'embryon 2,8 mm) ; **d** : Embryon de 13 somites (stade CS 11). Le tube neural est encore ouvert au niveau du proscéphale et de la région lombo-sacrée ; **e** : Embryon de 14 somites (stade CS11). La fermeture du tube neural est quasiment finie mais les neuropores antérieur et postérieur sont encore aisément observables au niveau du proscéphale et au niveau du bourgeon caudal (taille de l'embryon 3,6 mm) (d'après Tomoko Nakatsu et al. 2000)

## II. La Neurulation dite « Primaire »

Chez les amniotes, au niveau anatomique, la formation du tube neural primaire ou neurulation primaire (ou neurulation pour le plus grand nombre) se fait en quatre étapes principales : formation de la plaque neurale, le « façonnage » (*shaping*) de la plaque neurale, la « courbure » (*bending*) avec formation d'une gouttière neurale avec des bourrelets neuraux et fusion de ces bourrelets neuraux (Figure 8).

La neurulation primaire commence avec la formation de la plaque neurale. Cette plaque apparaît lors d'un processus complexe que nous ne développerons pas, appelé induction neurale (Lemaire and Kodjabachian, 1996) (Tanabe and Jessell, 1996) (Gould and Grainger, 1997) (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1997) (Sasai and De Robertis, 1997) (Weinstein and Hemmati-Brivanlou, 1999) (Harland, 2000) (Jessell and Sanes, 2000) (Sheng et al., 2003). Cependant, pour résumer, de nombreuses études ont montré que l'induction neurale nécessite plus l'inhibition d'un programme de différenciation épidermique plutôt que la mise en place d'un programme pro-neural. Ces observations suggèrent ainsi que le destin, par défaut, de l'ectoderme est neural et le signal inhibiteur (molécules inhibitrices des BMPs ou des Wnts) est produit par le nœud de Hensen, l'équivalent chez l'oiseau du centre organisateur de Spemann des amphibiens.

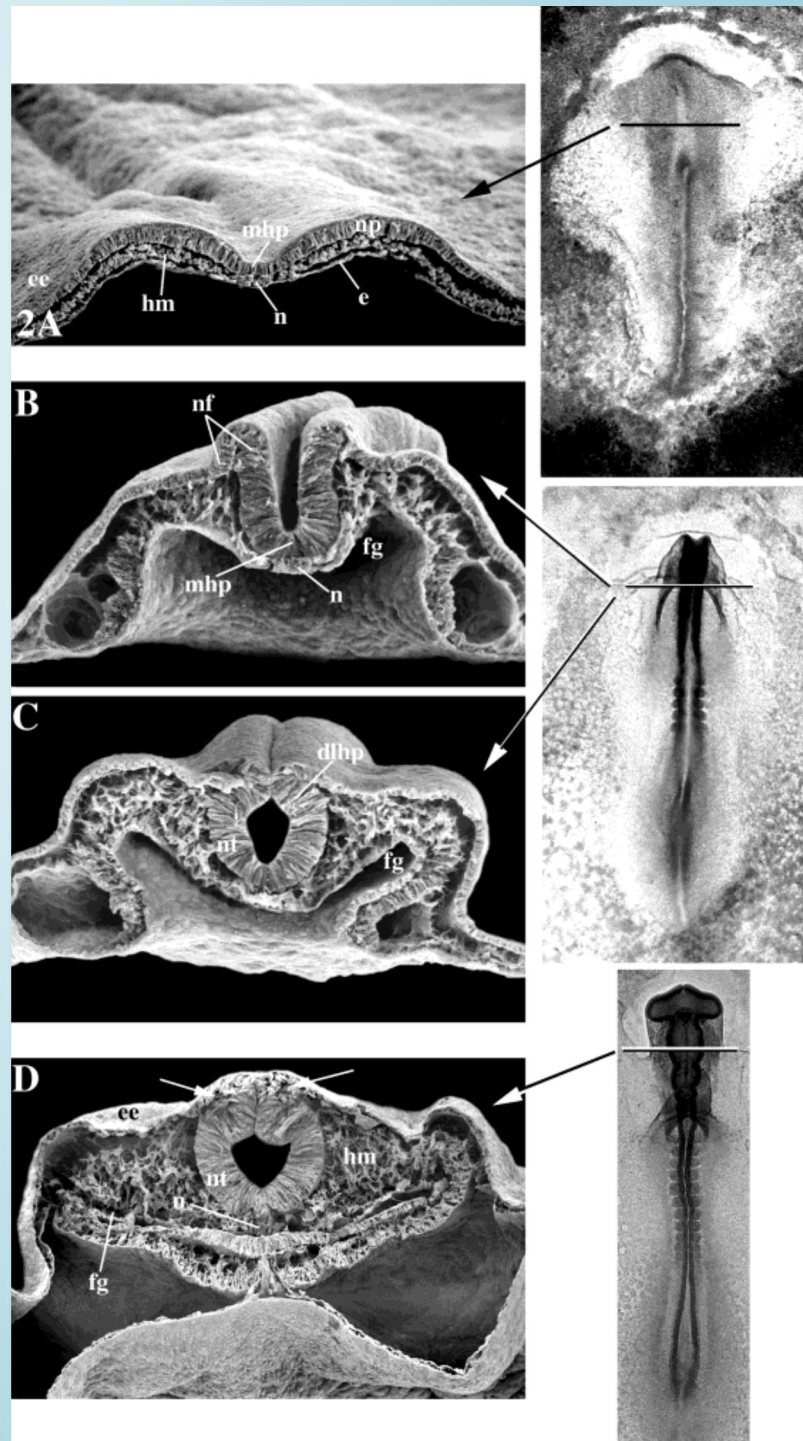
### 1) Formation de la plaque neurale

#### *a. Au niveau tissulaire*

L'induction neurale conduit à la formation d'une plaque neurale qui s'observe par un épaissement progressif de l'ectoderme de surface. La plaque neurale peut se former même si on l'isole de l'ectoderme l'entourant, démontrant ainsi qu'une fois l'ectoderme différencié en tissu neural, les modifications morphologiques nécessaires à la formation de la plaque neurale sont intrinsèques aux cellules de la plaque neurale et ne nécessitent pas la présence des tissus voisins (Schoenwolf et al., 1988) (Schoenwolf et al., 1989) (Figure 8 A).

#### *b. Au niveau cellulaire*

La formation de la plaque neurale chez les mammifères et l'oiseau, observable par un épaissement de l'ectoderme, est causée principalement par un allongement des corps cellulaires selon l'axe apico-basal. Les cellules nerveuses présomptives deviennent prismatiques (plus hautes que larges) alors que les cellules latérales de l'ectoderme restent

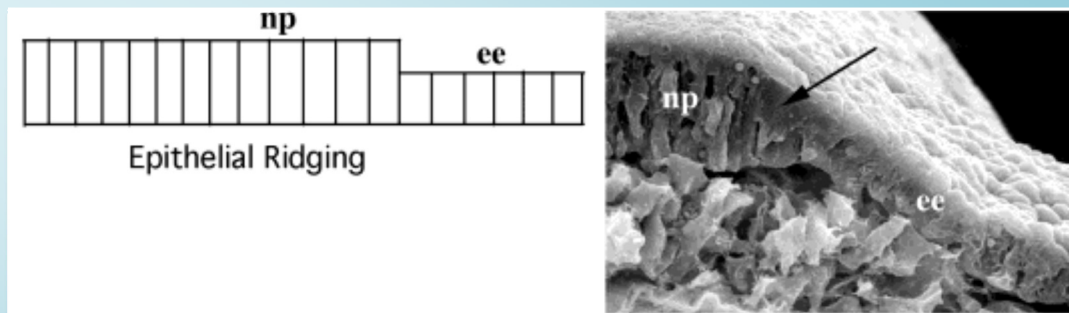


**Figure 8** : *La neurulation primaire lors du développement de l'embryon d'oiseau*

Observation en microscopie électronique à balayage de coupes d'embryons d'oiseau (A-D) approximativement au niveau du mésencéphale au cours de la neurulation primaire.

**A** : Stade plaque neurale. L'ectoderme s'épaissit et commence à se soulever, le point de fracture médian est déjà observable ; **B** : Stade gouttière neurale. L'enroulement de la plaque est bien avancé ; **C** : Stade quasi Tube Neural. Les bourrelets neuraux sont apposés mais n'ont pas encore fusionné ; **D** : Stade Tube Neural. Les bourrelets neuraux ont fusionné et forment maintenant le toit, ou plaque alaire, du tube neural. L'ectoderme recouvre totalement cette structure (d'après Schoenwolf (2001)).

pavimenteuses (plus larges que hautes, comme des pavés) (Figure 9) (Colas and Schoenwolf, 2001).

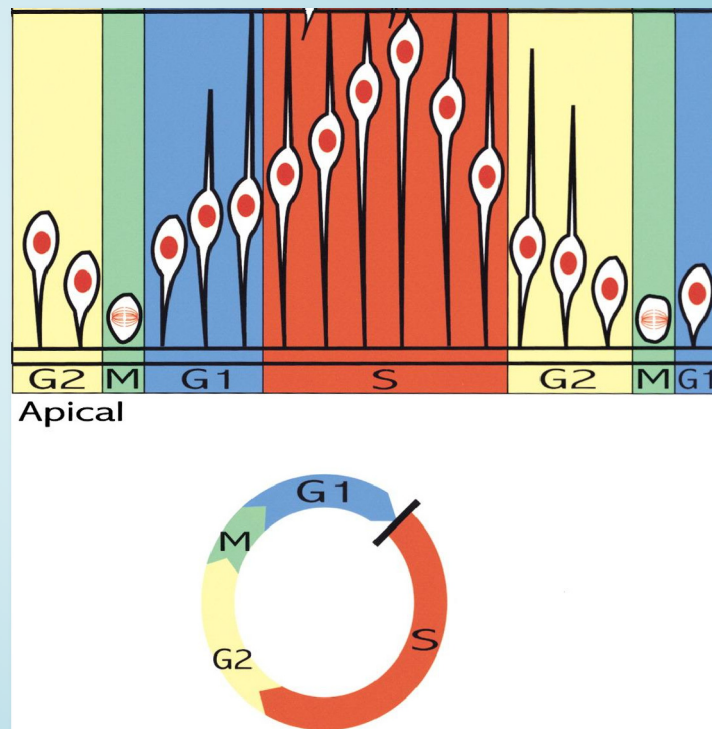


**Figure 9 :** *Modifications de la forme des cellules au début de la neurulation*

Juste après l'induction neurale apparaît une plaque observable par un épaissement de l'ectoderme. Lors de la formation de cette plaque neurale, les cellules nerveuses présomptives deviennent prismatiques (plus hautes que larges) alors que les cellules latérales de l'ectoderme restent pavimenteuses (plus larges que hautes, comme des pavés) (d'après Colas & Schoenwolf, 2001)

Chez les vertébrés « supérieurs », la plaque neurale est pseudostratifiée : toutes les cellules du neuroépithélium sont en contact avec la lame basale mais seule la position des noyaux varie selon l'axe apico-basal. Cette variabilité donne la fausse impression en coupe histologique d'un épithélium pluristratifié. Les cellules du neuroépithélium se divisent tout au long de la neurulation (Smith and Schoenwolf, 1987) (Smith and Schoenwolf, 1988). Ainsi, la phase S du cycle cellulaire (synthèse d'ADN) a lieu pour chaque cellule du neuroépithélium lorsqu'elle se situe au niveau de la lame basale puis ces cellules s'arrondissent et se divisent lors de la mitose lorsqu'elles sont au niveau apical de l'épithélium (Figure 10). Ce mouvement du noyau des cellules entre le pôle basal (Phase S) et le pôle apical (mitose) est très stéréotypé. Il concerne l'ensemble des cellules du tube neural et dure 8-10 heures (Watterson, 1965).

L'allongement des cellules du neuroépithélium selon l'axe apico-basal nécessite un remodelage du cytosquelette de microtubules, que ce soit pour initier le changement morphologique ou le stabiliser, ainsi que des changements dans la variété de jonctions intercellulaires (Schoenwolf and Smith, 1990).



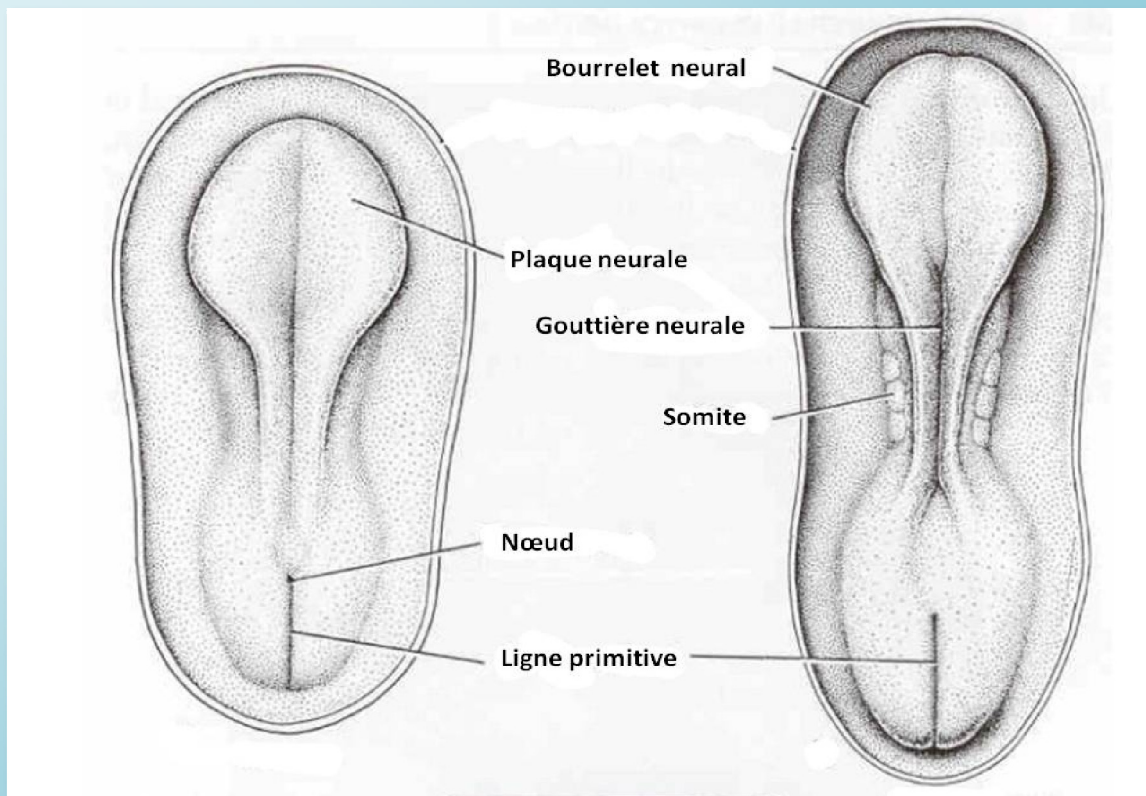
**Figure 10 :** *Mouvement du noyau des cellules du neuroépithélium au cours du cycle Cellulaire*

Les cellules du neuroépithélium se divisent tout au long de la neurulation. La phase S du cycle cellulaire (synthèse d'ADN) a lieu pour chaque cellule du neuroépithélium au niveau de la lame basale puis ces cellules s'arrondissent et se divisent lors de la mitose lorsqu'elles sont au niveau apical de l'épithélium. Ce mouvement du noyau des cellules entre le pôle basal (Phase S) et le pôle apical (mitose) est très stéréotypé, concerne l'ensemble des cellules du tube neural et dure 8-10 heures (d'après Burstyn-Cohen T et al.2002)

## 2) « Façonnage » ou « Modelage » (*shaping*) de la plaque neurale

### a. Au niveau tissulaire

La formation de la plaque neurale, après induction neurale, se distingue de l'ectoderme par une zone d'épaississement. Ces transformations de l'ectoderme s'accompagnent non seulement d'un épaississement dorso-ventral, mais également d'un rétrécissement médio-latéral et d'une extension cranio-caudale de la plaque neurale (Jacobson and Gordon, 1976). Ces modifications de forme de la plaque représentent un mouvement d'extension-convergence (Keller et al., 1992a) (Keller et al., 2000). Il faut toutefois noter que ces modifications n'affectent pas de façon homogène la plaque neurale. Ainsi la portion caudale de la plaque neurale subit des modifications plus importantes que l'extrémité rostrale. Il s'ensuit une déformation de la plaque qui est initialement arrondie et prend une forme de raquette à manche caudal. La partie antérieure correspond au futur cerveau alors que la portion plus effilée correspond à la future moelle épinière (figure 11).



**Figure 11** : *Les modifications de la plaque neurale*

La portion caudale de la plaque neurale subit des modifications plus importantes que l'extrémité rostrale. La plaque neurale, initialement arrondie, prend une forme de raquette à manche caudal. La partie antérieure correspond au futur cerveau alors que la portion plus effilée correspond à la future moelle épinière. (<http://www.md.ucl.ac.be/didac/anat110/Organogenesis.html>)

Des expériences d'ablations de tissus ont montré que le « façonnage » de la plaque neurale est uniquement causé par le comportement et le devenir des cellules neurales présomptives. Ainsi, les changements de la morphologie de la plaque neurale continue malgré l'ablation des tissus adjacents (Ectoderme latéral, mésoderme et endoderme) ou des structures caudales (la ligne primitive) (Schoenwolf et al., 1988) (Schoenwolf et al., 1989) (Moury and Schoenwolf, 1995). Cependant, bien que les mécanismes impliqués lors de la neurulation et de la gastrulation ne soient pas directement liés et peuvent même être expérimentalement dissociés par des expériences d'ablation, la formation complète, totale et l'extension de la région caudale de la plaque neurale nécessitent une régression normale de la ligne primitive (donc une gastrulation normale).

*b. Au niveau cellulaire*

Comme décrit plus tôt, le façonnage de la plaque neurale nécessitent deux événements cellulaires : allongement selon l'axe dorso-ventral et rétrécissement selon l'axe gauche-droite du corps cellulaire. Ces phénomènes morphologiques sont essentiellement dus à une

réorganisation du cytosquelette d'actine et de microtubules. Ainsi, l'épaississement de la plaque neurale est causé par l'élongation apico-basale des cellules neurales présomptives. De plus, cette élongation cellulaire accompagnée d'un phénomène d'intercalation médio-latérale des cellules de la plaque neurale va entraîner *de facto* un rétrécissement du corps cellulaire et leur allongement (Schoenwolf and Powers, 1987) (Schoenwolf and Alvarez, 1989).

Les divisions cellulaires vont également jouer sur le changement de morphologie cellulaire. En effet, les cellules neurales présomptives se divisent tous les 8 heures tout au long de la neurulation (Smith and Schoenwolf, 1987) et plus de la moitié des divisions des cellules de la plaque neurale se fait parallèlement à l'axe gauche-droite. Les cellules-filles issues de ces mitoses orientées se mettent ainsi en place dans le sens de l'allongement dorso-ventral de la plaque et non dans le sens de la largeur (Sausedo et al., 1997).

### 3) « Courbure » ou « Enroulement » (*bending*) de la plaque neurale

#### *a. Au niveau tissulaire*

L'enroulement de la plaque neurale est un processus complexe qui fait intervenir des mécanismes cellulaires et moléculaires différents selon le niveau rostro-caudal. Le soulèvement et l'enroulement débutent par la formation des bourrelets neuraux aux frontières latérales entre plaque neurale et ectoderme non neural de surface puis l'élévation et enfin la convergence de ces bourrelets neuraux au niveau médian de l'embryon centrée sur la notochorde. L'élévation des bourrelets neuraux entraîne la formation d'une véritable gouttière neurale qui va devenir la future lumière du système nerveux central après fusion de la plaque neurale (Figure 8B).

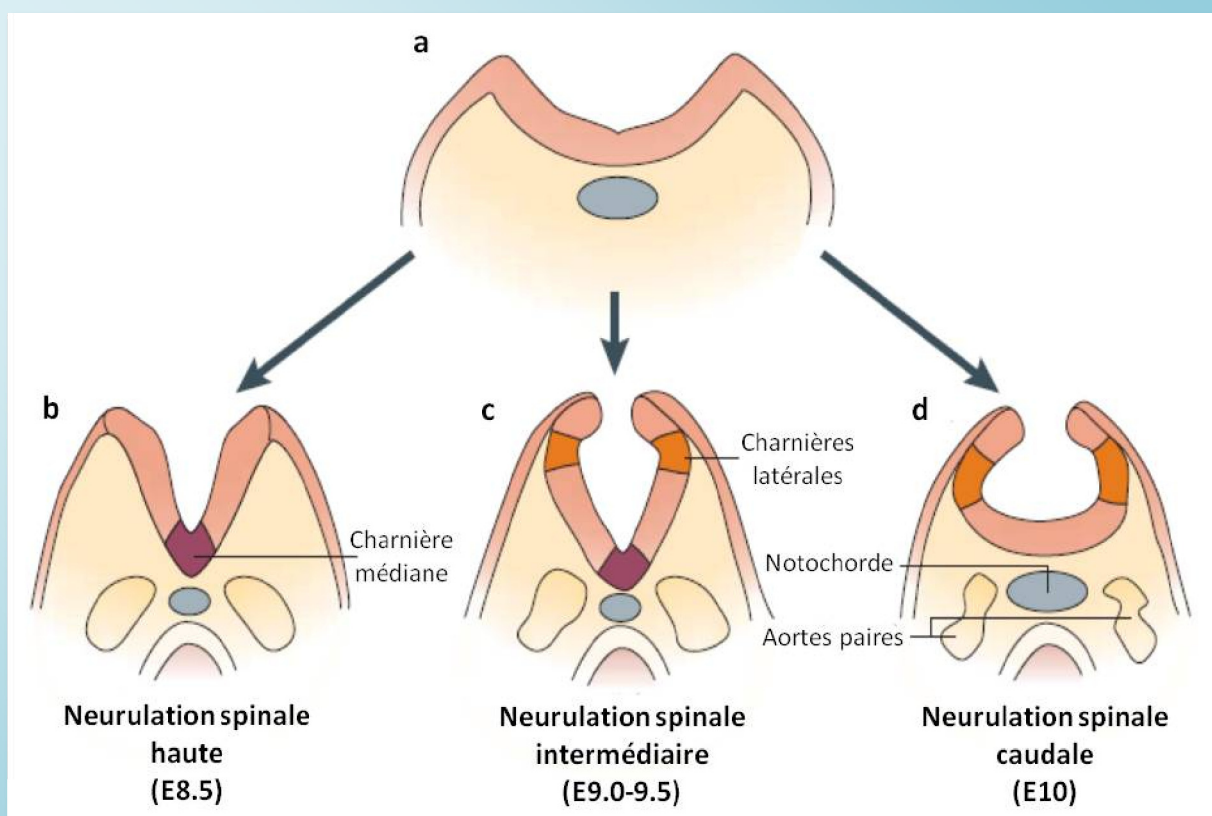
La région d'initiation de l'enroulement de cette plaque neurale varie selon les espèces. Lors du développement embryonnaire d'oiseau, l'élévation et la fusion des bourrelets neuraux ont lieu au niveau du mésencéphale (Figure 8C) puis progresse vers les régions antérieures et postérieures (Schoenwolf and Franks, 1984) (Van Straaten et al., 1996). Lors du développement embryonnaire chez la souris et l'Homme, le début de l'enroulement et de la fusion de la plaque neurale a lieu respectivement au niveau de la région de la jonction rhombencéphale/vertèbres cervicales (Copp et al., 2003) et au niveau du mésencéphale/rhombencéphale (O'Rahilly and Muller, 2002).

Cet enroulement de la plaque neurale sur elle-même s'effectue grâce à trois régions faisant office de charnières :



- dans la région médiane, la charnière médiane, située au-dessus de la plaque préchordale et de la notochorde, s'étend tout le long de l'axe rostro-caudal de la plaque neurale. Cette formation est secondaire à une induction venant du mésoderme axial sous-jacent (la notochorde).

- dans les régions latérales de la plaque neurale, de part et d'autre de la charnière médiane et des bourrelets neuraux, les charnières latérales dont la position et le nombre varient en fonction de l'axe antéro-postérieur et de l'espèce (Figure 12) (Schoenwolf and Smith, 1990).



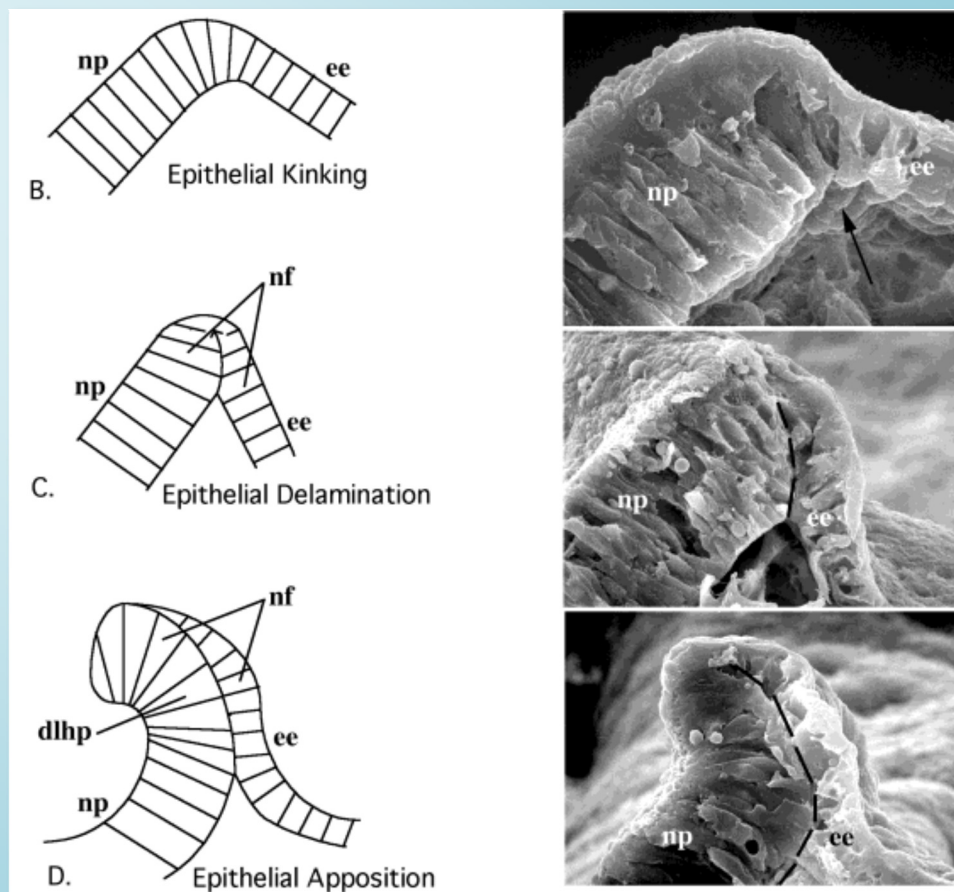
**Figure 12** : Les trois modes de neurulation spinale lors du développement murin

L'enroulement de la plaque neurale lors du développement de l'embryon de souris (a) nécessite la formation de zones charnières ; dans la partie haute de la moelle épinière apparaît une charnière médiane (b). Puis dans une zone intermédiaire de la moelle épinière apparaissent les charnières dorso-latérales (c). Enfin, dans la partie caudale de la moelle spinale, juste avant la fermeture du neuropore postérieur, la plaque neurale s'enroule à l'aide des charnières latérales sans nécessité de charnière médiane (d). (d'après Copp AJ 2003)

Contrairement à la formation de la plaque neurale qui se fait indépendamment des tissus avoisinants, de nombreuses études ont montré que l'ectoderme latéral non-neural est suffisant et nécessaire à l'enroulement de la plaque neurale (Alvarez and Schoenwolf, 1992) (Hackett

et al., 1997). A ce niveau, les cellules s'étendent, s'allongent et s'intercalent, créant une force qui pousse les cellules de la plaque neurale, favorise la formation et le soulèvement des bourrelets neuraux puis l'enfoncement de la plaque au niveau médian centré sur la notochorde.

Les bourrelets neuraux, en synergie avec les forces générées par l'ectoderme non-neural, jouent un rôle crucial lors de l'enroulement de la plaque neurale. Ces structures particulières sont constituées de cellules à morphologie neuroépithéliale recouvertes de cellules ectodermiques non neurales. Au niveau du futur cerveau, la formation des bourrelets neuraux se fait en plusieurs étapes : courbure épithéliale, pseudo-cassure entre les tissus et apposition (Figure 13) (Lawson et al., 2001). La structure et la position d'interface entre neuroépithélium et ectoderme non neural rendent les bourrelets neuraux pertinents et nécessaires à transmettre les forces générées par l'expansion de l'ectoderme latéral.



**Figure 13 :** *Formation des bourrelets neuraux lors de l'enroulement de la plaque neurale*

La formation des bourrelets neuraux se fait en plusieurs étapes : courbure épithéliale (A), pseudo-cassure entre les tissus neuraux et ectodermiques (B) et apposition de l'ectoderme (C). (d'après Colas & Schoenwolf 2001)

*b. Au niveau cellulaire*

L'élévation nécessite à la fois des zones de pliure et l'enroulement à proprement parlé du tissu neural. Les pliures de la plaque neurale sont les conséquences de changements morphologiques majeurs des cellules situées dans les régions des charnières : ces cellules perdent leur caractère prismatique pour adopter une forme conique tronquée à leur partie apicale (rétrécissement au niveau apical et élargissement au niveau basal du corps cellulaire) (Figure 14). La contraction apicale des cellules des charnières semble être causée par un anneau de microfilaments d'actine située à l'apex des cellules neurales présomptives (Lee and Nagele, 1985) (Ybot-Gonzalez and Copp, 1999) (Zolessi and Arruti, 2001). Cependant, le rôle précis du cytosquelette d'actine dans le changement de morphologie cellulaire et les mouvements de la plaque neurale est encore sujet à controverse. Des expériences de perturbation du cytosquelette d'actine par l'utilisation de cytochalasine D (un puissant inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine) sur des embryons de rongeurs mis en culture entraînent des exencéphalies (Morriss-Kay and Tuckett, 1985) (Ybot-Gonzalez and Copp, 1999). Ces observations suggèrent ainsi que l'élévation et l'apposition des bourrelets neuraux au niveau du premier site de fermeture du tube neural, futur cerveau, dépendent du cytosquelette d'actine. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle du cytosquelette d'actine lors de l'élévation restent encore peu connus. Dans les régions plus caudales, les perturbations du cytosquelette d'actine n'entravent pas la fermeture du tube neural de la future moelle épinière (Ybot-Gonzalez and Copp, 1999). De plus, de nombreuses souris comportant des mutations pour des gènes du cytosquelette ne montrent que des défauts de fermeture du tube neural du futur encéphale (Copp et al., 2003) (Greene and Copp, 2009) même si des cas de *spina bifida*, anomalies de fermeture du tube neural de la future moelle épinière, sont à noter (Hildebrand and Soriano, 1999) (Wu et al., 1996). Il apparaît cependant que la régulation du cytosquelette d'actine-myosine semble nécessaire à la fermeture de l'intégralité de la plaque neurale selon l'axe rostro-caudal mais apparaît plus critique pour la formation du tube neural encéphalique que celle de la moelle épinière.

La formation des bourrelets neuraux nécessite de nombreux changements dans la morphologie cellulaire (Figure 13) (Martins-Green and Erickson, 1986) (Martins-Green, 1988) (Fernandez Caso et al., 1992) (Lawson et al., 2001). Tout d'abord une élongation selon l'axe apico-basal des cellules du neuroépithélium puis, lors de la courbure du bourrelet, les cellules subissent une contraction de leur partie basale et un épaississement de la partie apicale. La pseudo-cassure nécessite la mise en place d'une lame basale commune à l'interface entre tissu neural

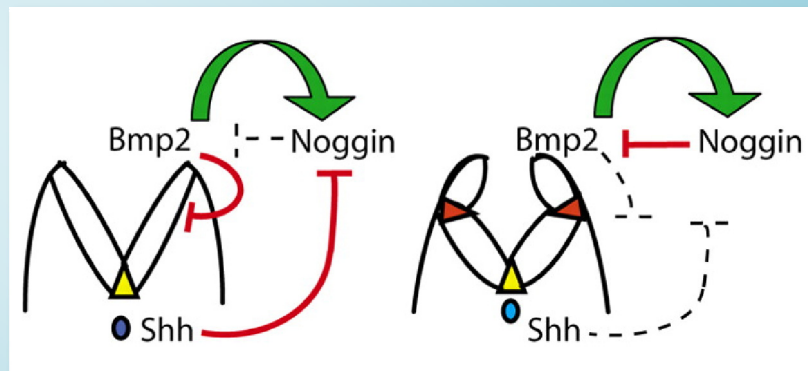
et ectoderme latéral. Cette mise en place d'une matrice extracellulaire commune se poursuit lors de l'apposition de l'ectoderme au bourrelet neural et s'étend plus latéralement. Un espace entre les tissus se crée progressivement lors de l'élévation des bourrelets neuraux mais l'événement cellulaire majeur reste cependant le changement apparent de polarité apico-basale des cellules neurales présumptives dû au phénomène d'enroulement et d'internalisation : le pôle apical de toutes les cellules se situe vers la lumière du tube neural (en adéquation avec la mise en place de la lame basale qui entoure la quasi-intégralité du tube neural).

*c. Au niveau moléculaire*

La formation des charnières médiane et latérales, essentielle à l'enroulement et à la fermeture de la plaque neurale, est régulée par des signaux antagonistes sécrétés au niveau dorsal et ventral par les tissus extra-neurax. En effet, la formation de la charnière médiane est secondaire à une induction de la notochorde (Smith and Schoenwolf, 1989) (Davidson and Keller, 1999).

Sonic Hedgehog (Shh), molécule sécrétée par la notochorde, joue un rôle complexe lors de ce processus. Cette molécule est nécessaire à la formation de la charnière médiane mais va inhiber celle des charnières latérales (Ybot-Gonzalez et al., 2002). En effet, les embryons dont la notochorde a été excisée présentent des charnières latérales tout le long de l'axe antéro-postérieure. L'expression de Shh va bloquer la formation des charnières latérales en inhibant Noggin, une molécule antagoniste de la voie de signalisation induite par les membres de la famille des *Bone Morphogenetic Protein* (BMP). BMP-4 mais surtout BMP-2 sont exprimées par l'ectoderme de surface recouvrant le tube neural. L'expression de BMP-2, comme celle de Shh, va empêcher la formation des charnières latérales. Ainsi, la sécrétion de Noggin, produite par les cellules des bourrelets neuraux, va permettre la formation des charnières latérales en inhibant la signalisation induite par BMP-2 (Ybot-Gonzalez et al., 2007). Lors du développement murin, le gradient de Shh le long de l'axe antéro-postérieur va jouer sur la formation des charnières latérales : une forte expression de Shh par la notochorde au niveau du tronc antérieur conduit à l'absence des charnières latérales par inhibition de Noggin tandis qu'une expression plus faible au niveau du tronc moyen va permettre la formation de ces charnières induite par une levée d'inhibition de Noggin (Figure 14) (Ybot-Gonzalez et al., 2007). Cependant le rôle précis de la signalisation induite par les BMPs sur la formation des charnières n'est pas totalement compris. Des travaux récents ont tout de même montré, chez

l'embryon d'oiseau, que l'atténuation du signal BMP est suffisante et nécessaire à la formation de la charnière médiane. De plus, la modulation de la signalisation BMP va jouer sur la fermeture du tube neural en perturbant la polarité apico-basale des cellules neurales présumptives (Eom et al., 2011).



**Figure 14** : *Formation des charnières de la plaque neurale selon l'axe antéro-postérieur*

La formation des charnières médianes et latérales, essentielle à l'enroulement et à la fermeture de la plaque neurale, est régulée par des signaux antagonistes sécrétés au niveau dorsal (BMPs) et ventral (Shh) par les tissus extra-neuraux et par la régulation de l'expression de Noggin par les cellules des bourrelets neurales eux-mêmes (d'après Ybot-Gonzalez et al 2007)

#### 4) Fusion des bourrelets neurales et fermeture du tube neural

##### a. *Au niveau tissulaire*

Le soulèvement de la plaque neurale entraîne inévitablement l'apposition des bourrelets neurales dans la partie dorso-médiane de l'embryon (Figure 8C). Les bourrelets neurales rentrent ainsi en contact, vont fusionner pour former le toit du tube neural comportant ainsi une lumière centrale préfigurant les futurs ventricules cérébraux et le canal de l'épendyme dans lequel circulera le liquide cérébro-spinal. Ce tube neural néo-formé s'individualise enfin et va être entièrement recouvert par l'ectoderme de surface (Figure 8D) (Colas and Schoenwolf, 2001). La fermeture du tube neural débute à différents niveaux selon l'axe rostro-caudal et selon l'espèce : chez l'embryon d'oiseau, le point initial de fusion des bourrelets neurales a lieu au niveau du mésencéphale à un peu plus d'un jour de développement (Schoenwolf, 1979) (Schoenwolf and Franks, 1984) (Van Straaten et al., 1996); chez la souris, la fusion débute au niveau de la jonction rhombencéphale/futures vertèbres cervicales (site de fusion 1) (Figure 15) à 8 jours de développement (Greene and Copp, 2009); chez l'Homme, elle s'opère plus rostralement, au niveau du

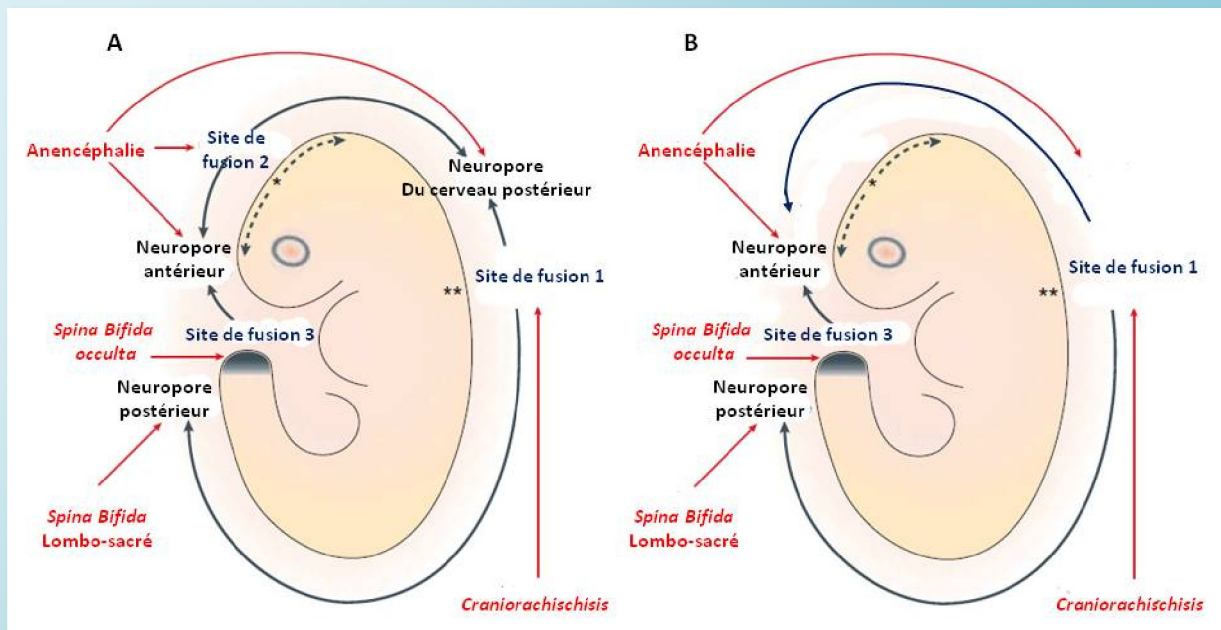
mésencéphale/rhombencéphale (site de fusion 1) (Figure 15) au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine de développement (O'Rahilly and Muller, 2002). Contrairement à une idée reçue, la fermeture du tube neural primaire ne se fait pas de manière continue comme une fermeture éclair (Copp et al., 1990) (Van Straaten et al., 1996) mais progresse de manière discontinue vers la partie rostrale pour former le futur encéphale et vers la partie caudale pour former la future moelle épinière (Colas and Schoenwolf, 2001) (Copp et al., 2003).

Chez la souris, plusieurs sites de fusion apparaissent au 9<sup>ème</sup> jour de développement, au niveau du prosencéphale/mésencéphale (site de fusion 2) et au niveau le plus rostral du prosencéphale (site de fusion 3) (Figure 15) (Greene and Copp, 2009). Les régions de la plaque neurale encore ouvertes entre les sites d'initiation de fusion des bourrelets sont appelées « neuropores » : le neuropore du cerveau postérieur (entre les sites de fusion 1 et 2) ; le neuropore antérieur (entre les sites 2 et 3). Le phénomène de fusion des bourrelets se poursuit jusqu'à rétrécissement, fermeture des neuropores et formation d'un tube neural totalement fermé et internalisé (à 9.5 jours de développement embryonnaire). La neurulation de la plaque neurale spinale continue caudalement à partir du site de fusion 1 et s'achève par la fermeture du neuropore postérieur à 10 jours de développement embryonnaire marquant ainsi la fin de la neurulation primaire.

Chez l'Homme, la fermeture du tube neural se fait également de manière discontinue (Figure 7 et 15) et des sites d'initiation de fusion analogues au site 1 et 3 observés chez l'embryon murin ont été décrits (O'Rahilly and Muller, 1994) (O'Rahilly and Muller, 2002). Cependant, l'initiation de la fermeture du tube neural de l'embryon humain a lieu légèrement plus rostralement, au niveau mésencéphale/rhombencéphale (O'Rahilly and Muller, 2002). Il a été également observé un site très rostral de fusion des bourrelets (site de fusion 3) similaire à celui de l'embryon de souris (O'Rahilly and Muller, 2002). Cependant la présence du site de fermeture 2 est très controversée. Ce site de fusion a été décrit dans certaines études (Van Allen et al., 1993) mais pas par d'autres (O'Rahilly and Muller, 2002). La fermeture du neuropore antérieur a lieu à 25 jours de développement embryonnaire et celui du neuropore postérieur, qui achève ainsi la neurulation primaire, a lieu entre le 26<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour post-fécondation.

Parallèlement à l'enroulement de la plaque neurale en tube suivant l'axe dorso-ventral de l'embryon, on assiste à un allongement d'ensemble du tube neural suivant l'axe antéro-postérieur qui résulte essentiellement d'un processus de convergence et d'extension

maintenant bien caractérisé (Ybot-Gonzalez et al., 2007). Une troisième population de cellules, les Cellules de la Crête Neurale (CCN), apparaît lorsque les bourrelets neuraux s'élèvent et convergent (chez l'embryon de souris et l'homme) et après la fusion (chez l'embryon d'oiseau) (Le Douarin and Kalchek, 1999) (Duband, 2006) (Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008) (Betancur et al., 2010). Nous reviendrons sur cette population de cellules si particulière ultérieurement.



**Figure 15 : Schémas des sites d'initiation de fermeture du tube neural de mammifères et pathologies associées**

Chez l'embryon murin (A), la fermeture du tube neural commence à l'interface entre cerveau postérieur et les premières vertèbres cervicales (site de fusion 1) et se poursuit rostralement et caudalement (flèches noires). Lors du développement humain, la fermeture du tube neural débute au niveau du rhombencéphale (B). Un défaut de fermeture du site 1 conduit au *Craniorachischisis*. Un deuxième site de fermeture (site de fusion 2) apparaît à la jonction du cerveau antérieur et moyen chez la souris (A). Cependant ce site n'a pas été observé chez l'Homme (B). Un troisième site de fermeture (site de fusion 3) est également observable à la limite très rostrale du cerveau antérieur chez l'embryon de souris et également chez l'Homme. La progression de la fermeture du tube neural depuis ces différents sites d'initiation entraîne un rétrécissement et la fermeture des neuropores antérieur et du cerveau postérieur (pointes des flèches noires). Des défauts de fermeture de ces neuropores conduisent à des anencéphalies. La neurulation se poursuit caudalement à partir du site d'initiation de fermeture 1 et s'achève avec la fermeture du neuropore postérieur. Les défauts de fermeture de ce neuropore entraînent des *spina bifida*. (modifié de Greene DEN and Copp AJ 2009)

#### b. Au niveau cellulaire

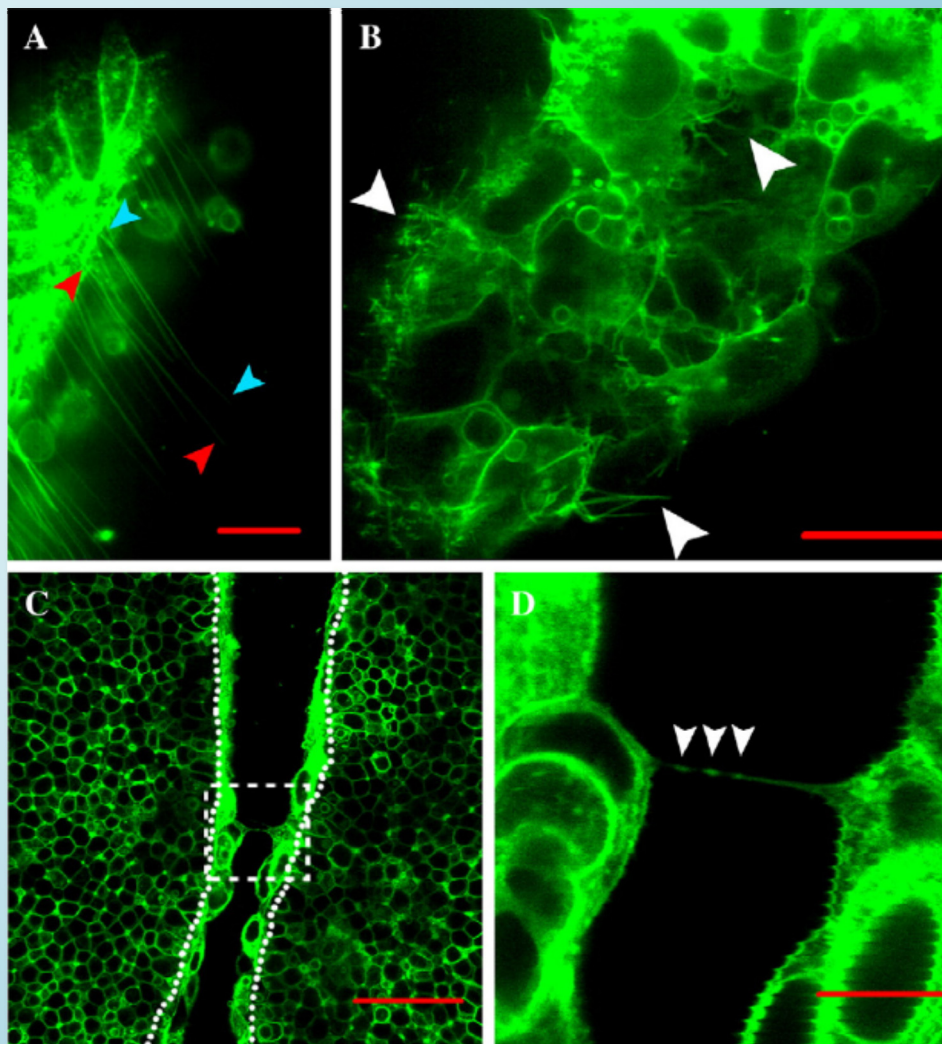
Les événements cellulaires mis en jeu lors de cette ultime étape de la neurulation sont peu connus en comparaison des étapes précédentes. Cependant, des études assez anciennes ont pu

montrer que les cellules à l'apex des bourrelets neuraux forment des protrusions cellulaires ressemblant à des filopodes (Geelen and Langman, 1979). De superbes travaux de videomicroscopie en temps réel réalisés sur des embryons de souris en culture par le laboratoire de Lee Niswander ont permis d'avoir une vision beaucoup plus précise du phénomène. En effet, les cellules de l'ectoderme non-neural recouvrent complètement les bourrelets neuraux, puis certaines de ces cellules ectodermiques vont subir des changements morphologiques drastiques afin de projeter des filopodes et créer ainsi un véritable « échafaudage cytoplasmique » provisoire de part et d'autre des bourrelets neuraux. Les cellules des bourrelets neuraux juxtaposés vont ensuite émettre de courtes et flexibles extensions cytoplasmiques afin de créer un véritable « pont » reliant physiquement par l'action de molécules d'adhérence (NCAM) les deux bords du fossé inter-bourrelet (Figure 16) (Pyrgaki et al., 2010).

De plus, les cellules du neuroépithélium connaissent un changement dans le répertoire des cadhérines exprimées à leur surface : elles expriment la E-cadhérine pendant les phases précoces de la neurulation et expriment la N-cadhérine une fois le tube neural fermé (Hatta et al., 1987) (Thiery et al., 1984). Ce changement dans l'expression des cadhérines peut probablement avoir des influences sur la fermeture du tube neural. Les souris mutées homozygotes pour la N-cadhérine (*N-cad -/-*) ne présentent pas de défauts de fermeture du tube neural malgré une morphologie en zig-zag due à des anomalies de formation et d'épithélialisation du mésoderme paraxial suggérant un rôle mineur de cette molécule d'adhérence dans la fermeture du tube neural (Radice et al., 1997). Au contraire, la répression de la E-cadhérine semble être nécessaire à la fusion des bourrelets neuraux. En effet, les souris mutées homozygotes pour *ZEB-2/SIP-1* (*ZEB-2 -/-*), un facteur de transcription réprimant l'expression de la E-cadhérine, présentent des défauts sévères de fermeture du tube neurale au niveau du mésencéphale. En effet, la plaque neurale de ces souris se soulève (présence d'une charnière centrale) mais il n'y a pas de fusions des bourrelets neuraux (Van de Putte et al., 2003).

Il semble également que d'autres éléments cellulaires, en plus des modifications morphologiques impliquant le cytosquelette, la régulation de la polarité apico-basale ou de l'adhérence cellulaire sélective, rentrent en jeu dans la fermeture du tube neural. Le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose des cellules des bourrelets neuraux semblent en effet important lors de la fusion des bourrelets neuraux. Un phénomène massif d'apoptose ou au contraire pas assez de mort cellulaire peut conduire à des défauts de fermeture





**Figure 16 :** *Les extensions cytoplasmiques émises par les cellules ectodermiques forment un véritable échafaudage favorisant la fusion des bourrelets neuraux*

Images de vidéomicroscopie d'embryons de souris en culture montrant l'apposition des bourrelets neuraux au niveau de la région du cerveau moyen. (A) et (B) : De nombreuses et longues projections cytoplasmiques de cellules de l'ectoderme non-neural d'un bourrelet neural recouvrant le fossé et joignant ainsi le bourrelet neural opposé au cours du rapprochement de ceux-ci (échelle = 20  $\mu\text{m}$ ); (C) : Véritables ponts cellulaires réalisés par les cellules de l'ectoderme non-neural joignant les deux bourrelets neuraux juxtaposés (échelle = 50  $\mu\text{m}$ ) ; (D) : Agrandissement mettant en évidence un de ces ponts cellulaires (échelle = 10  $\mu\text{m}$ ). (d'après Pyrgaki C et al. 2010)

du tube neural céphalique (Weil et al., 1997) (Yamaguchi et al., 2011). Des travaux récents ont également mis en évidence un rôle crucial des Proteinase-Activated Receptor (PARs) dans la fermeture du tube neural (Camerer et al., 2010). Les PARs constituent une nouvelle famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. L'activation de ces récepteurs se fait de manière irréversible par clivage au niveau d'un site spécifique de leur partie extracellulaire N-terminale par une protéase à sérine ; lors de la neurulation il s'agit

d'une protéase transmembranaire, la matriptase. Ce clivage génère ainsi une nouvelle extrémité N-terminale qui se lie au récepteur au niveau de la deuxième boucle extracellulaire et joue ainsi le rôle de ligand intramoléculaire (Macfarlane et al., 2001) (Ossovskaya and Bunnnett, 2004). Les souris mutées pour les gènes codant pour les PAR-1 et PAR-2 (souris double KO PAR1-/- // -PAR2-/-) comportent des défauts de fermeture du tube neural encéphalique et présentent des exencéphalies (forme embryonnaire des anencéphalies) au niveau du cerveau moyen et postérieur (Camerer et al., 2010).

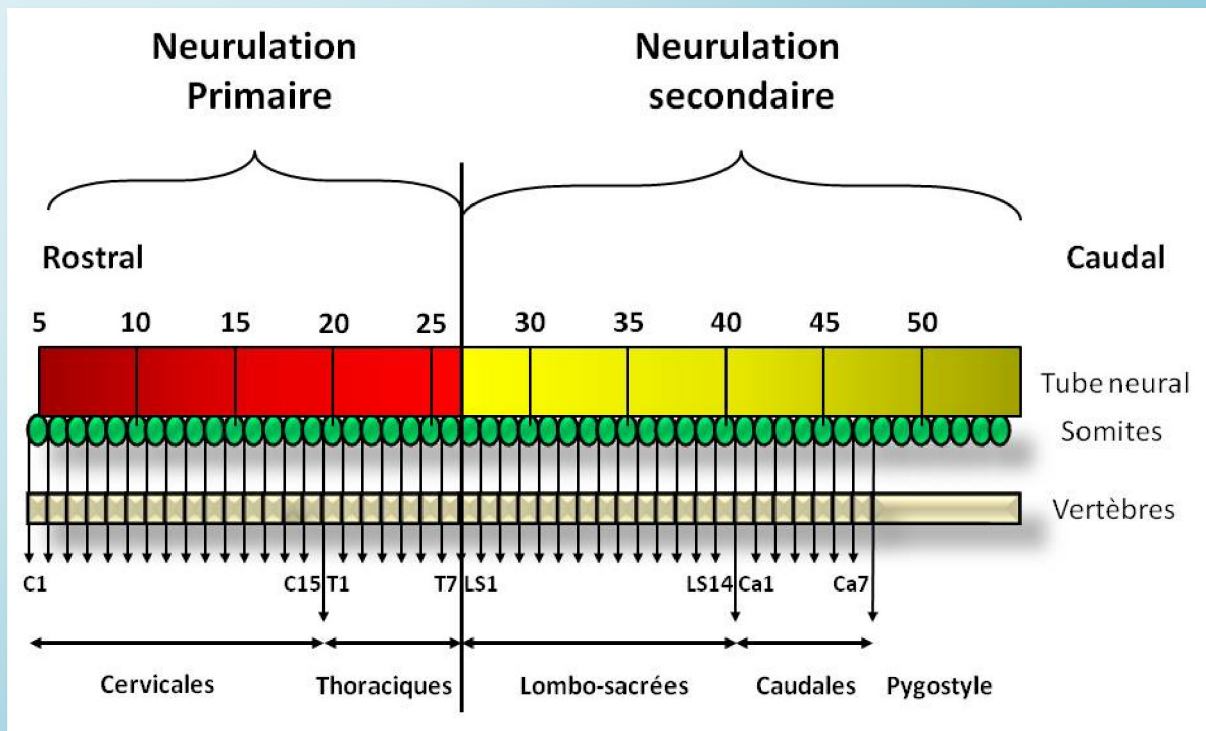
Des anomalies de délamination et de migration des CCN ont également été proposées pour expliquer des défauts de fermeture du tube neural céphalique (Morriss-Kay et al., 1994).

### **III. La neurulation « Secondaire »**

L'enroulement de la plaque neurale qui a lieu lors de la neurulation primaire conduit à la formation d'un neuropore antérieur et d'un neuropore postérieur. Chez l'embryon d'oiseau, le neuropore antérieur se situe dans la région ventrale du télencéphale (Puelles et al., 1987) et le neuropore postérieur au niveau du 27<sup>ème</sup> somite (Catala et al., 1995). Le somite 27 participe à la formation de la dernière vertèbre thoracique et à la première vertèbre lombaire (Figure 17). Il s'agit ainsi de la région de transition entre la moelle épinière du tronc et lombaire. Dans la région la plus caudale de l'embryon, postérieure au neuropore, la neurulation se déroule de façon différente. Les cellules mésenchymateuses d'apparence indifférenciée du bourgeon caudal (Pasteels, 1937) se regroupent, forment un cordon caudal qui s'allonge selon l'axe rostro-caudal puis se creuse de cavités. Celles-ci fusionnent pour engendrer une lumière centrale autour d'un tube neural formé par cavitation, c'est la neurulation secondaire spécifique aux amniotes (Figure 18) (Pasteels, 1937) (Holmdahl, 1938) (Schoenwolf, 1984) (Catala et al., 1995).

#### **1) Mécanismes cellulaires**

Contrairement au nombre important d'études réalisées afin de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués lors de la neurulation primaire, peu d'informations existent sur ceux mis en jeu lors de la neurulation secondaire.



**Figure 17 :** Localisation anatomique selon l'axe antéro-postérieur du tube neural issu de la neurulation primaire et celui issu de la neurulation secondaire chez l'embryon d'oiseau

La limite entre tube neural issu de la neurulation primaire et secondaire se situe au niveau de la 27<sup>ème</sup> paire de somites. C'est également la limite entre les vertèbres thoraciques et lombaires (d'après Le Douarin NM, Teillet MA and Catala M 1998)

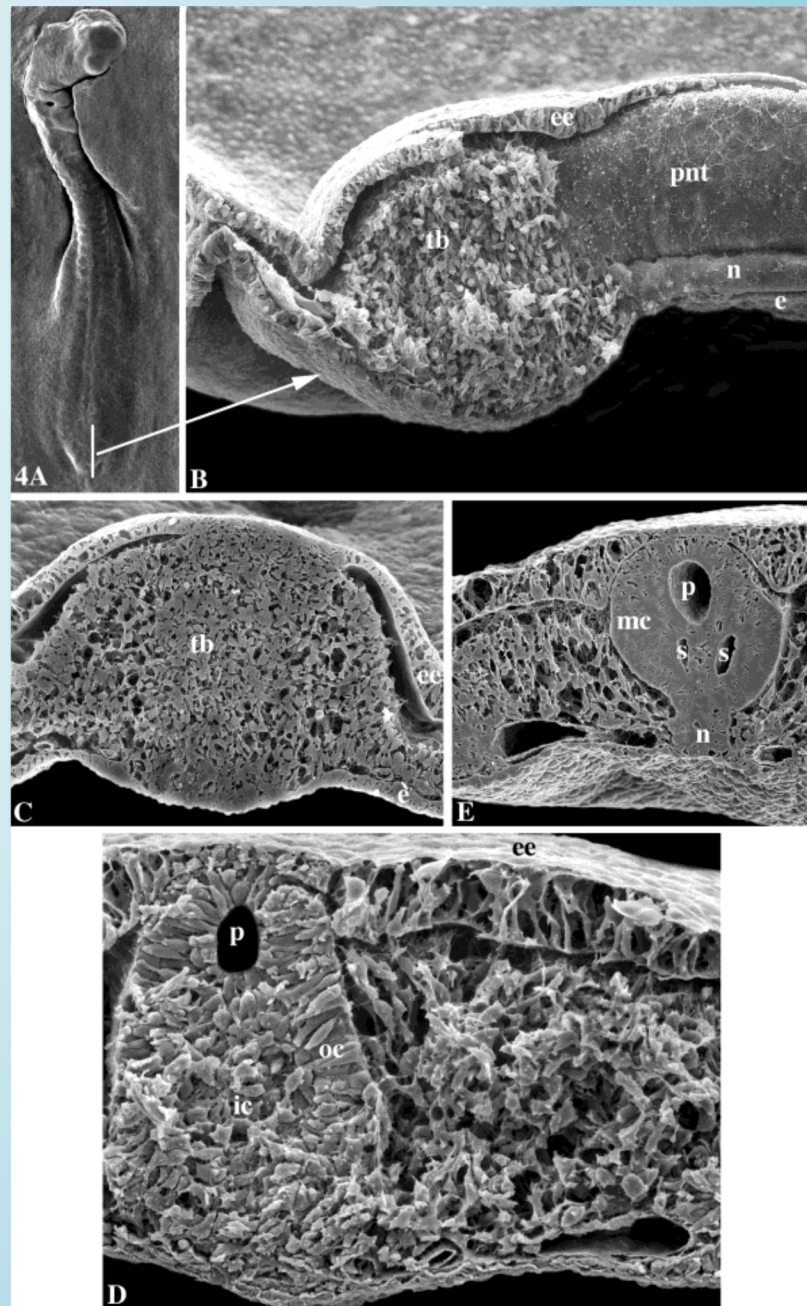
Cependant des observations en microscopie électronique ou classique chez l'embryon d'oiseau (Schoenwolf, 1979) (Catala et al., 1995; Schoenwolf and Delongo, 1980; Yang et al., 2003) ont permis de montrer que les cellules mésenchymateuses du bourgeon caudal (Figure 18 B et C) se concentrent dans la région médiane pour former un cylindre compact en effectuant une transition mésenchyme-épithélium (TME), le cordon médullaire. Au niveau du bourgeon caudal subsistent deux types de cellules morphologiquement distincts : les cellules dorsales allongées et épithélialisées forment un dôme et les cellules plus ventrales mésenchymateuses (Figure 18 D). La lumière du futur tube neural se forme par un processus de fusion de différentes petites cavités, appelé cavitation, qui commence à l'interface entre ces deux populations de cellules (Figure 18 E). Cette formation originale du tube neural met probablement en jeu des mécanismes cellulaires de modifications de la polarité apico-basale et d'adhérence sélective afin de permettre des phénomènes d'intercalation lors de la condensation. Contrairement à une idée reçue, l'apoptose des cellules mésenchymateuses

n'est en aucun cas nécessaire au phénomène de cavitation (Schoenwolf, 1979) (Schoenwolf and Kelley, 1980).

La matrice extra-cellulaire (MEC) joue un rôle important lors de la neurulation secondaire. En effet, les cellules mésenchymateuses du bourgeon caudal sont entourées de fibronectine et de protéoglycan puis ces constituants de la MEC sont progressivement réprimés au cours de la condensation et de la ré-épithélialisation et sont finalement réexprimés pour former la lame basale supportant le tube neural définitif (O'Shea and Liu, 1987). Cette étude suggère ainsi que l'expression et la présence de ces molécules de la MEC à la surface basale des cellules peut jouer sur la réorganisation du cytosquelette et la mise place d'une polarité cellulaire (O'Shea and Liu, 1987).

L'analyse des jonctions cellulaires par microscopie électronique et cryofracture suggèrent également une mise en place progressive de la polarité apico-basale. En effet, il a été observé, chez l'embryon d'oiseau et de souris, des jonctions serrées (des jonctions situées au pôle apical des cellules) et des jonctions communicantes (*gap junctions*) à la surface des cellules du futur tube neural après cavitation (Schoenwolf and Delongo, 1980) (Schoenwolf and Kelley, 1980) (Schoenwolf, 1984) (Colas and Schoenwolf, 2001). Récemment, des travaux assez étonnants réalisés par une équipe japonaise ont permis de confirmer ces premières observations (Shimokita and Takahashi, 2011). Cette étude montre une expression progressive de la protéine aPKC par les cellules neurales présomptives lors de leur transition mésenchyme-épithéliale (TME) et confirme ainsi la mise en place progressive d'une polarité apico-basale lors de la formation du tube neural secondaire. De plus, il a été mis en évidence un rôle certain des petites Rho-GTPases Rac1 et Cdc42, molécules impliquées dans le remaniement du cytosquelette, dans le phénomène de transition mésenchyme-épithéliale lors de condensation des futures cellules du tube neural secondaire (Shimokita and Takahashi, 2011).

La neurulation secondaire chez l'embryon de souris diffère de celle observée chez l'embryon d'oiseau. Tout d'abord, au niveau anatomique, la neurulation secondaire chez la souris ne concerne uniquement que la queue de l'animal. L'intégralité du système nerveux central « vital » murin se forme par un mode de neurulation primaire contrairement à l'oiseau. Ensuite il n'a été observé aucune cellule neurale mésenchymateuse ventrale malgré la présence d'un phénomène de cavitation (Schoenwolf, 1984) (Shum et al., 2010).



**Figure 18** : *La neurulation secondaire lors du développement embryonnaire d'oiseau*

Observation en microscopie électronique à balayage d'un embryon d'oiseau de 2,5 jours de développement (A) ; coupe para-sagittale de la région postérieure (B) ; coupes transversales de la même région (C-E) montrant les étapes de la neurulation secondaire au cours du développement de l'embryon d'oiseau. La ligne blanche de l'image (A) indique la position de la coupe para-sagittale de l'image (B). e : endoderm; ee : ectoderm – épiderme ; ic : inner cells – cellules centrales du cordon médullaire qui vont être exclue du neuroépithélium secondaire par un phénomène de cavitation; mc, medullary cord – cordon médullaire; n, notochorde; oc, outer cells-cellules qui vont former le futur tube neural secondaire; p, lumière du tube neural primaire; pnt, partie caudale du tube neural primaire; s, lumière du tube neural secondaire issue du phénomène de cavitation des cellules du cordon médullaire ; tb, tail bud-bourgeon caudal. (d'après Schoenwolf (2001)).

La neurulation secondaire chez l'Homme est sujet à controverse. En effet, Müller et O'Rahilly ont observé une projection directe de la lumière du tube neural primaire dans le cordon caudal sans phénomène de cavitation ni de transition (Muller and O'Rahilly, 1987) (Muller and O'Rahilly, 1988) suggérant ainsi que la neurulation secondaire chez l'Homme ressemble à celle ayant lieu chez la souris (Hughes and Freeman, 1974) (Nievalstein et al., 1993) (Schoenwolf, 1984). Cependant d'autres études montrent de nombreuses cavités dans la région caudale du tube neural de l'embryon humain supposant que sa formation se fait avec des modalités similaires à celles de la neurulation secondaire observée chez l'embryon d'oiseau (Lemire, 1969) (Saitu et al., 2004) (Saraga-Babic et al., 1995) (Pytel et al., 2007).

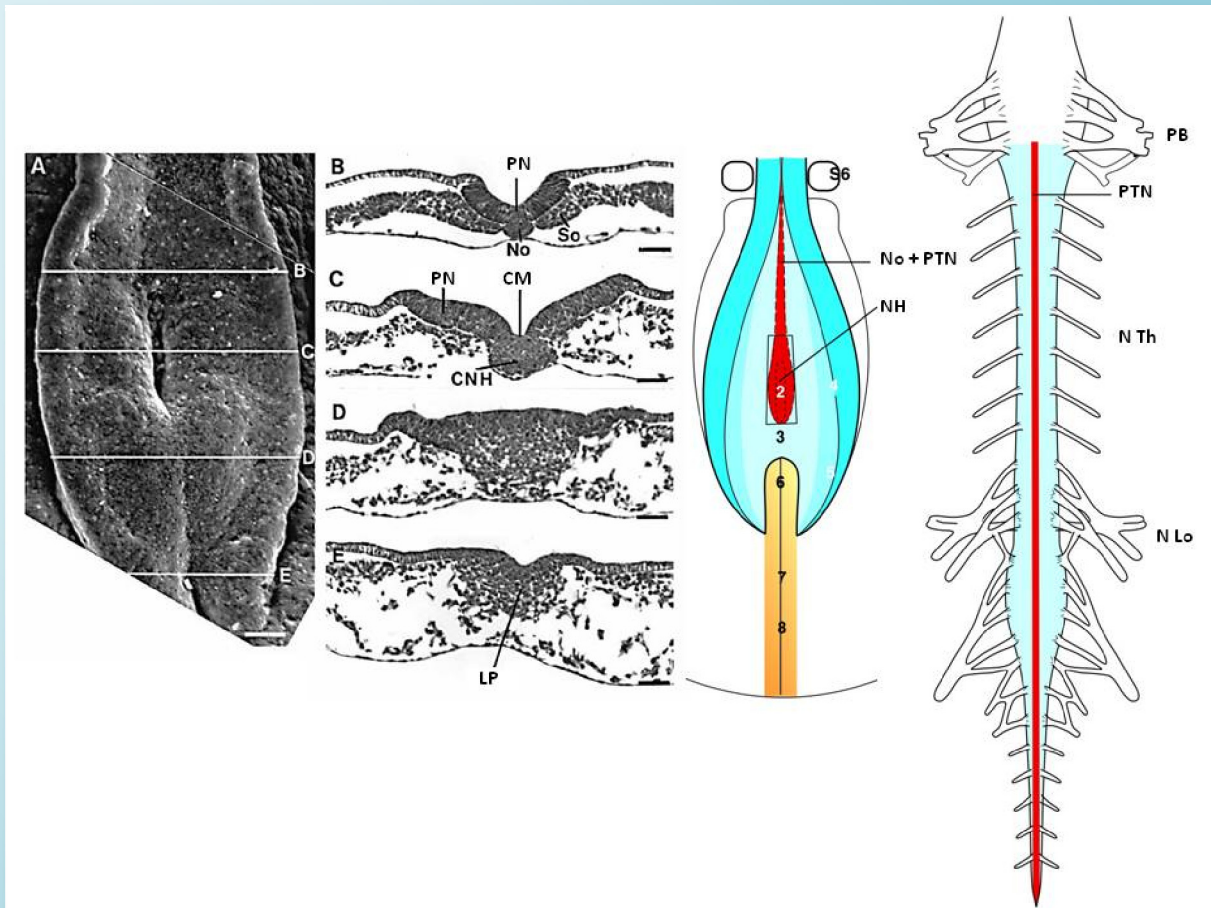
## 2) Le Bourgeon caudal : constitué de cellules souches pluripotentes ?

La principale particularité de la neurulation secondaire est le fait que le tube neural caudal se forme sans modifications apparentes de l'ectoderme ou sans existence d'une plaque neurale. La formation du bourgeon caudal implique donc des mécanismes morphogénétiques différents de ceux décrits lors des phases précoces du développement embryonnaire durant lesquelles les trois feuilletts germinaux (ectoderme, mésoderme et endoderme) sont clairement et nettement définis avant le début du processus. Les mécanismes de formation du bourgeon caudal (donc l'origine des cellules neurales mésenchymateuses) sont sujets à controverse. Pour certains auteurs comme Holmdahl (Holmdahl, 1925) (Holmdahl, 1938), Griffith (Griffith et al., 1992) ou plus récemment Storey (Wilson et al., 2009), le bourgeon caudal peut être assimilé à un blastème par analogie au mécanisme de régénération (Tanaka and Reddien, 2011). Ce blastème serait ainsi constitué de cellules indifférenciées qui vont former les différents tissus par apposition à la partie caudale des structures déjà existantes. Au contraire, Pasteels considère que la formation du bourgeon caudal suit les règles de la gastrulation : les cellules internalisées dans le bourgeon caudal sont des précurseurs différenciés des différents tissus : des précurseurs neuraux et mésodermiques (Pasteels, 1937). Répondre à cette question très complexe a été le but de nombreuses études et ne peut se faire qu'à différents niveaux.

### *a. Au niveau tissulaire et cellulaire*

Les travaux réalisés par Martin Catala ont permis une avancée considérable sur la compréhension de la formation du bourgeon caudal et ainsi sur celui du tube neural postérieur. En utilisant de façon pertinente des expériences de greffes caille-poule, l'auteur a réalisé une cartographie relativement précise du *sinus rhomboïdalis*, structure anatomique

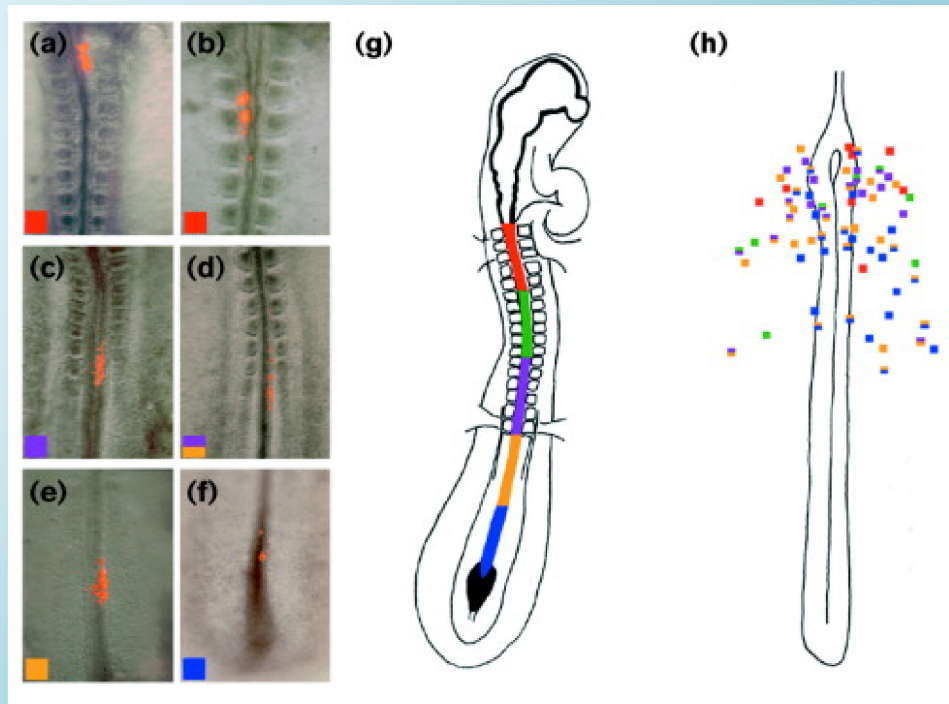
transitoire en forme de cupule observable dans la région postérieure de l'embryon d'oiseau à 1 journée de développement (HH 8 ou 5/6somites) (Figure 19) (Catala et al., 1996). L'auteur a greffé différentes petites régions du *sinus rhomboïdalis* d'embryon de caille à un embryon de poulet au même stade. Les chimères caille-poule se développent, sont prélevées à différents temps puis analysées. Cette étude a ainsi montré que la totalité des cellules à l'origine de la moelle épinière thoraco-lombaire et sacrée sont déjà présentes dans cette région anatomique de l'embryon au stade HH8 (5/6 somites) (Figure 19) réfutant *de facto* la théorie d'un bourgeon caudal blastémique. Le laboratoire de Kate Storey a également réalisé le même genre d'étude toujours chez l'embryon d'oiseau mais cette fois en utilisant des marqueurs fluorescents (DiI et DiO) comme traceur cellulaire (Brown and Storey, 2000). Les auteurs ont injecté des marqueurs fluorescents dans de petites populations de cellules à différents niveaux autour du nœud de Hensen mais cette fois l'étude a été réalisée à des stades très précoces, juste au début de la formation de la plaque neurale (stade HH5). Les auteurs ont ainsi observé que la totalité des cellules neurales présomptives du système nerveux central (celles qui vont former le tube neural primaire et le tube neural secondaire) est présente en surface dès formation de la plaque neurale (Figure 20) (Brown and Storey, 2000). Pour mémoire, ces résultats corroborent tout en la modernisant l'étude réalisée avec des grains de charbon par Neslon T. Spratt dans les années 40 (Spratt, 1947). Malgré ces données Kate Storey devient une farouche défenseuse de la théorie d'un bourgeon caudal constitué de cellules souches pluripotentes, c'est sa fameuse théorie d'une « *Stem Zone* »... (Wilson et al., 2009). Enfin, des travaux récents d'un groupe japonais corrént encore la théorie d'un bourgeon caudal constitué de précurseurs déjà différenciés (Shimokita and Takahashi, 2011). L'injection de DiI dans des cellules de différentes de régions du *sinus rhomboïdalis* de l'embryon d'oiseau au stade 5/6 somites entraîne toujours la formation d'un tube neural caudal constitué de cellules fluorescentes démontrant ainsi la présence des précurseurs neuraux de la région postérieure à la surface de l'embryon dans cette région anatomique (Cette expérience validant encore une fois les travaux réalisés jadis par Martin Catala). Les auteurs ont ainsi tenté de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués lors de la neurulation secondaire en pratiquant des transgénèses transitoires par électroporation au stade 5/6 somites dans la région du *sinus rhomboïdalis* et ont réussi à perturber la formation du tube neural secondaire (Shimokita and Takahashi, 2011). Toutes ces études montrent ainsi que le bourgeon caudal n'est pas une structure homogène composée de cellules pluripotentes mais un territoire complexe où les précurseurs sont déjà ségrévés.



**Figure 19** : *Le sinus rhomboïdal : une structure provisoire de la région postérieure d'embryons d'oiseau au stade HH8 (5/6 somites)*

Image en microscopie électronique de la face dorsale du sinus rhomboïdal d'embryon d'oiseau au stade HH8 (6 somites). Coupes histologiques selon l'axe rostro-caudal et marquage au Cresyl Violet de cette région (B-E). Le Nœud de Hensen apparaît comme une dépression dans la région médiane. Rostralement au Nœud de Hensen, la plaque neurale (PN) et la notochorde sont individualisées mais reste étroitement associées (B). Au niveau de la dépression créée par le Nœud de Hensen, la plaque neurale est bifide et chaque partie est séparée par l'ensemble des cellules du Nœud de Hensen qui forment la « charnière chordo-neurale » (C). Dans la région juste caudale au Nœud de Hensen, la couche superficielle de cellules forme un épithélium recouvrant toute la région (D). Plus caudalement, la ligne primitive forme une petite gouttière (E). Cartographie du sinus rhomboïdal issue des différentes greffes réalisées par Catala et al. et projection selon l'axe antéro-postérieur de la moelle épinière issue de cette structure provisoire. *PB* : *Plexus Brachial* ; *PTN* : *plancher du tube neural* ; *N th* : *nerfs thoraciques* ; *N Lo* : *Nerfs et Plexus Lombaire*. (d'après Le Douarin NM et al. 1998)





**Figure 20** : *Les précurseurs neuraux de l'ensemble du système nerveux central sont déjà spécifiés dès l'induction de la plaque neurale au stade HH5*

(a-f) : Exemples de polyclones observés au stade HH13 issus de marquages au DiO d'embryons d'oiseau réalisés au stade HH5 ; (g) : cartographie sur un embryon d'oiseau au stade HH13 résumant l'ensemble des polyclones issus des marquages réalisés dans les expériences (a-f) ; (h) : cartographie des cellules marquées au DiO au stade HH5 (Brown JM and Storey KG 2000)

*b. Au niveau moléculaire*

En supposant que le bourgeon caudal soit constitué de précurseurs des tissus neuraux et mésodermiques bien ségrégués et non de « cellules souches », les travaux du laboratoire de Kate Storey apparaissent alors complexes à appréhender. Ainsi on peut distinguer deux niveaux de régulation des progéniteurs neuraux et mésodermiques au niveau du bourgeon caudal : des signaux extrinsèques (ou régulation globale selon l'axe antéro-postérieur) et des signaux intrinsèques (ou régulation locale au niveau du bourgeon caudal).

Ainsi, au niveau global, une régulation fine de la combinaison des voies de signalisation FGF, Wnt, Notch et acide rétinoïque dans la région très postérieure de l'embryon de souris et d'oiseau est nécessaire à la prolifération et au maintien d'une homéostasie entre les différents précurseurs neuraux et mésodermiques (Akai et al., 2005) (Yamaguchi et al., 1999) (Abu-Abed et al., 2001) (Sakai et al., 2001). En effet, la voie de signalisation FGF (FGF8 est fortement exprimée dans la région postérieure de l'embryon (Dubrulle and Pourquie, 2004))

va induire l'expression du gène proneural *cash4* dans la région caudale de l'embryon d'oiseau, ce gène va lui-même induire l'expression de *Delta 1* et conduire à une augmentation de la prolifération cellulaire des précurseurs neuraux (Akai et al., 2005) tandis que les membres de la famille des Wnt (Wnt5a et Wnt3a), également mis en jeu dans la prolifération cellulaire, sont eux impliqués dans la différenciation mésodermique paraxiale (Yamaguchi et al., 1999). La voie de signalisation activée par l'acide rétinoïque est également impliquée dans ce contrôle du destin des cellules-précurseurs du bourgeon caudal. Un excès d'acide rétinoïque aboutit à un raccourcissement de l'embryon selon l'axe antéro-postérieur et à l'apparition de tissu neural ectopique dans la région du mésoderme paraxial (Abu-Abed et al., 2001) (Sakai et al., 2001).

Au niveau des précurseurs neuraux et mésodermiques eux-mêmes, il a été récemment montré qu'une régulation fine et une véritable « communication » entre les deux populations existent. Les précurseurs neuraux expriment le facteur de transcription à boîte HMG, Sox-2 (Pevny and Lovell-Badge, 1997) (Wegner, 1999) (Avilion et al., 2003) (Graham et al., 2003) (Uchikawa et al., 1999) (Uchikawa et al., 2003) (Uchikawa et al., 2011) (Thomson et al., 2011). Mais plus précisément, l'expression de Sox-2 selon l'axe antéro-postérieur dépend de l'activation de différentes séquences activatrices ou *enhancers* situées dans le promoteur du gène. Ainsi l'activation de l'*enhancer* N1 est responsable de l'expression de Sox-2 dans la région caudale de l'embryon (Uchikawa et al., 1999) (Uchikawa et al., 2003) (Uchikawa et al., 2011). Les cellules du mésoderme paraxial expriment le facteur de transcription à boîte T, Tbx6, (Chapman and Papaioannou, 1998) lors de leur départ en migration et « éteignent » lors de ce processus l'*enhancer* N1 du gène codant pour Sox-2. Des souris mutées homozygotes pour ce gène (souris *Tbx6* *-/-*) ont été générées et présentent du tissu neural ectopique au sein du territoire mésodermique paraxial suggérant ainsi une régulation fine et complexe du destin cellulaire par ces deux facteurs de transcription (Chapman and Papaioannou, 1998). Cependant, ces souris transgéniques comportent uniquement une extinction du gène *Tbx6* et une activité de l'*enhancer* N1 persiste dans les futures cellules mésodermiques expliquant ainsi l'observation de tissu neural ectopique. Récemment, les travaux de l'équipe de Kondoh réalisés chez l'embryon murin confirment ces observations. En effet, les auteurs ont généré des souris mutées pour *Tbx6* comportant une délétion spécifique pour l'*enhancer* N1 de Sox-2 (excluant ainsi l'expression persistante de ce facteur de transcription par les cellules mésodermiques) et ils ont finalement démontré que le facteur de transcription *Tbx6* réprime

l'expression de Sox-2 en inactivant son *enhancer* N1 et inhibant ainsi le développement neural (Takemoto et al., 2011).

L'ensemble de ces études montrent ainsi que le bourgeon caudal est constitué de précurseurs neuraux et mésodermiques. Cependant, la prolifération des différents précurseurs et le maintien d'un équilibre dans le destin cellulaire des ces deux populations nécessitent une régulation très fine et complexe. Ce contrôle drastique met en jeu des signaux extrinsèques impliquant les voies de signalisation FGF, Wnt, Notch et acide rétinoïque ainsi que des signaux intrinsèques incluant une régulation du programme de développement neural (expression de Sox-2) par le facteur de transcription Tbx6, exprimé spécifiquement par les cellules mésodermiques.

#### **IV. Anomalies de fermeture du tube neural et pathologies associées**

Les anomalies de fermeture du tube neural (ATN) sont des malformations congénitales. Ces ATN sont le plus souvent des conséquences de défauts d'apposition et de fusion des bourrelets neuraux au cours de la neurulation primaire et peuvent entraîner des pathologies très graves allant de la paraplégie à la mort du fœtus. Ces ATN apparaissent à différents niveaux de l'axe antéro-postérieur et reflèteraient les différents sites d'initiation de fermeture du tube neural observés lors du développement humain et murin (Wyszynski, 2005) (Figure 15).

##### **1) Les ATN céphaliques (Exencéphalie/Anencéphalie) (Figure 20)**

Les ATN céphaliques sont caractérisées par une plaque neurale rostrale ouverte et exposée à l'environnement entraînant sa dégénération au cours de la gestation. Le cuir chevelu, la voûte crânienne, les méninges, les deux hémisphères cérébraux et parfois le cervelet manquent au niveau de la région ouverte (Wood and Smith, 1984) (Figure 21). Les anencéphalies peuvent être divisées en celles affectant principalement le cerveau et la boîte crânienne antérieure (meroacrania) et celles touchant le cerveau et la boîte crânienne postérieure (holoacrania) (Seller, 1995). Les nouveau-nés atteints d'anencéphalie ont des capacités réduites. Près d'un quart décèdent durant l'accouchement, ceux qui y survivent ont une espérance de vie de quelques heures ou jours (Jaquier et al., 2006).

Lors du développement de l'embryon de souris, une fermeture incomplète du tube neural céphalique est une des conséquences du défaut de fermeture des sites d'initiation de fusion (site de fusion 2 ou 3) ou de fermeture des neuropores antérieur ou du cerveau postérieur qui suit la progression de la formation du tube neural à partir de ces mêmes sites d'initiation de fusion (Figure 15a) (Fleming and Copp, 2000) (Gogoi et al., 2002) (Greene and Copp, 2009). Par analogie, les anencéphalies observées au cours du développement humain sont probablement un défaut dans la fermeture du neuropore antérieur entre les sites de fusion 1 et 3 (Figure 15b) (l'apparition du site de fusion 2 au cours de la neurulation céphalique ne semble pas être un événement « normal » du développement humain (O'Rahilly and Muller, 2002)).



**Figure 21 : Exencéphalie/Anencéphalie chez l'Homme**

Les ATN céphaliques sont caractérisées par une plaque neurale rostrale ouverte et exposée à l'environnement entraînant *de facto* sa dégénération. Le cuir chevelu, la voûte crânienne, les méninges, les deux hémisphères cérébraux et le cervelet manquent au niveau de la région ouverte (fœtus humain de 18 semaines de gestation) (images fournies par Martin Catala)

## 2) Les ATN spinales (*Spina Bifida*)

Les ATN spinales sont des défauts de formation de la moelle épinière (Figure 15) et les formes les plus sévères conduisent à une *spina bifida* caractérisée par une plaque neurale caudale ouverte (*spina bifida aperta*). Les formes de *spina bifida* les plus observées en clinique sont les Myéломéningocèles fermées (*spina bifida cystica*), ATN dans lesquelles le tissu neural est contenu dans une enveloppe de méninge, et les Myélocystocèles dans lesquelles le tissu neural est directement en contact avec le liquide amniotique (Greene and Copp, 2009). Le terme *spina bifida* se réfère avant tout à un défaut de fermeture des arcs vertébraux qui

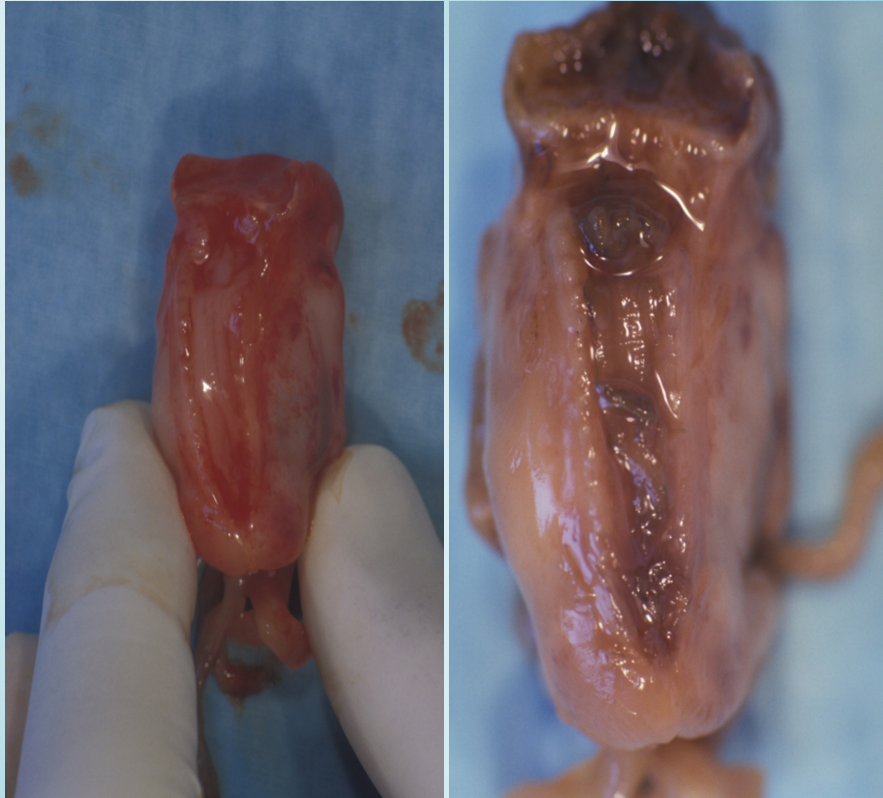
accompagnent systématiquement les lésions de la moelle épinière. En effet, au cours du développement embryonnaire, les arcs vertébraux se forment à partir du sclérotome issu du mésoderme para-axial. Ces cellules mésodermiques vont migrer, entourer le tube neural et se différencier afin de former le rachis. Ainsi lorsque la plaque neurale spinale est ouverte, les cellules du sclérotome ne peuvent pas entourer le tube neural et il en résulte par conséquent une altération de la formation du rachis laissant la région centrale ouverte.

L'étendue du handicap permanent dépend de la localisation de l'anomalie sur la colonne vertébrale. Lors de lésions hautes le risque de paralysie des membres inférieurs est plus important que lors de lésions basses où les problèmes les plus fréquents sont l'absence de contrôle des sphincters de la vessie et du rectum. A ces séquelles peuvent s'ajouter les complications d'une hydrocéphalie causée par un défaut de circulation du liquide cébro-spinal (LCS) issu de malformation de la fosse postérieure qui bloque l'écoulement du LCS (Anomalies de Chiari de type II) (Mitchell et al., 2004) (Wyszynski, 2005). Des nouveau-nés atteints de spina bifida sont opérés après la naissance pour prévenir une aggravation des dégâts du système nerveux.

### 3) Craniorachischisis (Figure 22)

Le craniorachischisis est la forme la plus sévère des anomalies de fermeture du tube neural. C'est une malformation congénitale grave du système nerveux central. La maladie est très rare, sa prévalence n'est pas connue. Dans sa forme complète le craniorachischisis associe anencéphalie et spina bifida total et est létal. Il ne s'agit plus de défauts de fermeture des seuls neuropores antérieur ou postérieur, le tube neural demeure ouvert sur une très vaste région anatomique selon l'axe antéro-postérieur partant du cerveau antérieur à la région spinale moyenne (Figure 15 et Figure 21).

De nombreuses études de souris génétiquement modifiées présentant un craniorachischisis ont permis de mettre en évidence que le défaut de fermeture du tube neural au niveau du site initial (site de fusion 1) est la cause principale de cette pathologie (Copp et al., 1994). De part les très nombreuses similitudes morphologiques entre craniorachischisis murin et la pathologie affectant l'embryon humain, il apparaît que les processus développementaux conduisant à cette ATN sont conservés.



**Figure 22 : Craniorachischisis**

Le craniorachischisis est la forme la plus sévère des anomalies de fermeture du tube neural. C'est une malformation congénitale grave du système nerveux central. La maladie est très rare, sa prévalence n'est pas connue. Dans sa forme complète le craniorachischisis associe anencéphalie et spina bifida total et est létal. Il ne s'agit plus de défauts de fermeture des seuls neuropores antérieur ou postérieur, le tube neural demeure ouvert sur une très vaste région anatomique selon l'axe antéro-postérieur partant du cerveau antérieur à la région spinale moyenne

#### 4) Les défauts du tube neural issu de la neurulation secondaire

Bien que la majorité des *spina bifida* résulte de défauts de fermeture du tube neural issu d'une neurulation primaire (jusqu'à preuve du contraire...), des anomalies dans la formation du tube neural secondaire peuvent conduire à des formes très proches de cette ATN caractérisée par une mauvaise séparation entre tube neural et tissus environnants au niveau du bourgeon caudal. Ces anomalies vont former un point d'attachement de la moelle épinière au rachis puis conduire à des défauts neurologiques et de circulation du LCS.

#### 5) *Spina Bifida occulta*

Par opposition aux pathologies ouvertes résultant d'un défaut de fusion des bourrelets neuraux, d'autres malformations du système nerveux central assimilées au *spina bifida*

peuvent être observées mais cette fois il s'agit plus des conséquences de défauts de formation du mésoderme paraxial qu'une véritable anomalie de fermeture du tube neural. Ainsi les *spina bifida occulta* sont dites fermées car recouvertes de peau malgré les malformations des arcs vertébraux. Ces ATN fermées sont souvent observées dans les régions lombaires basses et sacrées. Des défauts de formation du mésoderme para-axial à l'origine des vertèbres et de la boîte crânienne peuvent également conduire à d'autres pathologies, les Encéphalocèles ou les Méningocèles, caractérisées par un tube neural fermé formant des hernies à travers les régions malformées respectivement du crâne ou de la colonne vertébrale (Wyszynski, 2005).

#### 6) Multiple causes responsables des Anomalies de fermeture du Tube Neural

Comme souvent dans les pathologies congénitales, l'apparition de ces anomalies résultent d'une combinaison entre facteurs non-génétiques et génétiques (Mitchell, 2005) (Greene and Copp, 2009) (Au et al., 2010) (Wu et al., 2011).

##### *a. Les facteurs non-génétiques*

De nombreux facteurs non-génétiques peuvent être associés à la formation des ATN. Ces facteurs comprennent : le statut socio-économique (Grewal et al., 2009) (Canfield et al., 2009), l'âge (Vieira and Castillo Taucher, 2005), les origines ethniques des parents (Njamnshi et al., 2008), l'hyperthermie lors des phases précoces de la grossesse (Moretti et al., 2005), le diabète (Loeken, 2005) ou l'obésité maternelle (Ray et al., 2005), la nutrition de la mère (prise d'acide folique (Fleming and Copp, 1998) (De Wals et al., 2007) ou d'inositol (Greene and Copp, 1997) (Cogram et al., 2004), certains agents chimiques tératogènes (acide rétinoïque (Liu et al., 2008), trichostatin A (Menegola et al., 2005), certains pesticides (Brender et al., 2010) et d'autres).

##### *b. Les facteurs génétiques*

Des anomalies chromosomiques, en particulier les trisomies 13 et 18, sont associées à des malformations du système nerveux central (Sepulveda et al., 2004) (Goetzinger et al., 2008).

A l'image du nombre de facteurs génétiques associés aux ATN chez l'Homme, le nombre de souris transgéniques avec des mutations génétiques entraînant des ATN ne cesse de croître (approximativement 200 en 2007 (Harris and Juriloff, 2007), on en répertorie à peu près 245 en 2010 (Harris and Juriloff, 2010)). Les différentes souris mutées pour ces gènes présentent,

soit du fait de mutations de gènes ciblés ou soit du fait des conséquences indirectes de ces mutations, les différentes formes d'ATN décrites (Greene and Copp, 2009) (Greene et al., 2009) (Copp and Greene, 2010) (Harris and Juriloff, 2007) (Harris and Juriloff, 2010). La plupart de ces mutations génétiques entraînant des ATN impliquent des perturbations dans les voies de signalisation Sonic Hedgehog, BMP, Notch, celle induite par l'Acide rétinoïque, par le métabolisme de l'inositol (Copp and Greene, 2010). Rappelons que ces voies de signalisation sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, la régulation du cytosquelette d'actine, l'organisation de la chromatine et les modifications épigénétiques (régulation des mécanismes de méthylation et d'acétylation) (Greene and Copp, 2009).

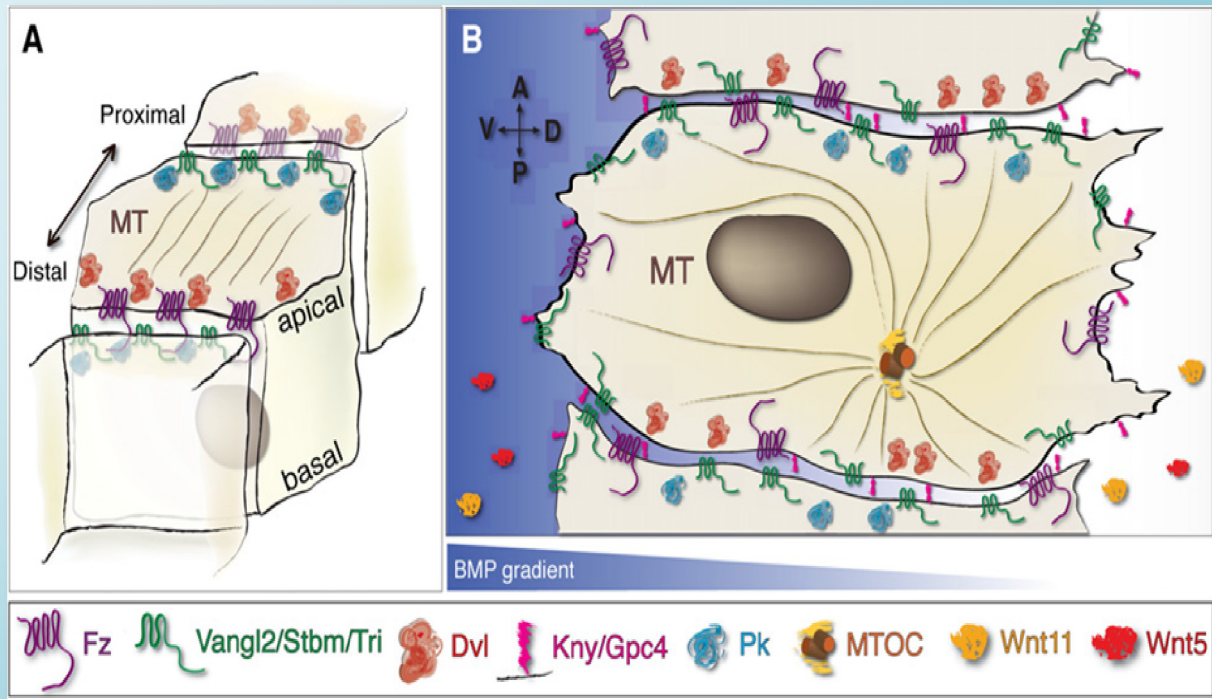
Récemment, la découverte d'une nécessaire implication de la voie de signalisation Wnt non-canonique (appelée également voie de signalisation induite par les acteurs de la polarité planaire (PCP pour *Planar Cell Polarity*)) a permis une avancée majeure dans la compréhension de la fermeture de tube neural (Greene and Copp, 2009) (Greene et al., 2009) (Wu et al., 2011) (Robinson et al., 2012).

### *c. Rôle de la signalisation induite par les acteurs de la PCP dans les ATN*

Les protéines impliquées dans la polarité planaire (PCP) (Figure 23) ne sont pas uniquement exprimées par les cellules épithéliales mais également par certaines cellules mésenchymateuses au cours du développement embryonnaire (Simons and Mlodzik, 2008) (Wu et al., 2011). Il existe deux groupes très conservés au cours de l'évolution d'acteurs de la PCP agissant de concert afin de mettre en place cette polarité planaire : le système composé des protéines Fat/Dachsous (Ds) ainsi que celui composé par les protéines Frizzled (Fz)/Flamingo (Fmi) (Simons and Mlodzik, 2008).

Ce dernier groupe est le plus important et apparaît être responsable de l'activation de la voie de signalisation PCP à proprement parler, c'est-à-dire l'activation de la voie Wnt non-canonique (Wang and Nathans, 2007). Ce groupe de protéines de la PCP est constitué de protéines transmembranaires telles que Frizzled (Fz), Flamingo (Fmi ou Celsr1), Starbismus/Van Gogh (Stbm/Vang ou VangL) ou des protéines cytoplasmiques comme Dishevelled (Dsh chez la drosophile ; Dvl chez les vertébrés) et Prickle (Pk). Tous ces acteurs agissent ensemble soit de manière coordonnée soit en s'inhibant. Par exemple, les protéines Vang/Pk vont inhiber la signalisation transduite par les protéines Fz/Dvl (Henderson et al., 2006) (Jenny et al., 2005).





**Figure 23** : Les différents acteurs de la polarité planaire au sein de cellules épithéliales et mésenchymateuses

(A) Localisation asymétrique des différents acteurs de la polarité planaire dans une cellule épithéliale de *Drosophila*.

(B) Localisation des protéines de la polarité planaire au sein de cellules mésenchymateuses polarisées de vertébrés au cours des mouvements d'extension et de convergence. A noter la position asymétrique des protéines Dvl et Pk au sein de la cellule. (d'après Gray RS et al. 2011)

Chez les vertébrés, Wnt5a et Wnt11 ont été identifiés comme appartenant aux protéines de la PCP mais vont cependant agir en activant la voie Wnt canonique afin d'intégrer des signaux émis et induire une réponse cellulaire coordonnée dans l'espace afin de donner une direction à une migration par exemple (Klein and Mlodzik, 2005) (Tree et al., 2002) (Veeman et al., 2003) (Strutt, 2003) (Wang and Nathans, 2007). En aval de la voie de signalisation induite par les protéines de la PCP se trouvent des effecteurs de la PCP tels que les molécules Inturned, Fuzzy et Fritz (Wallingford, 2006) (Gray et al., 2009). Ces effecteurs vont moduler et transduire la signalisation PCP dans différents tissus. Ce complexe multiprotéique va jouer un rôle important dans la mise en place de mouvements cellulaires coordonnés et dirigés, dans certaines étapes de l'organogénèse en régulant entre autre l'activité de petites GTPases (RhoA, Cdc42 ou la Rho kinase) modulant *de facto* le cytosquelette (Veeman et al., 2003) (Zhou et al., 2007).

La signalisation induite par les acteurs de la PCP est importante dans de nombreux mécanismes développementaux. De nombreuses études ont ainsi montré que la signalisation PCP est requise au mécanisme d'extension et de convergence mis en jeu lors de la gastrulation et de la neurulation chez l'embryon d'amphibien (Tada and Smith, 2000) (Wallingford et al., 2000), chez l'embryon de poisson (Marlow et al., 1998) (Jessen et al., 2002) et chez l'embryon murin (Ybot-Gonzalez et al., 2007). L'expression spatio-temporelle des acteurs de la PCP lors du développement murin laisse suggérer un rôle critique de ces molécules dans la fermeture du site d'initiation de fusion 1 (Figure 15) du tube neural (Greene et al., 2009). Les acteurs de la PCP sont classiquement connus comme étant responsables des ATN de la région caudale de l'embryon bien que les souris mutées *Dvl2* *-/-* par exemple présentent également des défauts rostraux de fermeture du tube neural (Simons and Mlodzik, 2008) (Hamblet et al., 2002) tandis que les ATN rostrales sont essentiellement causées par des défauts dans la signalisation induite par Shh (Wallingford, 2006) (Simons and Mlodzik, 2008). Cependant, les souris mutées pour Patched1 (souris *Ptc1* *-/-*), le récepteur de Shh, présentent à la fois des ATN rostrales et caudales (Goodrich et al., 1997). L'ensemble de ces données suggèrent ainsi des mécanismes moléculaires différents lors de la fermeture du tube neural en fonction du stade de développement embryonnaire et du niveau antéro-postérieur. L'activation de la voie de signalisation induite par Shh joue en effet dans la spécification des cellules ventrales de la plaque neurale engendrant ainsi une charnière médiane et l'enroulement du neuroépithélium tandis que l'activation de la voie de signalisation induite par les acteurs de la PCP est requise pour la fermeture du tube neural (De Marco et al., 2006).

Il apparaît ainsi que des ATN peuvent être observées lorsque l'expression des acteurs de la PCP est perturbée par des causes environnementales ou des causes génétiques. Notre étude va se concentrer principalement sur le rôle de trois d'entre eux selon l'axe antéro-postérieur au cours de la neurulation d'oiseau et par analogie de comprendre leur rôle dans la neurulation humaine :

*i. Flamingo (Fmi) / Starry night (Stan) / Celsr1*

Trois gènes orthologues de *Fmi* ont été décrits chez l'Homme et la souris, *celsr1* – *celsr3* mais ce gène a également été décrit lors du développement d'oiseau (Formstone and Mason, 2005). Les gènes *Fmi* codent des protéines appartenant à la famille des cadhérines. Ces molécules sont constituées de sept domaines transmembranaires, comportent neuf motifs cadhérines dans leur domaine extra-cellulaire (Figure1) et une région C-terminale cytoplasmique mal caractérisée. Tout d'abord décrites lors du développement d'insecte dans la mise en place

d'une polarité planaire au sein de nombreux épithélia (Usui et al., 1999) (Das et al., 2002), ces protéines jouent un rôle drastique dans la mise en place d'une asymétrie cellulaire et donc d'une polarité planaire (Strutt and Strutt, 2008). Les souris homozygotes mutées pour le gène *Celsr1* (souris *celsr1*<sup>-/-</sup>) présentent des ATN très sévères, des craniorachischisis, démontrant ainsi un rôle essentiel des protéines de la famille Fmi dans la mise en place d'une polarité planaire lors du développement embryonnaire mais surtout lors de la neurulation des vertébrés (Curtin et al., 2003).

### ii. *Prickle (Pk)*

Le gène *pk* code pour une protéine constitué de trois domaines LIM et d'un nouveau domaine caractérisé chez l'Homme et la souris. Il a été décrit trois transcrits, Pk, PkM et sple. Lors d'une activation de la voie de signalisation induite par les acteurs de la PCP, le complexe Stbm/Vang et Pk va inhiber l'activité du complexe Fz-Dsh (Jenny et al., 2005) (Henderson et al., 2006) (Strutt and Strutt, 2007). Lors du développement de l'embryon d'amphibien, la protéine XPk (l'orthologue décrit chez le xénope) est exprimée dès la gastrulation et lors de la neurulation dans la région dorsale et médiane de l'embryon (Wallingford and Harland, 2002). Des approches par perte et gain de fonction de XPk entraînent de graves perturbations de la gastrulation et des *spina bifida* sont observées (Takeuchi et al., 2003). De plus, un rôle original et essentiel de XPk a été mis en évidence par les travaux de Goto lors de la gastrulation, cette protéine est requise pour un dépôt de fibrilles polarisées de fibronectine, un des éléments essentiels de la lame basale, et va permettre ainsi une migration dirigée et coordonnée des cellules mésodermiques (Goto et al., 2005).

### iii. *Strabismus (Stbm) / Vang Gogh (Vang) / Vangl*

*Vangl1* et *Vangl2* sont les homologues chez les mammifères du gène *Van Gogh (Vang)*, aussi appelé *Strabismus*, découvert chez l'insecte. Des mutations de ce gène, chez l'insecte, conduisent entre autre à des anomalies dans l'organisation de nombreux epithelia et dans la bonne orientation des ommatidies de l'œil (Torban et al., 2004) (Torban et al., 2008). Le gène *Vangl2* code pour une protéine constituée de quatre domaines transmembranaires et d'un long domaine cytoplasmique comportant dans sa partie carboxy-terminale un domaine de liaison-PDZ (Kibar et al., 2001) (Kibar et al., 2011).

La protéine Vangl2 module le cytosquelette d'actine en régulant l'activité de petites GTPases (Rho A et Cdc42). Il en résulte ainsi une modulation dans l'adhérence, la polarité cellulaire et

dans une certaine mesure dans les mouvements tissulaires (Perez-Pomares, 2008). De nombreuses études sur la fonction des protéines et des gènes *Stbm / Vang/ Vangl* chez la souris, la drosophile, l'amphibien et le poisson ont montré que ces protéines sont indispensables à la mise en place et la régulation d'une polarité planaire nécessaires aux mouvements d'extension et de convergence (Torban et al., 2004). Par exemple, chez le poisson zèbre, les embryons comportant une mutation pour le gène *Stbm* (les mutants *Trilobite*) présentent des défauts dans les mouvements tissulaires lors de la gastrulation et des ATN (Darken et al., 2002). Les souris mutées pour le gène *Vangl2* (appelé également *Loop-tail (LtapLp)*) sont caractérisées par une partie postérieure en boucle ou en tire-bouchon (d'où le nom de « Loop-tail » ou de « pig tail ») et les souris homozygotes pour la mutation du gène *Vangl2* comportent un tube neural ouvert de la région caudale du cerveau moyen au neuropore postérieur (Kibar et al., 2001) (Kibar et al., 2011). De plus, en association avec des mutations de gènes codant pour d'autres acteurs de la PCP, ces souris mutées (souris *Dvl3 +/- ; LtapLp +/-*) présentent des formes sévères d'ATN, des craniorachischisis ou des exencéphalies (Etheridge et al., 2008).

Des recherches de mutations du gène *Vangl2* chez les embryons humains comportant des craniorachischisis n'ont pas été concluantes et ne permettent pas encore de faire de corrélations directes (Doudney et al., 2005) bien que des mutations pour ce gène ont été identifiées sur des fœtus mort-nés ou issus de fausse-couche présentant des ATN (Lei et al., 2010) (Kibar et al., 2011). Contrairement au gène *Vangl2*, des mutations du gène *Vangl1* ont été identifiées chez les patients atteints de forme d'ATN familiales ou sporadique (présentant parfois des craniorachischisis). Il apparaît ainsi que le gène *Vangl1* est un bon candidat pour la recherche de la cause d'ATN lors de la grossesse chez l'Homme. De plus, des études récentes ont montré une corrélation entre mutation du gène *Vangl1* et dysraphisme spinal (malformation de la colonne vertébrale (le plus souvent dans la région lombo-sacrée) caractérisée par l'absence de soudure des deux moitiés d'un ou de plusieurs arcs vertébraux postérieurs ; la fissure ainsi créée peut favoriser la hernie d'une portion des méninges et de la moelle épinière) suggérant un rôle critique de ce gène dans le développement des ATN de la région postérieure du tube neural (Kibar et al., 2007) (Kibar et al., 2009).

## Chapitre III

### *Contrôle de la transition épithélium-mésenchyme des cellules de la crête neurale : un modèle de dissémination cellulaire*

#### **I. Généralités et Définition**

Le détachement de cellules à partir de tumeurs malignes primaires constitue un des événements les plus marquants et dévastateurs de la progression tumorale. Dans le cas des carcinomes mais aussi dans d'autres types de cancers, ce processus s'accompagne de changements majeurs dans la morphologie et la polarité cellulaires et dans le devenir des cellules. Selon le modèle actuel communément admis, la répression de la E-cadhérine à la surface cellulaire ou la perte de ses liens avec le cytosquelette combinée à son remplacement par la N-cadhérine provoqueraient la rupture des contacts intercellulaires et favoriseraient ainsi la transition d'un état épithélial vers un état mésenchymateux (TEM), suivi de la migration de ces cellules à travers la matrice extracellulaire du stroma adjacent. La TEM est donc considérée comme une étape capitale dans la dissémination métastatique (Thiery, 2002) (Thiery et al., 2009) (Duband, 2010).

Toutefois, ce modèle repose principalement sur des expériences réalisées sur des lignées cellulaires transformées et sur des analyses à posteriori de tumeurs où il n'a pas été possible d'étudier en détail la dynamique des événements qui ont précédé et suivi la disparition de la E-cadhérine. **On ignore donc précisément quelles sont les conséquences directes du changement dans le répertoire des cadhérines dans les cellules de carcinomes, notamment sur leur capacité de migration, de prolifération, de survie et de différenciation.**

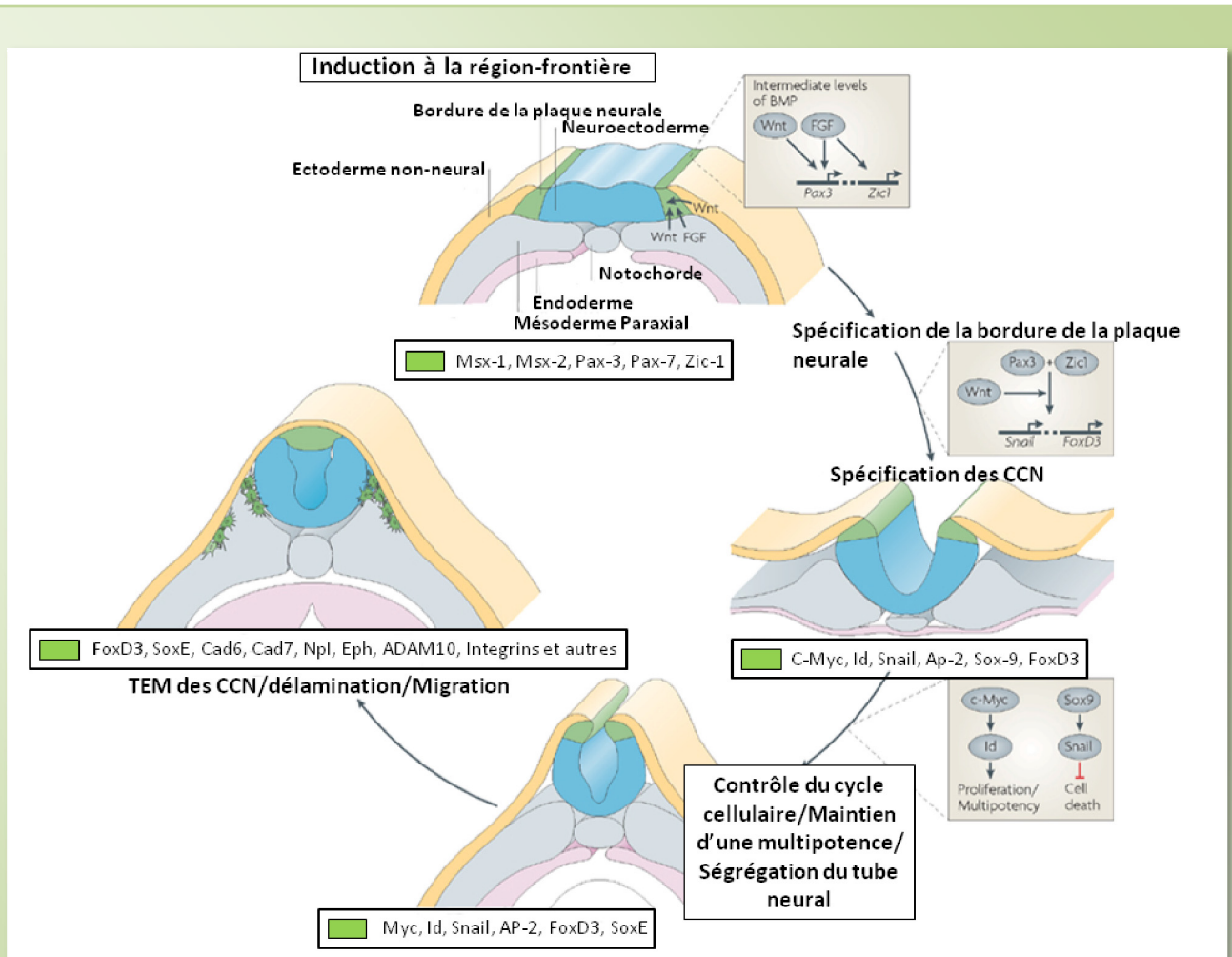
Au cours du développement embryonnaire, on assiste à des phénomènes de dispersion cellulaire analogues à la dissémination métastatique mais contrairement à celle-ci, ils sont

parfaitement prédictibles et peuvent être directement étudiés. **Ils constituent donc des modèles pertinents pour l'étude de la TEM impliquée dans la dissémination métastatique et ses conséquences cellulaires.** C'est le cas notamment des cellules de la Crête neurale (CCN).

Depuis de très longues années, les cellules de la crête neurale (CCN) font l'objet de très nombreuses études et la compréhension précise des mécanismes de formation, de délamination et de migration de ces cellules particulières du tube neural constitue l'un des champs d'investigation les plus importants de la Biologie du Développement (Le Douarin et al., 1981) (Le Douarin and Kalcheim, 1999) (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2006) (Betancur et al., 2010). La crête neurale a été décrite pour la première fois chez l'embryon d'oiseau par Wilhelm His, en 1868, en tant que « *Zwischenstrang* » ou l'« entre-deux cordes », à cause de son origine située entre la plaque neurale et l'ectoderme non-neural (Figure 24). Milnes Marshall, en 1879, appela cette population de cellules la « crête ganglionnaire » ou « crête neurale », puisqu'elle donne naissance aux ganglions spinaux sur les côtés latéraux du tube neural de poissons sélaciens. De plus, les CCN constituent un modèle d'étude présentant tous les mécanismes de base observés au cours du développement : détermination, migration et différenciation cellulaire. En plus de leurs grandes propriétés de migration et de dispersion, les CCN sont avant tout caractérisées par leur multipotence. Les CCN sont à l'origine des mélanocytes (à l'exception des cellules pigmentaires de la rétine), d'une grande partie des os et du cartilage constituant le squelette facial et du cou, de quelques cellules endocrines, donnent naissance à toutes les cellules gliales et à la majeure partie des neurones du système nerveux périphérique. L'apparition de cette population de cellules chez les vertébrés a probablement joué un rôle clé dans leur évolution. En synergie avec l'apparition des placodes ectodermiques, les CCN ont contribué à l'acquisition par les vertébrés de comportements plus complexes notamment de prédateur caractérisés par une augmentation de la taille de la boîte crânienne (et du cerveau), l'apparition des mandibules et d'organes sensoriels.

Les CCN constituent un modèle pertinent pour l'étude des phénomènes de délamination et de migration cellulaires pouvant être impliqués dans la dissémination métastatique. En effet, l'étude des processus métastatiques *in situ* se heurte à une difficulté majeure qui est l'imprévisibilité et la stochasticité de ces événements pathologiques. Ainsi, comprendre et décrypter les différentes étapes conduisant à la délamination et la migration des CCN permet non seulement des avancées dans le domaine de la Biologie du développement mais également (et surtout) dans la recherche contre les cancers.

Dans ce chapitre, nous ferons une synthèse des connaissances actuelles sur l'ontogénie des Cellules de la Crête Neurale mais en nous focalisant surtout sur les premières étapes de la Biologie de ces cellules. Comment cette population est induite au cours du développement ? Quelles sont les mécanismes moléculaires impliqués lors de la délaminéation de ces CCN ?



**Figure 24 :** Régulations moléculaires lors de la formation des cellules de la Crête Neurale

L'induction des CCN débute au niveau des région-frontières de la plaque neurale. Différents signaux tels que les FGF produits par le mésoderme sous-jacent, les Wnt ou les BMP produits par l'ectoderme non-neural sont responsables de cette induction précoce. L'ensemble de ces signaux déterminent ainsi ces bordures en induisant l'expression de *Pax-3*, *Pax-7* et *Zic-1*. Puis *Pax-3* et *Zic-1* vont induire de concert l'expression de gènes spécifiques de CCN tels que *Snail* et *FoxD3*. Les facteurs de transcription *c-Myc* et *Id* vont réguler le cycle cellulaire et maintiennent la multipotence de la population des CCN. *Sox-9* va contrôler la survie de ces cellules en induisant l'expression de facteurs anti-apoptotiques. L'expression de l'ensemble de ces gènes spécifiques des CCN vont ainsi les ségréger du reste du tube neural et vont contrôler leur prolifération, leur délaminéation et ainsi leur TEM (Sauka-Splenger et al.2008)

## II. Induction des Cellules de Crêtes Neurales

La Crête Neurale est une population transitoire de cellules multipotentes caractéristiques des embryons de vertébrés. La délamination des CCN débutent très tôt au cours du développement embryonnaire (au stade HH8 ou 5 somites) au niveau de la jonction mésencéphale-diencéphale puis se poursuit caudalement (Teillet et al., 1987). Classiquement, il est décrit deux grandes classes de CCN, aux comportements cellulaires très différents, définies par leurs régions initiales d'émergence. Les crêtes crâniennes, ou céphaliques, sont les premières à se détacher du tube neural rostral puis les crêtes troncales qui émergent du tube neural plus caudal. La frontière entre les deux régions se situe à l'interface entre l'os occipital du crâne et la première vertèbre cervicale (Gray, 1989). L'induction des précurseurs des CCN aux bords de la plaque neurale nécessitent de nombreux signaux émis à la fois par la plaque neurale néo-formée, l'ectoderme et le mésoderme sous-jacent (Figure 24).

### 1) Formation des Crêtes Neurales et type de neurulation

La formation des CCN est traditionnellement liée aux mouvements de la neurulation. Lors du développement des amniotes, la formation du système nerveux central (comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent) fait intervenir deux mécanismes morphogénétiques très différents selon l'axe rostro-caudal. Dans la partie antérieure de l'embryon correspondant à la région céphalique et des vertèbres cervico-thoraciques, la formation du système nerveux central implique l'enroulement de la plaque neurale, il s'agit de la neurulation dite « primaire » (cf. Chapitre 2). Chez l'embryon d'oiseau, la fin de la neurulation primaire a lieu au stade 12 de la classification établie par Hamburger et Hamilton (HH12) (Hamburger and Hamilton, 1951) et correspond à la fermeture des neuropores antérieur (au niveau du prosencéphale) et postérieur (au niveau de la 27<sup>ème</sup> paire de somites) (Schoenwolf, 1979) (Colas and Schoenwolf, 2001). La formation du tube neural postérieur qui a lieu au niveau du bourgeon caudal implique des phénomènes d'accrétion cellulaire et de cavitation, il s'agit de la neurulation dite « secondaire » (Catala, 2002; Catala et al., 1995) (cf. Chapitre 2).

Lors de la neurulation primaire, les CCN présomptives apparaissent à l'interface entre ectoderme et plaque neurale au cours de la formation de la plaque neurale (Figure 24). Les mouvements de la neurulation vont conduire ensuite au soulèvement puis à la fusion des bourrelets neuraux et enfin à la formation d'un tube neural régionalisé en une région ventrale (ou plaque basale) et une région dorsale (plaque alaire) d'où les CCN émergent ensuite (Le Douarin and Kalcheim, 1999) (Gammill and Bronner-Fraser, 2003) (Duband, 2006). Lors de



la neurulation secondaire, la région dorsale du tube neural ne se forme pas directement par fusion des bourrelets neuraux mais des CCN sont tout de même produites (Catala, 2002; Catala et al., 1995) (Schoenwolf et al., 1985) (Osorio et al., 2009).

## 2) Interactions tissulaires et source des signaux inducteurs

Après la gastrulation, la région anatomique de l'embryon à l'origine des CCN est en contact avec trois tissus : la plaque neurale, l'ectoderme à l'origine de l'épiderme et le mésoderme sous-jacent (le mésoderme paraxial à l'origine des somites). Ces trois tissus semblent participer à l'induction de la crête neurale. De nombreuses études ont montré que les protéines Wnt, les *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) et les *Fibroblast Growth Factors* (FGFs) sont des acteurs requis lors de l'induction des CCN. Cependant, nous ne savons toujours pas si ces interactions tissulaires ont lieu en synergie et coïncident dans le temps ou de manière séquentielle ou encore si ces signaux ont un rôle véritablement d'inducteur ou un rôle dans le maintien d'une population de cellules déjà existantes.

### a. *Rôle du mésoderme paraxial*

Une des premières expériences sur les CCN réalisée chez l'embryon d'amphibien montre que le mésoderme paraxial a le potentiel pour induire les cellules de l'ectoderme en cellules de la crête neurale (Kloos, 1945). Plus récemment, cette observation a été vérifiée *in vitro*, les auteurs ont mis en culture des explants de régions présomptives du mésoderme paraxial et d'ectoderme puis ont observé une expression ectopique de Snail-2/Slug, gène exprimé par les CCN utilisé comme marqueur, par ce dernier tissu (LaBonne and Bronner-Fraser, 1998) (Marchant et al., 1998) (Bonstein et al., 1998). Chez l'embryon d'oiseau, il a également été montré par des approches *in vitro* que le mésoderme paraxial induit la production de mélanocytes, des dérivés de la Crête Neurale, par la plaque neurale (Selleck and Bronner-Fraser, 1995).

Ce n'est vraiment pas une surprise que le mésoderme paraxial ait une activité inductrice. En effet, ce tissu exprime de nombreux signaux inducteurs potentiels tels que les FGF (FGF-3, FGF-4 et FGF-8), Wnt-8 et BMP-4. La question importante relève plutôt de la nécessité ou non de ce tissu pour l'induction des CCN. Bonstein et *al.* ainsi que Marchant et *al.* ont testé cette hypothèse chez l'embryon d'amphibien en réalisant des excisions de la région présomptive du mésoderme paraxial lors de la gastrulation. Les deux équipes ont observé une diminution importante de l'expression de Snail-2/Slug suggérant ainsi un rôle nécessaire du

mésoderme paraxial dans l'induction des CCN *in Vivo* (Bonstein et al., 1998) (Marchant et al., 1998). De plus, toujours chez l'embryon d'amphibien, une induction de CCN après activation de la voie de signalisation FGF dans un ectoderme neuralisé a été observée (LaBonne and Bronner-Fraser, 1998) (Mayor et al., 1995) (Villanueva et al., 2002). Plus récemment, les travaux d'Anne-Hélène Monsoro-Burq ont mis en évidence, par une approche génétique, un rôle important d'un signal FGF-8 émis par le mésoderme paraxial dans l'induction des CCN (Monsoro-Burq et al., 2003).

*b. Les interactions ectoderme-plaque neurale*

Les interactions avec la plaque neurale et l'ectoderme constituent une autre source de signaux inducteurs. Cette hypothèse a tout d'abord été testée chez l'embryon d'amphibien (encore une fois...) par des expériences de greffes ectopiques d'ectoderme ou de plaque neurale et il a toujours été observé des CCN au niveau de chaque nouvelle frontière créée entre ectoderme et plaque neurale (Rollhauser-ter Horst, 1979) (Moury and Jacobson, 1989). Des expériences similaires de greffes ectopiques réalisées chez l'embryon de poisson-zèbre ont également amenées aux mêmes observations (Woo and Fraser, 1998). De plus, Moury et Jacobson ont montré chez l'embryon d'amphibien que des CCN sont induites et délaminent à la fois du tissu neural et du tissu ectodermique suggérant ainsi des similarités voir une réciprocité dans les signaux inducteurs émis par les deux tissus (Moury and Jacobson, 1989). Cependant, dans ces conditions expérimentales chez l'amphibien, le mésoderme paraxial est tout de même un potentiel tissu source de signaux inducteurs. Des travaux réalisés *in vitro*, chez l'oiseau et l'amphibien, vont finalement appuyer et valider la nécessité de combiner uniquement les tissus neuraux et ectodermiques pour induire l'expression de Snail-2/Slug, gène exprimé très tôt lors de l'induction des CCN et souvent utilisé comme marqueur du lignage de ces cellules (Selleck and Bronner-Fraser, 1995) (Mancilla and Mayor, 1996).

La quête du signal inducteur émis par l'ectoderme a été l'objet de nombreuses investigations, Liem et al. ont observé qu'à la fois BMP-4 et BMP-7 (morphogènes exprimés par l'ectoderme de surface avant fermeture du tube neural), membres de la famille des *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), ont la capacité de mimer les effets induits par l'ectoderme. En effet, ces morphogènes induisent l'expression de Snail-2/Slug par des explants de plaque neurale mais cette fois de la région ventrale présomptive et produisent une véritable délamination de CCN. L'expérience de perturbation de la voie de signalisation des BMPs sur ces explants en culture par utilisation de molécules antagonistes telles que chordin, noggin ou follistatin conduit

logiquement à inhiber la capacité inductrice de l'ectoderme. L'ensemble de ces observations suggèrent ainsi que les BMPs sont des composants importants et nécessaires du signal inducteur émis par l'ectoderme (Liem et al., 1997). Cependant, la fenêtre de sensibilité des CCN présomptives aux BMPs semble apparaître plus tardivement que l'émission du signal par l'ectoderme. Selleck et *al.* ont montré ainsi que *noggin* n'a aucun effet sur la formation des CCN lors des phases précoces de la neurulation de l'embryon d'oiseau (lorsque la plaque neurale est encore ouverte) alors même que les BMPs sont fortement exprimées par l'ectoderme et le signal ectodermique actif (Selleck and Bronner-Fraser, 1995). Cependant, cette molécule antagoniste bloque l'induction des CCN lors de phases tardives du développement neural, pendant la fermeture du tube neural, lorsque les BMPs sont exprimées par les cellules des bourrelets neuraux. Ainsi, Selleck et *al.* proposent que l'induction des CCN se fait en deux phases : une phase précoce pendant laquelle les CCN sont induites par un signal ectodermique qui n'inclut pas les BMPs ; et une phase plus tardive lorsque les progéniteurs des CCN sont sensibles à une signalisation BMP (morphogènes exprimés par les cellules dorsales des bourrelets neuraux). Pour résumer, ces études suggèrent que BMP-4 joue un rôle important dans le maintien d'une population de progéniteurs de CCN induits par un signal émis précocement.

Les membres de la famille des Wnt représentent des candidats clefs dans la recherche du signal ectodermique précoce. En effet, des expériences *in vivo* de perturbations de la voie de signalisation Wnt par injection d'inhibiteurs ont montré un défaut de formation des CCN. L'observation de  $\beta$ -caténine nucléaire dans les cellules des bourrelets neuraux avant fusion suggèrent également une activation de la voie de signalisation Wnt. En particulier la molécule *Wnt6* est exprimée par l'ectoderme de surface au bon moment (Garcia-Castro et al., 2002). Cependant, le mésoderme paraxial exprime également des membres de la famille des Wnt, il apparaît ainsi possible que le tissu source initial du signal Wnt soit le mésoderme. Afin de répondre à cette question de la source de Wnt requise pour l'induction des CCN, des expériences d'inactivation conditionnelle de gènes réalisées de façon spécifique au tissu cible doivent être envisagées bien qu'un même signal inducteur généré par de multiples tissus soient également possible.

Lors de l'induction des CCN crâniennes chez l'embryon d'oiseau, la restriction de la zone d'activité des BMPs à la région frontière entre plaque neurale et ectoderme non-neural est liée à l'activation de la signalisation Notch (Endo et al., 2002) (Endo et al., 2003). La signalisation Notch est impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires permettant à deux cellules à

potentiel égal d'adopter des destins cellulaires différents. C'est le cas par exemple dans la région dorsale du tube neural, où les cellules peuvent former soit des CCN soit des neurones de la future moelle épinière. Lors du développement aviaire, le récepteur membranaire Notch est exprimé à la fois par les cellules de la plaque neurale et ectodermiques tandis que son ligand, Delta 1, n'est observé uniquement qu'à la surface des cellules ectodermiques. Les travaux réalisés par Endo et *al.* mettent en évidence un rôle très précoce de la voie de signalisation Notch. En effet, des perturbations de cette voie de signalisation conduisent à une importante diminution d'expression de Snail-2/Slug. Les auteurs proposent que cette réduction soit indirectement liée à l'activité BMP-4 car ce morphogène est induit lorsque le récepteur Delta 1 est activé. Les expériences de surexpression ou d'inhibition de la voie de signalisation Notch entraînent une diminution d'expression de BMP-4 par les cellules de l'ectoderme non-neural suggérant ainsi qu'une activité modérée de la voie de signalisation Notch semble requise au maintien d'une expression de BMP-4, nécessaire à l'induction des CCN, par les cellules ectodermiques. Cependant, dans ces conditions expérimentales, le morphogène BMP-4 est également réprimé dans la région dorsale du tube neural. L'ensemble de ces données suggèrent donc que la diminution ou la perte d'expression du facteur de transcription Snail-2/Slug dans la région du toit du tube neural reflète plus un défaut dans le maintien d'une population de précurseurs de CCN qu'un effet précoce sur l'induction des cellules (Endo et al., 2002).

### 3) Mise en place d'une région frontière entre plaque neurale et ectoderme non-neural

La première étape de la formation des CCN consiste donc en la nécessité de la formation d'une région-frontière entre plaque neurale et ectoderme non-neural. L'étude de la formation de ces régions particulières a été réalisée sur de nombreux modèles animaux et se heurte à des difficultés majeures. En effet, l'une des difficultés consiste à distinguer l'induction des CCN de l'induction neurale qui est l'étape initiale de la formation du système nerveux central. Cependant, des investigations récentes ont montré que l'induction de ces régions-frontières de la plaque neurale et celle des CCN n'ont pas lieu au même moment au cours du développement, sont indépendantes l'une de l'autre et n'impliquent pas les mêmes mécanismes moléculaires (pourquoi faire simple quand on peut faire compliqué !!) (Wawersik et al., 2005).

*a. Les facteurs de transcription spécifiques des régions-frontières*

En réponse aux signaux moléculaires émis par les tissus environnants, un ensemble de facteurs de transcription appelés « spécifiques des régions-frontières » est surexprimé dans ces régions de la plaque neurale et l'expression combinée de ces facteurs définit uniquement ces territoires. Ces « facteurs de transcription spécifiques des régions-frontières » de la plaque neurale sont *Zic-1*, *Msx-1*, *Msx-2*, *Dlx-3*, *Dlx-5*, *Pax-3* et *Pax-7* (Betancur et al., 2010). D'autres populations cellulaires sont également issues de ces régions-frontières comme les précurseurs des cellules des placodes ectodermiques (futurs organes sensoriels). Ainsi, la ségrégation entre territoire présomptif des CCN et des autres cellules des régions-frontières nécessite une expression et surtout une intégration précise dans l'espace et le temps de ces signaux émis. Selon le modèle admis actuellement, les cellules des placodes sont issues des cellules de l'ectoderme non neural tandis que les CCN des cellules de l'ectoderme neural (Schlosser, 2010)

Le facteur de transcription *Dlx-5* est une des premières molécules à être exprimée par les cellules des régions-frontières (Yang et al., 1998) (Pera et al., 1999) (Merlo et al., 2000) (McLarren et al., 2003) et l'expression ectopique de *Dlx-5* par les cellules de la plaque neurale conduit à une induction non-cellule autonome de gènes spécifiques de la région frontière sans toutefois induire l'expression de gènes spécifiques des CCN (McLarren et al., 2003). Cependant, la perte de fonction de ce facteur de transcription dans les cellules ectodermiques n'entraîne pas de perte d'expression des gènes spécifiques à la région-frontière mais tout de même une inversion latérale selon l'axe gauche-droite de l'expression de ceux-ci (Woda et al., 2003). Ainsi, ces observations indiquent que les protéines *Dlx* jouent un rôle important dans la spécification des cellules des régions-frontières et sont requises pour les interactions plaque neurale/ectoderme non-neural nécessaires à l'induction des CCN (Woda et al., 2003). En résumé, la mise en place d'une région-frontière entre plaque neurale et ectoderme non-neural constituées de cellules non spécifiées est dépendante de l'activité des *Dlx* contrairement à l'induction des CCN qui nécessite, elle, d'autres signaux inducteurs.

Les travaux de Tribulo et al. suggèrent qu'un gradient d'activité de la voie de signalisation BMP contrôle l'expression du facteur de transcription *Msx-1* (Tribulo et al., 2003). De manière similaire, l'activation à la fois des voies de signalisation FGF et Wnt induit l'expression de ce facteur de transcription (Bang et al., 1999) (Monsoro-Burq et al., 2005).

Une expression exacerbée de Msx-1 à la frontière entre plaque neurale et ectoderme non-neural est requise pour la formation des CCN.

Cependant, la formation des CCN induite par le signal Wnt ne dépend pas de la présence de Msx-1 mais plutôt d'une activité combinée de deux autres facteurs spécifiqueurs, Pax-3 et Zic-1 (Monsoro-Burq et al., 2005) (Sato et al., 2005). Ces deux facteurs de transcription nécessitent une activité modérée de la voie de signalisation BMP (probablement par action de Msx-1) et également des voies de signalisation FGF et/ou Wnt. Contrairement au facteur spécifiqueur Msx-1, l'expression mais surtout une action en synergie de Pax-3 et de Zic-1 semblent être essentielles à une induction des CCN dépendante de la voie de signalisation Wnt (Sato et al., 2005). En effet, combinés, ces deux facteurs de transcriptions activent les gènes spécifiquement exprimés par les CCN Snail-2/Slug et FoxD3. Ainsi, une induction correcte des CCN nécessite une balance précise d'activité de ces deux facteurs de transcription. En effet, des expériences réalisées chez l'amphibien de surexpression de l'un des facteurs de transcription en l'absence de l'autre conduisent à une induction de régions-frontières alternatives (Litsiou et al., 2005) (Hong and Saint-Jeannet, 2007).

L'ensemble de ces diverses expériences montrent ainsi que ces différents facteurs de transcription spécifiqueurs des régions-frontières, Dlx-5, Msx-1, Pax-3 et Zic-1 sont induits de manière indépendante suite à l'activation d'au moins trois voies de signalisation et ainsi l'intégration de ces signaux inducteurs émis par les tissus environnants. Ces facteurs vont ensuite agir en synergie au niveau de ces régions-frontières afin d'induire les CCN en activant les gènes spécifiqueurs de ces cellules (Snail2/Slug ou FoxD3). Tandis que de nombreux arguments viennent accréditer une action indépendante des trois voies de signalisation majeures (FGF, Wnt et BMP) dans la régulation des facteurs de transcription spécifiqueurs des régions-frontières de la plaque neurale, des données récentes suggèrent cependant que celles-ci convergent vers un effecteur moléculaire commun, la protéine Smad-1 (Fuentealba et al., 2007).

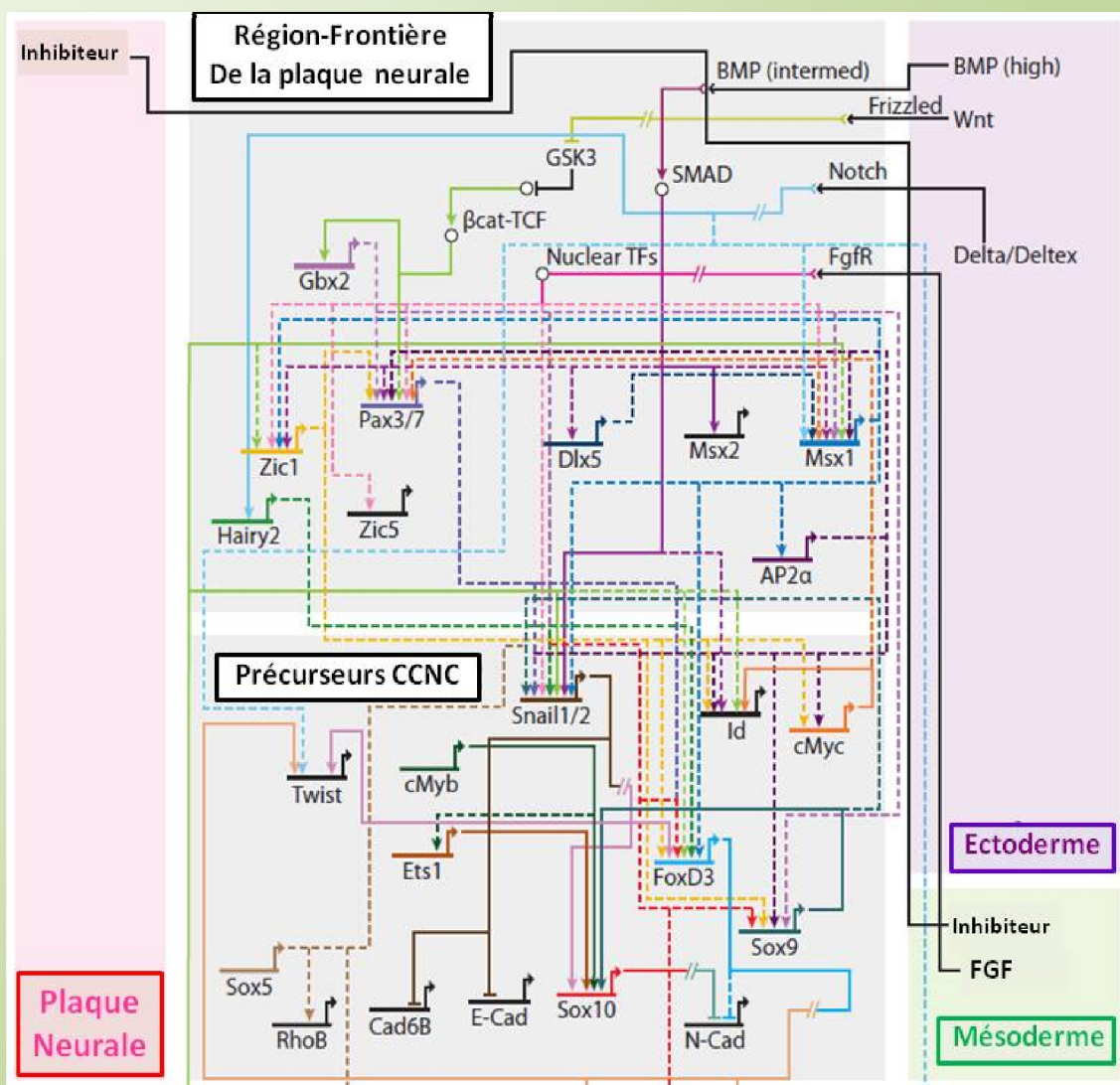
#### *b. Les facteurs de transcription spécifiqueurs des Cellules de Crêtes Neurales*

Une fois les régions-frontières de la plaque neurale mises en place par l'action synergique des facteurs spécifiqueurs de ces régions-frontières, les précurseurs des CCN vont intégrer les signaux (action des voies de signalisation BMP, FGF et Wnt) émis par les tissus environnants conduisant ainsi à leur spécification. Un autre complexe de facteurs de transcription appelé « spécifiqueurs des CCN », Snail-1, Snail-2, Sox-8, Sox-9, Sox-10, FoxD3, AP-2, Twist, c-

Myc et les membres de la famille Id, définissent un nouveau niveau de régulation de ces cellules et vont conduire à l'acquisition d'un destin Crête Neurale (Gammill and Bronner-Fraser, 2003). Ce long « chemin de croix » cellulaire jusqu'à l'identité Crête Neurale nécessite une séquence d'événements complexes impliquant des changements dans l'adhérence, la morphologie, la motilité et la sensibilité aux différentes voies de signalisation des précurseurs de CCN. Ces modifications vont permettre aux cellules de se distinguer puis de se détacher des cellules du neuroépithélium et enfin de migrer en suivant des voies très définies (en intégrant des signaux de guidance cellulaire extrinsèques et intrinsèques) (Duband, 2006). Les facteurs spécificateurs des CCN sont impliqués dans chacun de ces événements cellulaires en régulant directement les effecteurs nécessaires tels que les petites GTPases qui permettent ainsi l'intégration des signaux environnementaux et modulent le cytosquelette ou les cadhérines. De plus, certains facteurs spécificateurs de CCN régulent de nombreuses étapes clés de la Transition Epithélium-Mésenchyme (TEM) des CCN, agissent sur le contrôle de la taille de la population des CCN (compensation du nombre de CCN et contrôle de la prolifération cellulaire) et sur le contrôle du cycle cellulaire ou jouent sur la différenciation de ces cellules en de nombreux dérivés (Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008).

De nombreuses études par des approches de perte et gain de fonction de ces différents facteurs spécificateurs des CCN ont mis en évidence que ces acteurs moléculaires agissent ensemble en combinant leur action afin de réguler et de maintenir l'expression de chacun d'entre eux. Cependant, établir une hiérarchie dans ce réseau génique reste très difficile (Figure 24). La question de savoir comment s'initie leur expression est largement en suspens. Par exemple, l'activation de la voie de signalisation induite par FGF-8 conduit à l'expression de Snail-2/Slug (Monsoro-Burq et al., 2005) et de FoxD3 (Sato et al., 2005) par l'intermédiaire du facteur de transcription Msx-1. Comme nous l'avons décrit plus tôt, l'expression de Snail-2/Slug et de FoxD3 est néanmoins régulée par une action en synergie des facteurs de transcription spécificateurs des régions-frontières Pax-3 et Zic-1 dans un contexte de signalisation Wnt-dépendant (Sato et al., 2005) (Figure 24). L'analyse des éléments régulateurs du promoteur du gène codant pour Snail-2/Slug a mis en évidence des sites de reconnaissance et de liaison au facteur de transcription Lef-1 suggérant une induction par activation de la voie de signalisation Wnt canonique (celle qui implique la  $\beta$ -caténine) mais également des sites de liaisons au facteur de transcription Smad-1, un des effecteurs impliqués dans la voie de signalisation transduite par les BMPs (Vallin et al., 2001) (Sakai et al., 2005).

De manière analogue, l'étude des éléments *enhancers* du promoteur régulant l'expression du facteur de transcription Sox-10 indique que le contrôle spatial et temporel de celui-ci est initié et maintenu par l'action combiné à la fois des facteurs de transcription Sox-9 et Sox-10 lui-même par une boucle de rétrocontrôle mais également des facteurs Pax-3 et AP-2 dans un contexte où la voie Wnt canonique est activée (Werner et al., 2007). Ce n'est uniquement qu'en combinant ces études au niveau des régulations transcriptionnelles (approche génétique) et au niveau des interactions moléculaires (approche épigénétique) qu'une véritable hiérarchisation de ce réseau de régulation génique sera possible (Figure 25).



**Figure 25 :** *Modèle théorique du Réseau de régulation génique impliqué lors de l'induction des Cellules de la Crête Neurale de la région Céphalique*



#### 4) Contrôle de la prolifération des précurseurs des CCN

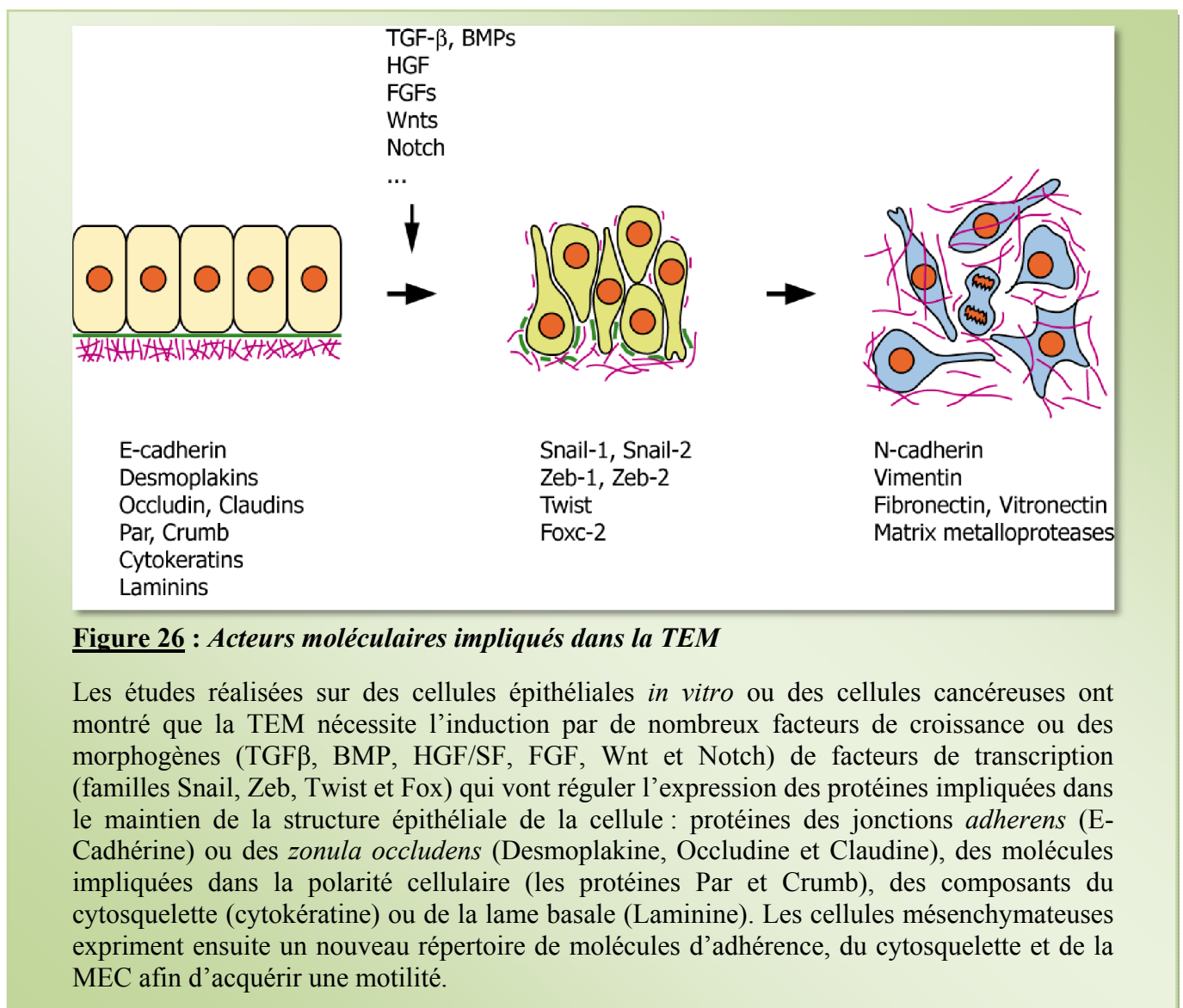
Lors de l'élévation des bourrelets neuraux, les cellules du futur toit du tube neural s'engagent ainsi vers un destin crête neurale dès lors qu'elles expriment les facteurs de transcription inducteurs spécifiques de cette population de cellules (AP-2, c-Myc, Snail-1, Snail-2/Slug, Sox-9, FoxD3 et Id). L'action combinée de ces différents acteurs moléculaires va permettre une ségrégation cellulaire entre CCN et cellules neurales puis jouer dans les différentes étapes du développement de ces cellules, de la TEM jusqu'à leur migration. Les précurseurs des CCN conservent néanmoins assez longtemps leur multipotence sans changer leur vitesse de prolifération bien que la population des CCN semble augmenter après délamination du tube neural (Bellmeyer et al., 2003) (Kee and Bronner-Fraser, 2005) (Light et al., 2005).

Les travaux de Bellmeyer et *al.* suggèrent que le maintien de cette multipotence par les précurseurs des CCN met en jeu le proto-oncogène c-Myc (Bellmeyer et al., 2003). Lors du développement d'embryon d'amphibien, cette multipotence met en jeu en plus le facteur de transcription Id-3, un facteur de transcription à motif Hélice-Boucle-Hélice, qui agit directement en aval de c-Myc (Light et al., 2005). La perte de fonction des gènes *Id3*, ou *c-Myc*, conduit à une augmentation excessive de progéniteurs de cellules du système nerveux central mais surtout à un appauvrissement voire une disparition des progéniteurs des CCN (Light et al., 2005). D'autre part, une expression forcée et continue d'Id-3 prolonge l'état de multipotence des progéniteurs de CCN (Bellmeyer et al., 2003) (Kee and Bronner-Fraser, 2005) (Light et al., 2005). Il apparaît ainsi que le facteur de transcription Id-3 joue un rôle primordial dans le maintien d'un état multipotent des progéniteurs de CCN et tel Janus (le Dieu romain à deux visages), va jouer sur la prise de décision cellulaire entre prolifération et apoptose.

Un autre facteur de transcription spécifique de CCN, Sox-9, exprimé très précocement au cours du développement par les précurseurs de CCN, est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et confère des propriétés anti-apoptotiques aux précurseurs de CCN troncales (Panda et al., 2001). En effet, les CCN de souris mutées pour le gène *Sox-9* (souris *Sox9<sup>-/-</sup>*) rentrent massivement en apoptose (Cheung and Briscoe, 2003). Des résultats similaires ont également été observés chez les embryons de poisson-zèbre dont le gène *Sox-9* a été muté (Yan et al., 2005).

### III. La délamination des CCN nécessite une Transition Epithélium-Mésenchyme

Après leur spécification, les précurseurs de CCN forment (avec des cellules neurales) le toit du tube neural. Ces précurseurs sont polarisés, possèdent un pôle apical comportant des jonctions adhérentes (constituées de cadhérines) et serrées (présence de claudine-1) et un pôle basal en contact avec la matrice Extra-Cellulaire (MEC). Ces cellules réalisent ensuite une Transition Epithélium-Mésenchyme (TEM), se détachent du tube neural et migrent selon des voies très spécifiques devenant ainsi à proprement parler des Cellules de la Crête Neurale (Kalcheim, 1999). Cette TEM nécessite à la fois des modifications majeures du cytosquelette, des changements dans les jonctions et dans l'adhérence cellulaire.



**Figure 26 : Acteurs moléculaires impliqués dans la TEM**

Les études réalisées sur des cellules épithéliales *in vitro* ou des cellules cancéreuses ont montré que la TEM nécessite l'induction par de nombreux facteurs de croissance ou des morphogènes (TGFβ, BMP, HGF/SF, FGF, Wnt et Notch) de facteurs de transcription (familles Snail, Zeb, Twist et Fox) qui vont réguler l'expression des protéines impliquées dans le maintien de la structure épithéliale de la cellule : protéines des jonctions *adherens* (E-Cadhérine) ou des *zonula occludens* (Desmoplakine, Occludine et Claudine), des molécules impliquées dans la polarité cellulaire (les protéines Par et Crumb), des composants du cytosquelette (cytokératine) ou de la lame basale (Laminine). Les cellules mésenchymateuses expriment ensuite un nouveau répertoire de molécules d'adhérence, du cytosquelette et de la MEC afin d'acquies une motilité.

L'initiation de ce processus requiert à la fois l'action combinée et coordonnée de plusieurs facteurs de transcription (les membres de la famille des Snail, de la famille des ZEB, des

facteurs de transcription à motif bHLH, FoxD3 (cf Chapitre 1) dont l'expression est induite par l'activation de nombreuses voies de signalisation (TGF $\beta$ -BMP et membres de la famille des FGF, ...) et l'intégration de signaux provenant de la matrice extracellulaire (rôle des interactions intégrines-fibronectine, du collagène et de l'acide hyaluronique) (Figure 26) (Thiery and Sleeman, 2006) (Thiery et al., 2009) (Duband, 2010).

Pour l'instant, seul le facteur de transcription Snail-2/Slug a été réellement décrit comme acteur majeur de la TEM des CCN en jouant directement sur les changements d'adhérence cellulaire (fixation au niveau du promoteur conduisant à la répression de la cadhérine-6B exprimée par les CCN (cf Chapitre 1) et la motilité de ces cellules (Cano et al., 2000) (Nieto, 2002) (Ikenouchi et al., 2003) (Taneyhill et al., 2007).

### 1) Rôles des cadhérines au cours de la Transition Epithélium-Mésenchyme des CCN

Selon le modèle actuel, la dissémination des CCN à partir du neuroépithélium s'effectuerait suivant une TEM qui mettrait en jeu une séquence de cadhérines différente de celle décrite pour les cellules épithéliales en culture et les carcinomes (Taneyhill, 2008) (Duband, 2010). La première molécule d'adhérence intercellulaire exprimée par les cellules neuroépithéliales et les précurseurs des CCN serait la E-cadhérine. Cette molécule serait remplacée par la N-cadhérine au cours du repliement de la plaque neurale et de sa fermeture en tube neural mais, contrairement à ce que l'on observe dans les carcinomes, ce phénomène n'induirait pas de migration cellulaire. Les CCN exprimeraient également la cadhérine-6B, et comme la N-cadhérine, ces molécules disparaîtraient de la surface des CCN dès le début de la migration. Ensuite, les CCN en migration exprimeraient d'autres cadhérines, la 7 et la 11. **Toutefois, aussi surprenant que cela puisse paraître, ce modèle n'a jamais été directement vérifié. D'une part, on ne sait pas quand a lieu la transition E/N-cadhérine, si elle a lieu, et d'autre part, la fonction de la cadhérine-6B est sujette à controverse** (Coles et al., 2007) (Taneyhill et al., 2007) (Park and Gumbiner, 2010).

La répression de la E-cadhérine, molécule d'adhérence caractéristique des cellules épithéliales, et la perte d'une polarité cellulaire sont requises et nécessaires à l'initiation de la TEM des CCN. De très nombreuses études ont permis de décrire trois grandes familles de facteurs de transcription entrant en jeu dans la répression de cette cadhérine : les membres de la famille des Snail, ceux de la famille des ZEB et des facteurs de transcription à motif Hélice-Boucle-Hélice (bHLH) (Twist, E47,...) (cf Chapitre 1) (Peinado et al., 2007) (Thiery et al., 2009) (Duband, 2010). Après la fermeture du tube neural, les précurseurs de ces cellules

exprimeraient à la fois la N-cadhérine et la Cadhérine-6B (Hatta et al., 1987) (Nakagawa and Takeichi, 1995) puis lors de la TEM, ces molécules d'adhérence cellulaire sont réprimées respectivement par les facteurs de transcription FoxD3 et Snail-2/Slug (cf Chapitre 1) (Cheung et al., 2005) (Taneyhill et al., 2007) (même si l'étude de la répression de la cadhérine-6B semble beaucoup plus crédible et rigoureuse que celle de la N-cadhérine dont le rôle dans la TEM des CCN reste encore réellement à déterminer...). En effet, les travaux de Taneyhill LA et al. ont montré que le promoteur du gène codant pour la Cadhérine-6B comporte plusieurs séquences régulatrices E-Box (CAGGTA) permettant des interactions directes avec le facteur de transcription Snail-2/Slug et ainsi sa répression (Taneyhill et al., 2007). Les profils d'expression des facteurs de transcription ZEB-1 et ZEB-2 au cours du développement précoce embryonnaire, plus précisément lors de la formation des CCN, ont été en partie réalisés (Delalande et al., 2008) (van Grunsven et al., 2000) (van Grunsven et al., 2007) (Funahashi et al., 1993). De manière assez remarquable, dans toutes les espèces, ces études indiquent une expression combinée des facteurs ZEB-2 et Snail-2/Slug par les CCN lors de leur délamination et en début de migration. Les souris dont le gène *ZEB-2* a été muté (souris *zeb2* *-/-*) connaissent une létalité très précoce et présentent de nombreuses anomalies du tube neural (tube neural complètement ouvert et frontière entre plaque neurale/ectoderme non définie). De plus, l'expression de la E-cadhérine persiste à la surface des cellules du tube neural entraînant un retard de délamination et de migration des CCN céphaliques, voire une disparition de ces cellules de la région vagale à l'origine des ganglions entériques (Van de Putte et al., 2003). Cependant, l'inactivation conditionnelle du gène *zeb2* spécifiquement dans ces cellules de la Crête Neurale (croisement de souris Wnt-Cre et de souris lox *zeb2*) conduit à des anomalies crâniofaciales, cardiaques et entraîne un déficit sévère du nombre de mélanocytes et de neurones périphériques (Van de Putte et al., 2007). Néanmoins, contrairement au facteur Snail-2/Slug, aucune cible moléculaire directe de ZEB-2 n'a été décrite lors de la délamination de ces cellules. La présence des mêmes séquences régulatrices que celles observées au niveau du promoteur du gène codant pour la E-cadhérine place la Cadhérine-6B comme cible potentielle.

La régulation de la N-cadhérine lors de la transition épithélium-mésenchyme des cellules de la Crête Neurale reste sujette à controverse. En effet, les travaux réalisés par Shoal et al. sur les CCN troncales d'embryons d'oiseau de 15 à 18 somites ont montré que l'initiation de la délamination de ces cellules requiert une répression par clivage protéolytique de la partie extra-cellulaire de la N-cadhérine dépendant des BMPs (Shoal et al., 2007). Dans cette

étude, les transcrits codant pour la N-cadhérine sont exprimés dans l'ensemble du tube neural troncal de l'embryon d'oiseau, région dorsale comprise, contrairement à l'expression de la protéine qui est distribuée selon un gradient rostro-caudal rappelant celle de l'inhibiteur de la voie de signalisation des BMPs, noggin. Une expression ectopique de la N-Cadhérine dans la région dorsale du tube neural troncal conduit à une inhibition de la délamination des CCN *in vivo* et *in vitro*. De plus, l'expression ectopique de formes mutées de cette molécule d'adhérence, par exemple une mutation dans la région cytoplasmique impliquée dans les interactions avec la  $\beta$ -caténine ou dans la région extra-cellulaire nécessaire aux liaisons intercellulaires, n'affecte pas la TEM de ces cellules (Shoval et al., 2007). Cette étude semble confirmer des investigations plus anciennes réalisées par l'équipe de M. Takeichi (Nakagawa and Takeichi, 1998). Dans cette étude, la surexpression de la N-cadhérine a été réalisée non pas par électroporation mais par infection virale et conduit à une diminution du nombre de CCN qui délaminent, à une accumulation de CCN le long de la région dorsale du tube neural et parfois à une agrégation de cellules dans la lumière du tube neural. Dans ces conditions expérimentales, les CCN qui migrent se différencient normalement au niveau des régions cibles définitives. Cependant, une expression ectopique par infection virale d'une construction nucléotidique produisant une protéine N-cadhérine tronquée dans le domaine extra-cellulaire (responsable des liaisons intercellulaires) ne conduit à aucun phénotype (Nakagawa and Takeichi, 1998). Néanmoins, cette étude ne montre uniquement des effets que sur les CCN qui vont être à l'origine des mélanocytes, c'est-à-dire les dernières cellules de la Crête Neurale à quitter le tube neural. On voit ainsi les limites de cette stratégie de perturbation par infection adénovirale : le temps d'intégration et d'expression du transgène par la cellule infectée. Il aurait ainsi fallu infecter les cellules de la Crête Neurale plus tôt afin d'atteindre tous ou un plus grand nombre de précurseurs de ces cellules. De manière plus ou moins intéressante, il semblerait que la surexpression de la N-cadhérine dans les précurseurs des cellules de la Crête réduise la synthèse d'ADN en modulant l'expression de la Cycline D1, ce qui expliquerait pourquoi la délamination des CCN est inhibée dans ces conditions expérimentales (Shoval et al., 2007). La répression de la N-cadhérine par les CCN est en partie causée par l'activation de la voie de signalisation transduite par BMP-4. En effet, une surexpression de BMP-4 conduit à une augmentation du nombre de cellules qui migrent et une perte de fonction de ce morphogène par expression ectopique de noggin, une molécule inhibitrice spécifique, entraîne une expression ectopique de la N-cadhérine par les précurseurs des cellules de la Crête et ainsi l'inhibition de la délamination de ces cellules (Shoval et al., 2007). L'étude du clivage protéolytique de la partie extra-cellulaire de la N-cadhérine est très

bien documentée dans d'autres systèmes modèles (Reiss et al., 2005) (Marambaud et al., 2003). Dans un premier temps, la protéine transmembranaire ADAM-10 (A Disintegrin And Metalloproteinase 10) clive la région extra-cellulaire de la N-cadhérine conduisant à la formation d'une protéine de 40 kDa dont le fragment C-terminal est encore accroché à la membrane plasmique, le fragment CTF1 (C Terminal Fragment 1). CTF1 va ensuite servir de substrat à la  $\gamma$ -secretase et être clivé en une protéine cytoplasmique de 35 kDa (CTF2). Ce second fragment, CTF2, va ensuite interagir avec le facteur de transcription CBP (CREB Binding Protein), ce qui conduit à la dégradation de celui-ci et ainsi inhiber l'expression des gènes dépendants de ce facteur de transcription (Marambaud et al., 2003). La métalloprotéinase ADAM-10 est exprimée par les cellules de la région dorsale du tube neural et par les CCN aviaires obtenues à partir d'explants de tube neural en culture (Hall and Erickson, 2003). De plus, l'expression d'ADAM-10 co-localise avec celle de la N-cadhérine dans les cellules du tube neural d'embryon de souris à 9,5 jours de développement (Reiss et al., 2005). Des traitements d'explants de tube neural avec un inhibiteur chimique d'ADAM-10 (GI254203X) conduit à l'inhibition de la délamination des CCN indépendamment de la voie BMP et une accumulation de N-cadhérine à la surface des cellules.

Cependant, cette hypothèse d'une nécessaire répression de la N-cadhérine par clivage protéolytique est basée sur l'étude non rigoureuse du profil d'expression de la N-cadhérine à un unique stade (HH 14 – 20 somites) du développement d'oiseau. En effet, Chaya Kalcheim prend le parti d'un tube neural dont la formation demeure strictement identique selon l'axe antéro-postérieur et dont l'histoire cellulaire et moléculaire peut ainsi être remontée en observant la région caudale (le tube neural rostral étant censé être plus mature mais identique au tube neural caudal)... Ce qui s'avère malheureusement complètement faux ! **La question d'une transition –E/-N lors du développement des CCN s'impose donc.** Ainsi, des modèles exotiques apparaissent et persistent montrant une répression nécessaire de la N-cadhérine par Snail-2/Slug lors de la Transition Epithélium-Mésenchyme de ces cellules du toit du tube neural alors qu'aucun argument scientifique n'existe (Theveneau and Mayor, 2012) ! Bien au contraire, des études du promoteur du gène codant pour cette molécule d'adhérence n'ont montré aucune séquence de fixation – E box – permettant une répression directe de Snail-2/Slug, facteur de transcription nécessaire à la délamination des CCN (Matsumata et al., 2005). De plus, une expression ectopique de Snail-2/Slug dans le tube neural troncal n'induit jamais de délamination ectopique de cellules neurales exprimant la N-cadhérine (del Barrio and Nieto, 2002). De plus, la fameuse région Carboxy-terminal ou

domaine CTRF2 (ou *Carboxy-Terminal Region Fragment-2*) issu du second clivage de la N-cadhérine dans la région cytoplasmique de cette protéine est décrite dans cette même étude comme facteur de transcription est sujette à discussion. En effet, cette région présente une séquence en acides aminés quasi-identique à celle de la E-cadhérine... remettant ainsi en cause la spécificité et ainsi l'origine réelle de ce fragment-facteur de transcription (sans pour autant exclure un rôle effectif de cette région !!). Le rôle de la N-cadhérine lors de la transition épithélium-mésenchyme des cellules de la Crête Neurale est donc à reconsidérer...

## 2) Désorganisation des jonctions serrées

Lors de la TEM, les cellules changent leur répertoire de cadhérines et perdent toute polarité cellulaire (Peinado et al., 2007) (Duband, 2010) (Thiery et al., 2009). La désorganisation des jonctions serrées, des structures impliquées dans l'étanchéité des épithélia et la mise en place de la polarité cellulaire, est la conséquence directe de la répression des protéines qui constituent ces structures subcellulaires telles que les occludines, des protéines transmembranaires, ou les claudines, protéines impliquées dans des phénomènes d'adhérence cellulaire indépendante du calcium (Shin et al., 2006). Chez les amniotes, au cours de la neurulation, les cellules de la région dorsale, y compris les précurseurs des CCN, perdent progressivement leur caractère épithélial et n'expriment plus certaines protéines des jonctions serrées telles l'occludine. Cependant, les cellules neurales et les précurseurs des CCN restent polarisées. Ces cellules continuent à exprimer ZO-1, la claudine ou les protéines Par3-Par6-aPKC (Aaku-Saraste et al., 1996) (Eom et al., 2011). La TEM des CCN nécessite ainsi en plus de la répression de la Cadhérine-6B celle des protéines des jonctions serrées. Encore une fois, le facteur de transcription Snail-2 a été décrit comme répresseur de l'expression des protéines claudine et/ou occludine (Ikenouchi et al., 2003) (Peinado et al., 2007).

## 3) Réorganisation de la Matrice Extra-Cellulaire

Dès lors que les précurseurs de CCN effectuent une TEM, ces cellules se détachent du tube neural, traversent la lame basale et migrent à travers une matrice extracellulaire complexe composée de collagènes, de fibronectine, de laminine, de vitronectine et de protéoglycans. Afin de traverser sans encombre cette véritable jungle moléculaire composée entre autre de lianes-fibres de fibronectine, les CCN doivent nécessairement posséder une véritable machette moléculaire que représente l'activité protéolytique de certaines métalloprotéases matricielles (*Matrix Metalloprotease-MMP*) membranaires ou sécrétées déjà bien décrites dans les

mécanismes d'invasion tumorale (Egeblad and Werb, 2002). Contrairement au contexte pathologique du cancer caractérisé par une véritable anarchie moléculaire, les CCN répondent à des signaux précis et traversent la membrane basale de manière totalement contrôlée par une véritable balance entre activité des MMP et des inhibiteurs des MMP (*Tissue Inhibitors of MMP-TIMP*) (Chang and Werb, 2001). La protéine *Matrix Metalloprotease-2* (MMP2), sécrétée par le mésoderme sous-jacent ou exprimée par les CCN céphaliques à l'origine des dérivés non neuraux de la tête, joue un rôle primordial dans la migration des CCN cardiaques (Cai et al., 2000) (Cai and Brauer, 2002). Récemment, une étude suggère que la régulation fine des MMP et de leurs inhibiteurs, les TIMP, est nécessaire à la migration des progéniteurs de la cornée dérivés des CCN. De plus, cette même étude a mis en évidence des interactions entre *A Disintegrin and Mettaloprotease-10* (ADAM-10), un membre de la famille des métalloprotéases ADAM, et le récepteur membranaire à l'acide hyaluronique, CD44. La métalloprotéase clive le domaine extracellulaire du récepteur CD44 (domaine responsable des interactions avec l'acide hyaluronique mais également d'autres composants de la MEC tels que la fibrine, la laminine, la fibronectine, le collagène de type I et les chondroïtines sulfates) ce qui conduit *de facto* à la rupture des liaisons cellules-MEC dans la cornée embryonnaire et facilite la migration des progéniteurs cornéens dérivés des CCN (Huh et al., 2007).

Les métalloprotéases de la famille ADAM sont des glycoprotéines membranaires qui jouent à la fois sur l'adhérence intercellulaire et dans les modifications tridimensionnelles de la MEC en clivant les domaines extracellulaires des protéines transmembranaires responsables des liaisons cellule-cellule ou cellule-MEC. Lors du développement de l'embryon d'amphibien, la métalloprotéase ADAM-13, exprimée à la fois par les précurseurs et les CCN céphaliques, joue à plusieurs niveaux au cours de la migration des CCN. Dans un premier temps, cette métalloprotéase réduit les interactions entre cellules et MEC, permettant ainsi le détachement des CCN du neuroépithélium. Ensuite, dans un second temps, ADAM-13 facilite la traversée de la MEC par les CCN lors de leur migration (Alfandari et al., 2001) (Kee et al., 2007) (Cousin et al., 2012).

Lors de la TEM, les CCN modifient non seulement leurs contacts cellule-cellule mais également leurs interactions avec la matrice extracellulaire. Ces dernières mettent en jeu les intégrines, des récepteurs hétérodimères constitués d'une sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$ . Les intégrines sont observées au niveau des contacts focaux et lient la MEC par leur domaine extracellulaire au cytosquelette d'actine (Lallier and Bronner-Fraser, 1992) (Lallier and Bronner-Fraser, 1993) (Delannet et al., 1994). L'équilibre entre formation et désorganisation des contacts focaux



joue un rôle essentiel dans la migration des cellules et des expériences de perte de fonction de ces récepteurs à la MEC confirment ainsi que ces protéines sont indispensables à la migration des CCN (Kil et al., 1996) (Alfandari et al., 2003).

#### 4) Délamination et contrôle du cycle cellulaire

Dans la région du tube neural troncal, les précurseurs des CCN semblent rentrer de manière synchrone en phase S du cycle cellulaire avant d'engager leur délamination. En effet, l'inhibition de la transition G1-S lors du cycle cellulaire de ces cellules bloque leur délamination sans pour autant altérer l'expression des gènes qui initient et contrôlent les différentes étapes de la TEM (Burstyn-Cohen and Kalcheim, 2002). De manière intéressante, les cellules exprimant le gène Snail-2 avant migration présentent des capacités faibles de prolifération, probablement à cause d'une part de la répression des Cyclines D1 et D2 par le facteur de transcription Snail-2 et d'autre part par l'induction de p21, molécule inhibitrice de l'activité enzymatique de la *cyclin-dependent kinase* (CDK). Lors de la délamination des CCN, l'expression du gène Snail-2 diminue dans ces cellules ce qui conduit *de facto* à une augmentation de celle des Cyclines et ainsi à la progression du cycle cellulaire (Vega et al., 2004). De plus, l'activation de la voie de signalisation Wnt dans un contexte dépendant de celle des BMP régulerait la transition G1-S en modulant la quantité de Cycline exprimée (Burstyn-Cohen et al., 2004).

Toutefois, la cinétique de délamination des CCN varie considérablement selon l'axe antéro-postérieur. Contrairement au niveau troncal, les CCN céphaliques effectuent une délamination massive et « explosive » ne nécessitant apparemment pas de synchronisation des précurseurs des CCN en phase S. Le facteur de transcription Ets-1 est responsable de ce mode de délamination en masse des CCN céphaliques. En effet, Ets-1 est spécifiquement exprimé par les CCN de la région céphalique et l'activité de ce facteur de transcription abolit la nécessité d'une transition G1-S lors de la délamination des CCN (Theveneau et al., 2007). De plus, les travaux de vidéomicroscopie en temps réel montrant la délamination des CCN de la région troncale d'embryon d'oiseau réalisés par l'équipe de Carol Erickson indiquent en fait que l'émergence des CCN ne s'effectue absolument pas de manière rigide et ne semble pas vraiment être associée au cycle cellulaire. Bien au contraire, cette étude met en évidence une véritable plasticité lors du départ en migration de ces cellules (Ahlstrom and Erickson, 2009).

**MATÉRIEL**

**ET**

**MÉTHODES**

## I. Embryons d'oiseau

Les œufs de poules fécondés (*Gallus Gallus*, souche Brown Leghorn JA-57) de source commerciale (Morizeau, Dangers, France) sont stockés à 15°C puis incubés à 38°C en atmosphère humide. Le stade de développement est déterminé en fonction de la table de Hamburger et Hamilton (HH) (Hamburger and Hamilton, 1951), de la durée d'incubation ou du nombre de somites. Les embryons sont opérés aux stades déterminés par les études envisagées puis prélevés en tampon phosphate (PBS 1X) et rapidement fixés.

## II. Expérimentations sur embryons

### 1) Transgénèse transitoire par Électroporation *in ovo*

#### a. *Protocole expérimental*

Les œufs fécondés sont incubés environ 36 heures puis les embryons sont opérés aux stades 10-15 somites (stades HH10 et HH12). Cinq-cents microlitres d'albumen sont extraits des œufs avant toute manipulation. Après ouverture de l'œuf, une légère entaille de l'enveloppe vitelline permet d'injecter à l'aide d'une micropipette en verre (Sigma-réf.P2049-1PAK) différentes constructions en fonction de la question scientifique posée sans pour autant excéder la concentration de 2 µg/µL de plasmide totale :

- Injection d'un mélange de constructions composé du plasmide pCAGG contenant la séquence nucléotidique codante complète du gène *Sox-2* d'oiseau sous contrôle des promoteurs du cytomégalovirus (CMV) et de la  $\beta$ -actine, possédant le gène de résistance à l'ampicilline (donné gracieusement par Kondho) et du plasmide pEGFP-N1 (GenBank U55762) (Promega-réf.6085-1) comportant la séquence codante complète du gène *GFP* sous contrôle uniquement du promoteur du cytomégalovirus (CMV) mais avec un gène de résistance à la kanamycine (pCAGG-*Sox2* + pEGFP-N1)
- Injection d'un mélange composé du plasmide pCDNA3.1 comportant la séquence codante complète du gène *BMP-4* de souris (provenant du laboratoire d'Eric Agius) ainsi que le plasmide pEGFP-N1 (pCDNA3.1-*BMP4* + pEGFP-N1)
- Injection d'un mélange composé du plasmide pCDNA3.1 comportant la séquence codante du gène *N-cadhérine* de souris (gentiment donné par Sylvie Dufour) ainsi que du plasmide pEGFP-N1 (pCDNA3.1-*Ncadhérine* + pEGFP-N1)

- Injection du plasmide pEGFP-N1 seul comme expérience contrôle

La micropipette est présentée en position tangentielle par rapport à l'embryon puis est introduite dans le tube neural par l'extrémité caudale de l'embryon. Les constructions sont ensuite injectées dans la lumière du tube neural troncal au-niveau de la région du mésoderme non-segmenté. Les électrodes sont placées de part et d'autre du tube neural et une électroporation unilatérale ou bilatérale est effectuée par l'envoi de cinq pulsations de 25 V à 50 ms d'interval. Cette technique présente l'avantage de permettre d'effectuer une transgénèse rapide et très localisée, contrairement à la technique de transgénèse par infection virale, beaucoup plus lente et moins ciblée. La visualisation de l'incorporation du transgène est facilitée par l'adjonction d'un traceur, le *Fast Green* (Sigma-réf.F7252). L'embryon est ensuite abondamment hydraté avec du PBS 1X stérile puis l'œuf est fermé hermétiquement avec du papier collant scotch et remis en incubation durant 24-36 heures.

#### *b. Fixation des embryons électroporés*

Après observation pour vérifier la viabilité et l'expression des transgènes à la loupe à épifluorescence, les embryons sont récoltés dans une plaque 24 puits puis fixés dans une solution Fish-Fix (CaCl<sub>2</sub> 0.12 M, tampon phosphate 0.12 M, pH = 7.2, sucrose 4% w/v) à 4% ou à 1% (w/v) de paraformaldéhyde (PFA) toute la nuit à 4°C sous agitation. Cette dernière fixation « douce » en PFA1% est indispensable pour l'analyse en immunohistochimie des facteurs de transcription. Les embryons sont ensuite rincés uniquement en tampon Fish (de même composition que le Fish-Fix mais sans fixateur) toute la journée à 4°C sous agitation pour poursuivre les expériences sur embryons entiers ou sont imprégnés ensuite en tampon phosphate 0.12 M-sucrose 15% jusqu'à sédimentation au fond des puits afin de garantir une cryoprotection optimale pour les coupes histologiques au cryostat.

#### *c. Inclusion et coupes au cryostat*

Les embryons sont enrobés d'une solution gélatine/sucrose (tampon phosphate 0.12 M, gélatine 7.5% w/v, sucrose 15% w/v), 2 heures à 40°C puis déposés sur une coupelle préalablement remplie de la même solution. Après avoir été orientés selon le type de coupe à effectuer et la région à étudier, les embryons sont placés à 4°C, congelés rapidement dans une solution d'Isopentane refroidie entre -70 et -80°C et conservés à -80°C. Des coupes de 20 µm d'épaisseur, pour des expériences d'hybridation *in situ*, et de 10-12 µm d'épaisseur, pour des

expériences d'immunohistologie, sont réalisées à l'aide d'un cryostat, puis récupérées sur lames SuperFrost®Plus (Menzel-Gläser).

## 2) Expériences de cartographie par utilisation de cristaux de DiI sur embryons en culture

### *a. Culture d'embryons d'oiseau*

Les œufs de poules fécondés sont incubés à 38°C en atmosphère humide jusqu'aux stades de développement préalablement définis. Les embryons d'oiseau sont mis en culture selon la technique mise au point par Chapman et *al.* : après avoir enlevé l'albumen des œufs, un pochoir circulaire de papier Whatman avec un motif en forme de trèfle en son centre est positionné sur l'embryon dont la surface a été préalablement asséchée. La membrane vitelline est découpée en périphérie du pochoir puis le blastoderme fixé à ce dernier est excisé de l'œuf, rincé délicatement dans une solution saline à 7% et enfin transféré dans une boîte de culture de 35 mm de diamètre, face ventrale déposée sur un milieu composé de 50% d'albumen fluide et 0.72g d'Agar (Gibco-réf.30391023) dilués dans une solution saline à 7% (Chapman et al., 2001).

### *b. Formation de cristaux de DiI*

Des microcristaux de colorants lipophiliques dérivés de la carbocyanine, le 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetraméthylindocarbocyanine perchlorate ou DiI (Sigma-réf.468495-100MG) sont générés selon la méthode mise au point par Kimura et *al.* : Le DiI en poudre est tout d'abord dissout à 0,5% (V/V) dans de l'éthanol absolu puis cette solution est diluée 1 :1 dans 50% de sucrose dissout dans de l'eau distillée (Solution 1). Une goutte de cette dernière solution (Solution 1) est déposée dans un grand volume de solution de Pannett et Compton (faire tomber la goutte de solution 1 d'une certaine hauteur représentant approximativement la longueur de l'avant-bras). Ceci va générer un petit précipité de petits cristaux de 5 à 30 µm de diamètres. Seuls des cristaux de 10 à 20 µm ont été utilisés pour cette étude (Kimura et al., 2006).

### *c. Dépôt de cristal*

Une incision est effectuée dans l'enveloppe vitelline des embryons en culture. Un microcristal de DiI est déposé à l'aide d'une micropipette en verre (Sigma-réf.P2049-1PAK) postérieurement au Nœud de Hensen d'embryons d'oiseau au stade HH8 (4/5 somites

(amplitude maximale du sinus rhomboïdal)) au stade HH12 (15 somites (fermeture du neuropore postérieur)). Après le dépôt du microcristal, les embryons marqués sont incubés 24 h à 37°C en milieu humide dans un incubateur sous 5% de CO<sub>2</sub>. Les embryons sont ensuite photographiés puis fixés en PFA 4% afin d'effectuer ultérieurement des analyses histologiques.

**Solution de Panett et Compton (1924)**

<u>Solution A:</u> NaCl	121,0g
KCl	15,5g
CaCl <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O	10,42g
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,4g
H <sub>2</sub> O	Qsp 1L

<u>Solution B:</u> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,9g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15g
H <sub>2</sub> O	Qsp 1L

On mélange dans l'ordre suivant 40 mL de Solution A, 900 mL d'H<sub>2</sub>O et 60mL de Solution B

3) Etude du mouvement des cellules de surface par utilisation de CFDA-SE sur embryons en culture

*a. Principe*

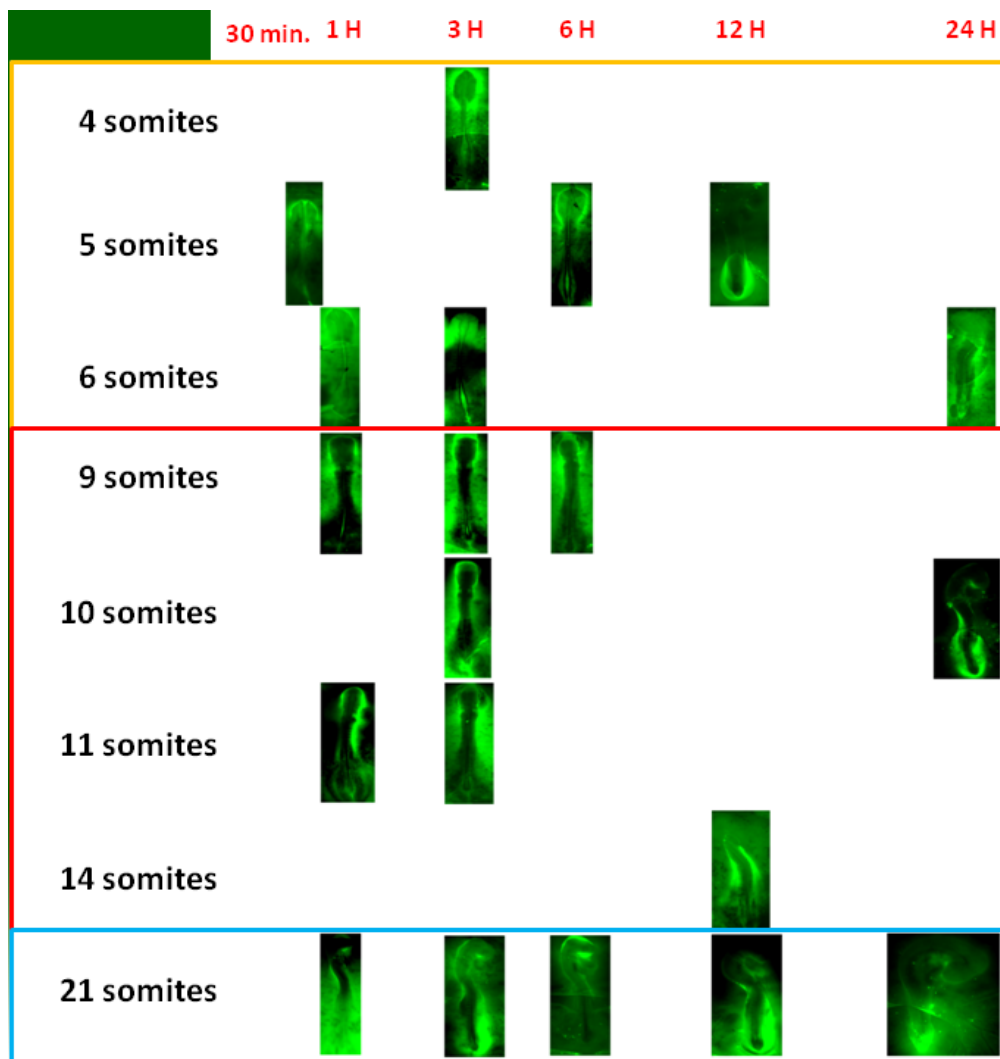
Le Carboxyfluorescéine succinimidyl ester (CFSE) est un marqueur cellulaire fluorescent. Le CFSE est généralement confondu avec le carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester (CFDA-SE), bien qu'elles ne soient pas strictement les mêmes molécules. Le CFDA-SE, en raison de ses groupement acétates, est fortement perméable et va donc immédiatement être intégré dès contact entre le marqueur et la cellule. Le CFDA-SE, molécule non-fluorescente, pénètre ainsi dans le cytoplasme des cellules en contact, va perdre ses groupements acétates par action d'estérases cytosoliques (ce qui va libérer le groupement ester responsable de la fluorescence) et ainsi être converti en molécule fluorescente, le CFSE. La molécule fluorescente, CFSE, enfin démasquée va se lier de façon covalente, via son groupe succinimidyl, aux molécules intracellulaires et être ainsi retenue dans la cellule de façon stable pour une période assez longue allant jusqu'à 7 à 8 cycles cellulaires dans les conditions

expérimentales optimales. Aussi, en raison de ces interactions stables, une fois incorporé dans la cellule, le marquage fluorescent n'est pas transféré aux cellules adjacentes contrairement aux marqueurs lipophiliques membranaires tels que le DiI ou DiO.

Il s'agit donc d'un outil puissant dans l'étude de la prolifération cellulaire mais dans notre cas, il devient un moyen non invasif de suivre et d'analyser les mouvements de cellules épithéliales de surface permettant ainsi de mettre en évidence des phénomènes d'invagination ou de ségrégation cellulaire. Cette puissante technique permet en fin de compte de retracer l'histoire d'une cellule épithéliale de surface sans traumatiser l'ensemble de l'organisme comme lors d'expériences de transgénèse transitoire par électroporation à des stades très précoces du développement embryonnaire.

#### *b. Protocole expérimental*

L'ensemble des expériences de traçage cellulaire se fait sur des embryons en culture (cf 2a). Une incision est effectuée dans l'enveloppe vitelline des embryons d'oiseau en culture et approximativement 10  $\mu$ L de CFDA-SE (Sigma-réf.21888-25MG-F) sont déposés à l'aide d'une micropipette en verre sur des embryons d'oiseau à différents stades de développement et dans différentes régions anatomiques selon l'axe antéro-postérieur afin de suivre les différents mécanismes de formation du système nerveux central. Deux rinçages au PBS 1X sont effectués au bout d'1 heure d'exposition afin d'éliminer l'excès de marqueur et de stopper ainsi une incorporation continue de CFDA-SE. Les embryons opérés sont ensuite mis en incubation à 37°C en milieu humide dans un incubateur sous 5% de CO<sub>2</sub> et prélevés 30 min/1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 18 h et 24 h après manipulation (Figure 26). Les embryons sont ensuite photographiés puis fixés en PFA 4% ou PFA 1% afin d'effectuer ultérieurement des analyses histologiques.



#### Protocole expérimental de l'étude des mouvements des cellules de surface à l'aide du marqueur CFDA-SE

Dix  $\mu\text{L}$  de CFDA-SE ont été déposés sur des embryons d'oiseau à différents stades du développement embryonnaire puis prélevés 30min/1h, 3h, 6h, 12h et 24h postopératoire. *Carré jaune* : stades du développement embryonnaire lors de l'injection du CFDA-SE afin de suivre les mouvements cellulaires impliqués lors de la neurulation primaire ; *Carré rouge* : neurulation intermédiaire ; *Carré bleu* : neurulation secondaire

#### 4) Expériences de perte de fonction par lipofection sur embryons en culture

##### a. *SiRNA*

Trois SiRNA dont un couplé à la fluorescéine reconnaissant différentes régions de chaque gène d'intérêt et le SiRNA contrôle universel ont été *designés* et produits par la société Eurogentec.



Pour les expériences de perte de fonction d'un gène spécifique, un mélange des trois SiRNA a été utilisé afin d'obtenir une extinction optimale.

<i>Gènes</i>	<i>Séquences nucléotidiques</i>
<i>Prickle 1 – SiRNA.1</i>	<b>Sens</b> : 5'-GGGCAGAUCUACUGUUCAA-3' <b>Anti-sens</b> : 5'-UUGAACAGUAGAUCUGCCC-3'
<i>Prickle 1 – SiRNA.2</i>	<b>Sens</b> : 5'-CAUGGGAACUCUGAAUUCU-3' <b>Anti-sens</b> : 5'-AGAAUUCAGAGUUCCCAUG-3'
<i>Prickle 1 – SiRNA.3</i>	<b>Sens</b> : 5'-GGCAAGCUUUGUUAACGAA-3' <b>Anti-sens</b> : 5'-UUCGUUAACAAAGCUUGCC-3'
<i>Vangl 2 – SiRNA.1</i>	<b>Sens</b> : 5'-CUCGGGCUACUCAUACAAA-3' <b>Anti-sens</b> : 5'-UUUGUAUGAGUAGCCCGAG-3'
<i>Vangl 2 – SiRNA.2</i>	<b>Sens</b> : 5'-GCCAUAUGAGUACUACUA-3' <b>Anti-sens</b> : 5'-UAGUAGUACUCAUUAUGGC-3'
<i>Vangl 2 – SiRNA.3</i>	<b>Sens</b> : 5'-GCAUCUCACACGAUGACAU-3' <b>Anti-sens</b> : 5'-AUGUCAUCGUGUGAGAUGC-3'

#### *b. Formation des vecteurs lipidiques ou lipoplexes*

Un volume équivalent d'une suspension de liposome cationique fluorescent (lipide cationique DMAPAP 95% / lipide neutre DOPE 5% / DOPE-Rhodamine 5%) à 20 mM de DMAPAP dans l'eau est ajouté à la suspension de SiRNA et d'alginate de sodium. Le mélange est ensuite vigoureusement vortexé. La formation de ces lipoplexes met en jeu un équilibre subtil entre charges négatives apportées par le mélange SiRNA/Alginate de Sodium et charges positives des lipides cationiques. Ainsi, 1 µg de SiRNA et 1 µg d'Alginate de Sodium (Sigma-Aldrich-Réf.180947) forment des complexes avec 10,9 nmol de liposomes cationiques dans une solution de 150 mM de NaCl. En considérant que 3 moles de charges positives sont apportées par chaque mole de liposome cationique (DMAPAP ou 2-3[-Bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino]-N-ditétradecyl carbamyl methyl-acetamide)) à pH physiologique, 3,11 nmoles de charges négatives sont apportées pour 1 µg de SiRNA et 5,08 nmoles de charges négatives pour 1 µg d'Alginate de Sodium, dans ces conditions expérimentales, le rapport de charges positives portées par les groupement Amine sur les charges négatives portées par les groupements Phosphate est de 4 (R= 4). Après avoir mélangé vigoureusement le mélange Liposomes-SiRNA/Alginate de Sodium pendant 15 minutes, le mélange est laissé à incuber au-moins 20 minutes à température ambiante afin de permettre la formation des lipoplexes.

### *c. Protocole expérimental*

L'ensemble des expériences de lipofection se fait sur des embryons en culture (cf 2a). Une incision est effectuée dans l'enveloppe vitelline des embryons d'oiseau en culture et approximativement 10  $\mu$ L de lipoplexes sont déposés à l'aide d'une micropipette en verre au niveau du sinus rhomboïdal, dans une région postérieure au Nœud de Hensen, d'embryons d'oiseau de 30 heures de développement (environ 5/6 somites). ). Après injection des lipoplexes, les embryons opérés sont incubés 18-20 h à 37°C en milieu humide dans un incubateur sous 5% de CO<sub>2</sub>. Les embryons sont ensuite photographiés puis fixés en PFA 4% ou 1% afin d'effectuer ultérieurement des analyses histologiques.

## **III. Hybridation In Situ**

Les sondes reconnaissant les ARNm des gènes suivant ont été utilisées pour les expériences d'hybridation *in situ* : *cBMP4* (P.Brickell), *mBMP4* (D.Duprez), *Brachyury* (K.Storey), *Chordin* (De Robertis), *Cadhérine-6B* (M.Takeichi), *Cadhérine 7* (M.Takeichi), *Claudin-1* (A.Ryan), *E-Cadhérine* (W.Gallin), *FGF8* (G.Martin), *FoxD3* (C.Ericson), *Msx1* (A.H.Mosoro-Burq), *N-Cadhérine* (M.Takeichi), *RhoB* (Y.de Curtis), *Snail1* (A.Nieto), *Snail2/Slug* (A.Nieto), *Sox2* (M.Catala), *Sox10* (P.Scotting), *Tbx6L* (S.Mackem), *Twist* (ChEST0090B17) et *ZEB2/Sip1* (ChEST0313G23) (ces deux dernières sondes ont été synthétisées à partir de séquences EST produites et trouvées sur la banque de la BBSRC-UMIST ChickEST et ont été clonées par ARK Genomics (UK)).

### 1) Plasmides

Les séquences nucléotidiques codantes des différents gènes d'intérêt d'oiseau ont été clonées dans des plasmides Bluescript SK ou KS contenant le gène de résistance à l'ampicilline. La séquence codant pour la partie 3' terminale (4160 pb) de la *E-cadhérine* de poulet a été clonée quant à elle dans un plasmide KB4 contenant également le gène de résistance à l'ampicilline.

### 2) Sondes

#### *a. Transformation Bactérienne*

Vingt-cinq microlitres de bactéries compétentes sont mises en présence du plasmide voulu pendant 20 minutes sur glace puis 5 minutes à 37°C. Cinq cents microlitres de milieu LB sont ajoutés au mélange. Celui-ci est ensuite remis à 37°C pendant 1 heure. Cent microlitres de bactéries transformées sont ensuite étalés par boîte de Pétri sur milieu sélectif avec

ampicilline (ou kanamycine), puis en culture à 37°C toute la nuit. Une colonie est ensuite prélevée puis mise en culture dans 100 ml de milieu LB + 0,5 µl/ml d'ampicilline (ou kanamycine) à 37°C sous agitation. Un culot de bactéries transformées, exprimant le plasmide d'intérêt, est obtenu après deux centrifugations à 5000 rpm à 4°C pendant 15 minutes puis stocké à -20°C. L'ADN plasmidique est ensuite purifié à l'aide d'un kit d'extraction et de purification (QIAGEN), puis resuspendu dans 50 µl d'eau et laissé à 4°C toute la nuit. La concentration des ADN plasmidiques extraits est évaluée par lecture de la densité optique à 260 nm.

#### *b. Linéarisation*

Vingt microgrammes d'ADN plasmidique sont utilisés. Les plasmides sont linéarisés à l'aide d'enzyme de restriction (0,4 U/µl) et d'un tampon spécifique dans un volume final de 100 µl (Tableau 1). La réaction de linéarisation se fait à 37°C pendant 2 heures. Cent microlitres de phénol sont ajoutés au mélange réactionnel puis l'ensemble est resuspendu, centrifugé pendant 5 minutes à 13000 rpm afin de conserver le surnageant d'ADN linéarisé. Le même protocole est répété afin de purifier le culot d'ADN plasmidique linéarisé par ajout successif de 100 µl de phénol/chloroforme et 100 µl de chloroforme. Le surnageant est ensuite précipité dans un tampon constitué de 2 volumes d'éthanol 100% et de 1/10 volume d'acétate de sodium (3 M, pH = 5,2) à -80°C pendant 30 minutes. Après centrifugation à 13000 rpm pendant 15 minutes, le culot d'ADN linéarisé est rincé dans 200 µl d'éthanol 70% afin d'éliminer les sels. Le mélange est centrifugé une dernière fois pendant 10 minutes à 13000 rpm. Le culot d'ADN plasmidique linéarisé est enfin repris dans 20 µl d'eau puis stocké à -20°C.

#### *c. Synthèse de sonde*

Les sondes utilisées sont des ARN anti-sens couplés à la digoxygénine. Un microlitre de plasmide linéarisé est incorporé dans un mélange réactionnel composé de tampon de transcription 2X (Promega) (Tableau 1), de dithiothreitol (DTT) 0,1M, d'un mélange de nucléotides couplés à la digoxygénine, DIG RNA labeling Mix 2X, de 5 U d'inhibiteur de Rnase et de 10 U de polymérase T3 ou 20 U de polymérase T7. La réaction de synthèse de sonde se fait à 37°C pendant 2 heures. Afin d'arrêter la synthèse, 20 U de Dnase 1 (Promega) sont ajoutés et le mélange est mis à incuber 15 minutes à 37°C. Le volume final du mélange est ajusté à 50 µL. Les sondes néo-synthétisées sont ensuite purifiées sur colonnes Probe Quant G50 (GE Healthcare), puis conservées à -20°C.

Sonde	Enzyme de restriction	RNA polymérase
BMP-4 (Poulet)	Xba I	T3
BMP-4 (souris)	Eco-R1	Sp6
Brachyury	Xba I	T3
Cadhérine-6B	NdE-1	T3
Cadhérine 7	Ecor-R1	T3
Chordin	Sal I	T7
Claudin-1	Xho-I	T7
E-Cadhérine	Kpn-1	T7
FGF-8	Eco-R1	T7
FoxD3	Xho-I	T3
Msx-1	Eco-R1	T3
N-Cadhérine	Eco-R1	T3
RhoB	Eco-R1	T3
Snail-1	Nco I	Sp6
Snail-2/Slug	Eco-R1	T7
Sox-2	BamH-1	T7
Sox-10	Hind-III	T3
Tbx-6L	Xba I	T7
Twist	Not 1	T3
ZEB-2/Sip1	Not 1	T3

**Tableau 1** : Description des sondes utilisées dans les expériences d'hybridation in situ.

### 3) HIS in Toto

Les embryons fixés et déposés dans une plaque 24 puits sont incubés en présence de sondes (1 µg/ml) diluées dans 1 ml de tampon d'hybridation (Sels 1X, formamide 50%, dextrane sulfate 0.1%, 1mg/ml d'ARN de levure, Denhardt's 1X) préalablement préchauffé à 65°C. L'hybridation est réalisée toute la nuit à 65°C.

Après hybridation, les embryons sont rincés deux fois 30 minutes à 65°C en tampon de lavage (SSC 1X, formamide 50%, Tween20 0.1%), puis deux fois 1 heure dans une solution de MABT (acide maléique 100 mM, NaCl 150 mM, Tween20 0.1%). Les embryons sont ensuite

saturés par une solution de blocage (solution MABT, sérum d'agneau 10%, agent bloquant (Roche) 10%) pendant au-moins 1 heure à température ambiante. Les lames sont ensuite incubées en présence d'anticorps anti-digoxygénine (dilués au 1/2000 dans la solution de blocage) à température ambiante. Les lames sont lavées quatre fois 30 minutes dans la solution MABT puis deux fois 10 minutes dans le solution de marquage NTMT (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, Tris HCl 100 mM pH=9.5, Tween20 0.1%). L'anticorps est finalement révélé par la réaction induite par la solution de révélation (solution NTMT, NBT (4,5 µl/ml), BCIP (3,5 µl/ml)) à l'abri de la lumière, à température ambiante. La réaction chimique est arrêtée par deux rinçages en PBS 1X.

#### 4) HIS sur coupes

Les coupes sont dégelées à 4°C pendant au-moins 30 minutes. Les sondes (1 µg/ml) sont diluées dans 1 ml de tampon d'hybridation (Sels 1X, formamide 50%, dextrane sulfate 0.1%, 1mg/ml d'ARN de levure, Denhardt's 1X) préchauffé à 65°C. Les lames sont placées dans une chambre humidifiée d'une solution de sels 1X/ formamide 50% et 500 µl de sonde diluée sont déposés sur chaque lame. Les lames sont ensuite recouvertes d'une lamelle permettant d'une part un dépôt homogène de sonde sur l'ensemble de la surface de la lame et d'autre part de limiter l'assèchement des coupes. L'hybridation est réalisée toute la nuit à 65°C. Le reste de l'expérience se fait de manière similaire à l'HIS *in Toto*. Enfin, la réaction chimique est arrêtée par plusieurs rinçages en PBS 1X puis les lames sont montées à l'Aquatex<sup>®</sup> (Merck).

### IV. Immunohistochimie

#### 1) Immunohistochimie *in Toto*

Les embryons fixés en PFA 4% sont rincés trois fois 10 minutes en PBS 1X puis 15 minutes en solution PBT (PBS + 0.1 % Triton X-100). Les objets sont ensuite incubés dans une solution de saturation PBTL (PBS + 0.1% Triton X-100 + Sérum d'agneau 20%) pendant 2 heures à température ambiante puis incubés avec les anticorps anti-fibronectine toute la nuit à température ambiante. Les embryons sont ensuite rincés quatre ou cinq fois 10 minutes en PBT puis sont incubés avec les anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à un fluorochrome (Invitrogen) pendant 3 heures à température ambiante. Les embryons sont enfin rincés en PBS 1X quatre ou cinq fois 10 minutes et sont finalement photographiés.

## 2) Immunohistochimie sur coupes

Les lames sont dégélatinisées pendant 1 heure et demie dans une solution de PBS à 37°C. Pour la détection de la E-Cadhérine, de la N-cadhérine, de Sox-2, de Snail-2, de la  $\beta$ -caténine et de la fibronectine, les lames sont rincées deux fois 5 minutes en PBS puis en solution PBT. Un préblocage des coupes est effectué en utilisant une solution de PBTL (PBS + 0.1% Triton X-100 + Sérum d'agneau 20%) pendant 5 minutes à température ambiante puis les coupes sont bloquées pendant 30 minutes à 4°C avec la même solution de saturation. Les lames sont incubées avec les anticorps primaires (Tableau 2) toute la nuit à 4°C en chambre humide. Les lames sont ensuite rincées deux fois 10 minutes dans une solution de PBT puis prébloquées dans une solution de PBTL 15 minutes à température ambiante et sont enfin incubées avec les anticorps secondaires pendant 1 heure à température ambiante. Après deux rinçages en PBT, les lames sont incubées 15 minutes avec une solution diluée au 1/500<sup>e</sup> de DAPI (4',6-DiAmidino-2-PhenylIndol), un agent intercalant de l'ADN, afin d'observer la morphologie des noyaux cellulaires puis après deux rinçages en PBT, puis des rinçages en PBS, les lames sont enfin montées à l'Immunomount<sup>®</sup> (DakoCytomation). Pour la détection de l'épitope HNK1, le traitement est sensiblement le même sauf que le Triton est omis de toutes les étapes.

## 3) Marquage de la F-actine sur des coupes histologiques froides d'embryons

Les coupes d'embryons d'oiseau de 10-12 $\mu$ m d'épaisseur sont incubées, après dégélatinisation, avec 0,1  $\mu$ M de Phalloïdine-TRITC (P1951, Sigma) dilué dans du PBS 1X pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après de nombreux rinçages en PBS 1X, les coupes sont ensuite incubées 15 minutes avec une solution diluée au 1/500<sup>e</sup> de DAPI (4',6-DiAmidino-2-PhenylIndol, Sigma), les lames sont enfin montées à l'Immunomount<sup>®</sup> (DakoCytomation).

Anticorps	Description	Source
<b>Anti-ECadhérine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticorps monoclonal</li> <li>• Produit chez la souris</li> <li>• Ecad murine</li> <li>• Reconnaît un site de la queue cytoplasmique</li> <li>• <u>dilution 1/1000</u></li> </ul>	BD Biosciences
<b>Anti-NCadhérine (FA5 et GC4)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticorps monoclonal</li> <li>• Produit chez la souris</li> </ul>	SIGMA

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ncad aviaire</li> <li>• Reconnassent un épitope proche de l'extrémité N-terminale de la protéine</li> <li>• <u>dilution 1/1000</u></li> </ul>	
<b>Anti-NCadhérine (ID723)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticorps monoclonal</li> <li>• Produit chez la souris</li> <li>• Ncad aviaire</li> <li>• Reconnait un site proche de la membrane cellulaire</li> <li>• <u>dilution 1/10</u></li> </ul>	SIGMA
<b>Anti-Sox2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticorps polyclonal</li> <li>• Produit chez le lapin</li> <li>• Sox2 humain</li> <li>• <u>dilution 1/200</u></li> </ul>	Abcam
<b>Anti-Snail2 (clone 62.IE6)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticorps monoclonal</li> <li>• Produit chez la souris</li> <li>• Snail2 aviaire</li> <li>• <u>dilution 1/1000</u></li> </ul>	Developmental Study Hybridoma Bank at the University of Iowa
<b>Anti-βcaténine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticorps monoclonal</li> <li>• Produite chez la souris</li> <li>• <u>dilution 1/1000</u></li> </ul>	
<b>Anti-HNK1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticorps monoclonal</li> <li>• Produit chez la souris</li> <li>• NC1 aviaire</li> <li>• glycolipides de surface</li> <li>• dilution 1/10</li> </ul>	Produit au laboratoire ( <i>Tucker et al. 1984</i> )
<b>Anti-Fibronectine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticorps polyclonal</li> <li>• Produit chez le lapin</li> <li>• FN humaine</li> <li>• dilution 1/1000</li> </ul>	Produit au laboratoire ( <i>Rovasio et al. 1983</i> )
<b>Anti-IgM de souris</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticorps secondaire couplé au fluoro-chrome Alexa 555</li> <li>• dilution 1/200</li> </ul>	Invitrogen
<b>Anti-IgG de lapin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticorps secondaire couplé au fluoro-chrome Alexa 555</li> <li>• dilution 1/200</li> </ul>	Invitrogen

**Tableau 2** : Description des différents anticorps utilisés lors de ces études

## V. Immunoprécipitation de chromatine

### 1) Extraction du matériel nucléaire d'embryons d'oiseau

Approximativement 20 embryons d'oiseau d'environ 30h d'incubation (5/6 somites ou stade HH8) ont été prélevés et broyés mécaniquement au Fast Prep 24 (4x30sec à 0.4m/s) dans une solution A d'extraction composée de 2,2 M sucrose, de 3mM CaCl<sub>2</sub>, de 10mM Tris HCl pH7.5, de 0,5% Triton X100 et d'un ensemble d'anti-protéases (1mM Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride (PMSF), 1mg/ml Aprotinine et 10mg/ml Pepstatine). Le broyat est ensuite centrifugé à 53 000 rpm à 4°C pendant 3 h. Le culot contenant les noyaux cellulaires est resuspendu dans 1mL d'une solution B composée de 2,2 M sucrose, de 3mM CaCl<sub>2</sub>, de 10mM Tris HCl pH7.5 et du même mélange d'anti-protéases (1mM Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride (PMSF), 1mg/ml Aprotinine et 10 mg/ml Pepstatine). La suspension nucléaire est centrifugée à 6000g à 4°C pendant 5min. Le culot nucléaire est finalement resuspendu dans 360 µL de solution B puis les protéines interagissant à l'ADN sont fixées à la formaldéhyde 37% 10 min. sur glace puis 20 min. à température ambiante. L'ensemble est ensuite centrifugé à 6000g à 4°C pendant 5 min. puis le culot est resuspendu dans 400 µL d'un tampon de lyse composé de SDS 10%, d'EDTA 0,5M à pH8 et de Tris HCl pH8,1 auquel est rajouté des anti-protéases (1mM Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride (PMSF), 1mg/ml Aprotinine et 10 mg/ml Pepstatine) et le mélange matériel nucléaire-tampon de lyse est enfin incubé 10 min. sur glace

### 2) Sonication

Le lysat est ensuite soniqué pendant 10 secondes 18 fois avec des intervalles de 4 min. sur glace afin de refroidir la suspension.

### 3) Immunoprécipitation de la chromatine

Les fragments de chromatine sont ensuite récupérés après une centrifugation à 13000 rpm à 4°C pendant 10min. La quantité d'ADN est ensuite obtenue par mesure de la Densité Optique (DO). L'immunoprécipitation de la chromatine est réalisée à l'aide du kit industriel *Immunoprecipitation (ChIP) Assay kit* (Millipore, Temecula CA 92 590). 30 µg d'ADN sont dilués dans 1 mL de tampon *ChIP dilution buffer* du kit auquel est ajouté un mélange d'anti-protéases (1mM Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride (PMSF), 1mg/ml Aprotinine and 10 mg/ml Pepstatine) et du tampon de lyse (*SDS lysis buffer*) puis la suspension est préincubée dans un mélange de billes de sépharose-protA/sperme de saumon issu du kit sur roue pendant 1h à 4°C. Les suspensions sont ensuite centrifugées à 3000 rpm à 4°C pendant 5 min. 1 mL de



surnageant est ensuite ajouté aux anticorps : 25  $\mu\text{L}$  d'anticorps anti-Sox2 et 8 $\mu\text{L}$  d'anticorps anti-Histone H4 acétylé comme contrôle positif. Les échantillons avec anticorps sont incubés sur roue la nuit à 4°C. Les échantillons-contrôles ou *input* sans anticorps sont stockés à -20°C. Le lendemain, 60  $\mu\text{L}$  d'une suspension de billes de sépharose-protA issu du kit sont ajoutés aux échantillons et l'ensemble est mis à incuber sur roue 1h à 4°C. Après une centrifugation à 3000 rpm pendant 3 min. à 4°C, les culots sont rincés 5 fois 5 min. à 4°C sur roue avec plusieurs tampons successifs issus du kit. Tout d'abord, 1 mL de *Low salt immune complex wash buffer* (0.1% SDS, 1% triton X100, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 8.1), puis 1mL de *High salt immune complex wash buffer* (0.1% SDS, 2mM EDTA, 1% Triton X100, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 500mM NaCl), puis 1mL de *LiCl immune complex wash buffer* (0.25M LiCl, 1% deoxycholate, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8.1) et 2 fois 1ml de tampon Tris 1X/EDTA (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0). Après le dernier rinçage et la dernière centrifugation, le culot est resuspendu dans 250  $\mu\text{L}$  de solution d'éluion (1% SDS, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>). Les échantillons sont vortexés puis incubés sur roue pendant 15 min. à température ambiante. Cette étape est répétée 2 fois et entraîne la dissociation des complexes billes de sépharose/Anticorps/Chromatine. A chaque fois, le surnageant est conservé. 20  $\mu\text{L}$  de NaCl (5M) sont ajoutés aux surnageants et aux échantillons-contrôles-*input* préalablement conservés à -20°C. Les échantillons expérimentaux sont ensuite incubés à 65°C au bain-marie pendant 4h afin d'inhiber toutes réassociations ADN-protéines en dénaturant ces dernières. Après ajout de 10  $\mu\text{L}$  d'EDTA (0,5M), de 20  $\mu\text{L}$  de Tris HCl (1M pH6,5), de 1  $\mu\text{L}$  de Protéinase K (20 mg/mL), les échantillons sont encore incubés à 45°C au bain-marie pendant 1h. Les fragments de chromatine sont ensuite purifiés des protéines par une extraction au Phénol/Chloroforme. Le mélange vortexé est centrifugé à 6000 rpm pendant 5 min à température ambiante. L'ADN est ensuite précipité la nuit à -20°C après ajout de 3  $\mu\text{L}$  de glycogène et 1 mL d'éthanol 100% au surnageant. Après une centrifugation à 13000 rpm à 4°C pendant 30 min., le culot est resuspendu dans 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol 70% puis centrifugé dans les mêmes conditions pendant 5 min. Le culot est ensuite asséché pendant 15 min. à température ambiante puis resuspendu dans 20  $\mu\text{L}$  d'eau *nuclease-free* (DEPC) dans le cas des échantillons immunoprécipités et 40  $\mu\text{L}$  dans le cas des échantillons contrôles ou *input*.

#### 4) Analyse des résultats par PCR

Les produits de ces immunoprécipitations de chromatine sont analysés par PCR. Chaque fragment est amplifié par une paire d'amorces spécifiques de régions des promoteurs des

gènes d'intérêt. 2  $\mu$ L d'ADN sont incorporés dans un mélange réactionnel composé de 25  $\mu$ L de *PCR Master mix* (ABGENE, Thermo scientific), de 2  $\mu$ L de chaque amorce spécifique du promoteur du gène d'intérêt pour un volume final de 50  $\mu$ L.

15  $\mu$ L de produit issu des PCR sont déposés sur gel d'agarose 1% puis après migration, le gel est analysé sous lumière ultraviolette.

## **VI. Acquisition et traitement des images**

Tous les embryons entiers ont été photographiés à l'aide d'une caméra couleur Nikon DXM1200 couplée à une loupe Leica MZFLIII. Les coupes histologiques analysées par Hybridation in Situ ou par Immunohistochimie ont été acquises par une caméra *Evolution VF cooled monochrome* couplée à un microscope Nikon Eclipse E800 à l'aide du logiciel Image-Pro Plus (Media Cybernetics). Le traitement des images numériques a ensuite été réalisé à l'aide du logiciel Adobe Photoshop CS3.

# RÉSULTATS

## Partie 1

### *Cinétique de la transition E-/N-Cadhérine au cours de la neurulation chez l'oiseau*

Lors du développement embryonnaire, les changements de répertoire d'expression de cadhérines, molécules dont la fonction dans l'adhérence intercellulaire est dépendante des ions calcium, sont souvent associés à des mécanismes tissulaires et cellulaires importants tels que la Transition Epithélium-Mésenchyme (TEM). Lors de la formation du système nerveux central des vertébrés a lieu une transition E-/N-cadhérine à la surface des cellules du neuroépithélium mais contrairement aux carcinomes, ce changement dans le répertoire des cadhérines exprimées par les cellules du futur tube neural ne conduit pas à une TEM. De plus, ni le moment exact ni la signification biologique de cette transition E-/N-cadhérine ne sont connus.

Nous avons ainsi analysé précisément la cinétique de la transition E-/N-cadhérine à la surface des cellules neurales au cours de la neurogenèse précoce d'oiseau. Pour se faire, nous avons étudié les profils d'expression de ces cadhérines ainsi que leurs régulateurs depuis l'induction de la plaque neurale jusqu'à la formation du tube neural. Il apparaît ainsi que le programme moléculaire conduisant au changement d'expression E-/N-cadhérine par les cellules neurales varie considérablement le long de l'axe antéro-postérieur. En effet, rostralement, dans la région anatomique où la neurulation se fait selon un mode primaire, **cette transition de cadhérines se fait très progressivement à la fois dans l'espace et le temps montrant aucune corrélation évidente avec les changements de morphologie cellulaire observés lors de l'induction neurale (les cellules de la plaque neurale de forme cuboïde s'allongent pour devenir pavimenteuses) ni de synchronicité avec les mouvements morphogénétiques de la neurulation contrairement au modèle communément admis. Caudalement, dans la région où le tube neural se forme selon une neurulation secondaire, il n'y a pas de transition E-/N-cadhérine car le tube neural ne se forme qu'à partir de cellules exprimant déjà et uniquement la N-cadhérine.**

De plus, lors de la neurogenèse, cette transition de cadhérines est orchestrée par une combinaison spécifique de facteurs de transcription dans les cellules neurales: ZEB-2/SIP-1, comme répresseur de la E-cadhérine, et Sox-2, comme inducteur de la N-cadhérine.

**Nos résultats montrent ainsi que le répertoire spécifique de cadhérines exprimé par les cellules du tube neural définit des populations bien distinctes. De plus, le changement très progressif au cours du développement embryonnaire du répertoire de cadhérines à la surface des cellules du tube neural sous le contrôle de facteurs de transcription distincts de ceux retrouvés lors de la gastrulation semble expliquer l'absence de Transition Épithélium-Mésenchyme de le neuroépithélium.**

# Timing and Kinetics of E- to N-Cadherin Switch During Neurulation in the Avian Embryo

Alwyn Dady,<sup>1,2</sup> Cedrine Blavet,<sup>1,2</sup> and Jean-Loup Duband<sup>1,2\*</sup>

**Background:** During embryonic development, cadherin switches are correlated with tissue remodelings, such as epithelium-to-mesenchyme transition (EMT). An E- to N-cadherin switch also occurs during neurogenesis, but this is not accompanied with EMT. The biological significance of this switch is currently unknown. **Results:** We analyzed the timing and kinetics of the E- to N-cadherin switch during early neural induction and neurulation in the chick embryo, in relation to the patterns of their transcriptional regulators. We found that deployment of the E- to N-cadherin switch program varies considerably along the embryonic axis. Rostrally in regions of primary neurulation, it occurs progressively both in time and space in a manner that appears neither in connection with morphological transformation of neural epithelial cells nor in synchrony with movements of neurulation. Caudally, in regions of secondary neurulation, neurogenesis was not associated with cadherin switch as N-cadherin pre-existed before formation of the neural tube. We also found that, during neural development, cadherin switch is orchestrated by a set of transcriptional regulators distinct from those involved in EMT. **Conclusions:** Our results indicate that cadherin switch correlates with the partition of the neurectoderm into its three main populations: ectoderm, neural crest, and neural tube. *Developmental Dynamics* 241:000–000, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** E-cadherin; N-cadherin; Snail-2; Zeb-2; Sox-2; epithelium-to-mesenchyme transition; neural induction; neurulation; neural tube; neural crest; chick embryo

## Key findings:

E- to N-cadherin switch during neurulation reflects the partition of the neurectoderm into its main populations, neural tube, neural crest, and ectoderm.

E- to N-cadherin switch during neurulation is not synchronized with movements of neurulation.

E-to N-cadherin switch during neurulation is orchestrated by a specific set of transcription regulators distinct from those involved in EMT.

Accepted 1 June 2012

## INTRODUCTION

Cadherins compose a large family of calcium-dependent cell surface molecules involved in the maintenance of tissular cohesion by mediating cell adhesion and cell recognition (Tepass et al., 2000; Yagi and Takeichi, 2000). Among them, classical cadherins are

structurally related and share in common several basic functional features. Their extracellular domain is implicated in cis- and trans-binding to other cadherin molecules and to growth factor receptors, and their intracellular part is connected with the actin network by catenins. At the cellular level, classical cadherins are

concentrated in adherens junctions where they provide a mechanical link between the cell membrane and the cytoskeleton and activate a variety of signaling cascades regulating cytoskeletal dynamics and intracellular trafficking (Braga, 2002; Perez-Moreno et al., 2003; Nelson and Nusse, 2004).

<sup>1</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Laboratoire de Biologie du Développement, Paris, France

<sup>2</sup>CNRS, Laboratoire de Biologie du Développement, Paris, France

Grant sponsor: CNRS; Grant sponsor: Université Pierre et Marie Curie; Grant sponsor: Association pour la Recherche contre le Cancer; Grant number: 3524.

\*Correspondence to: Jean-Loup Duband, Laboratoire de Biologie du Développement, Université Pierre et Marie Curie, 9 quai Saint-Bernard, 75005 Paris, France. E-mail: jean-loup.duband@upmc.fr

DOI 10.1002/dvdy.23813

Published online 00 Month 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Classical cadherins are expressed by almost every cell type of the body, including epithelia, neurons, fibroblasts, and even in primordial germ cells, and they exert profound and varied effects on cell behavior and tissue organization both during embryonic development and in the adult (Halleib and Nelson, 2006). In polarized epithelia, in the nervous system, and in muscles, they are able to support stable contacts between cells, thereby ensuring strong cohesion among them, and also contribute to the establishment of cell polarity and formation of barriers between tissular compartments. Conversely, in mesenchymal tissues or in undifferentiated cells, cadherins participate in dynamic morphogenetic events and mediate labile cell contacts allowing cell recognition, sorting, and migration. The differences in the ability of cells to establish either firm, stable, or labile contacts reside primarily in the type of cadherin expressed and in its prevalence on the cell's surface (Patel et al., 2003). Epithelial cells typically express E-cadherin whereas mesenchymal cells express various other cadherins such as N-cadherin, R-cadherin, cadherin-7, or cadherin-11. Consistent with this, biophysical studies demonstrated that E-cadherin mediates stronger bonds at the molecular level than any other cadherins (Dufour et al., 1999; Chu et al., 2006; Panorchan et al., 2006). Moreover, although E-cadherin and N-cadherin may transiently coexist in certain cells, they are generally mutually exclusive, and studies on epithelial cell lines or in mouse and *Xenopus* embryos in which E- and N-cadherins have been interchanged clearly indicate that they can only partially substitute each other (Luo et al., 2001; Kan et al., 2007; Wheelock et al., 2008; Nandadasa et al., 2009; Libusova et al., 2010).

Throughout life, cells do not maintain a constant repertoire of cadherins; rather they may execute successive changes in cadherin expression in relation to reorganizations of their interactions with their neighbors. In particular, the switch between E- and N-cadherin has been found to play a key role in early morphogenesis and in pathological situations, by promoting the process of epithelium-to-mesenchyme transition (EMT; Wheelock

et al., 2008; Thiery et al., 2009). During gastrulation, for example, N-cadherin is up-regulated at the expense of E-cadherin on the surface of nascent mesodermal cells ingressing from the superficial ectoderm into the primitive streak (Ohta et al., 2007; Nakaya et al., 2008; Hardy et al., 2011). Similarly, dissemination of carcinoma cells from primary epithelial tumors is often associated with E-cadherin loss combined with N-cadherin expression, and inappropriate N-cadherin up-regulation in tumor epithelial cells has been shown to promote motility and invasion (Thiery et al., 2009).

There are examples, however, where the E- to N-cadherin switch does not result in deterioration of the epithelial structure and EMT. This is, in particular, the case of the early morphogenesis of the nervous system in vertebrates. In the chick embryo, the neural plate, from which the entire central nervous system is formed, is initially a flat epithelium of cuboidal cells that express E-cadherin and not N-cadherin. At completion of neurulation, when the neural tube is formed and fully separated from the superficial ectoderm, neural epithelial cells exhibit their typical elongated, radially-oriented shape and constitute a pseudo-stratified epithelium in which E-cadherin has been totally replaced by N-cadherin (Thiery et al., 1984; Hatta et al., 1987; Duband et al., 1988; Detrick et al., 1990; Radice et al., 1997). Yet, neural epithelial cells are unable to undergo spontaneous EMT; instead, they tend to remain coherent, even in two-dimensional culture where they retain their organization as a hollow tube (Duband et al., 2009). This E- to N-cadherin switch during neurulation has often been interpreted as an event necessary both for the acquisition of the morphological features of neural epithelial cells and for the movements of neurulation to occur. However, despite a variety of experiments in different animal models that uncovered the importance of N-cadherin in early neural development (Bronner-Fraser et al., 1992; Radice et al., 1997; Lele et al., 2002; Hong and Brewster, 2006; Nandadasa et al., 2009), these hypotheses have never been tested experimentally, and the biological significance of the change

in cadherin expression during neurulation remains, therefore, unclear. In particular, it is not known why, contrary to epithelial cell lines established *in vitro*, E-cadherin loss in the neural epithelium does not provoke EMT. In other words, the question of the possible incidence of E-cadherin repression on the morphology of neural epithelial cells and on the elaboration of the neural epithelium has never been addressed directly. Moreover, the timing of the occurrence and the kinetics of the switch during the course of neurulation have not been established with precision, thereby rendering the interpretation of functional experiments uncertain. Finally, while many studies focused on the characterization of the transcriptional regulators involved in cadherin regulation during neural crest cell emigration (Duband, 2006), the identity of the transcription factors controlling cadherin expression during neurulation is not known. In the present study, we have performed a complete survey of the expression patterns of E- and N-cadherin proteins and messengers, in relation to those of their main transcriptional regulators, in the early nervous system of the chick embryo, from neural induction to completion of neurulation. Our observations indicate that deployment of the program of E- to N-cadherin switch during neurulation is progressive and orchestrated by a limited set of transcriptional regulators distinct from those recruited during gastrulation, segregation of the neural crest and formation of the notochord, possibly accounting for the transformation of the neural epithelium without deterioration of cell cohesion. In addition, we found that the timing and kinetics of cadherin switch vary considerably along the embryonic axis, in a manner that appears neither in synchrony with the movements of neurulation nor connected with the acquisition by neural cells of their morphological traits, but may rather reflect the spatial segregation of cells of the neurectoderm and their final commitment into neural tissues.

## RESULTS AND DISCUSSION

To investigate the timing and kinetics of E- to N-cadherin switch during

early neural development, we analyzed the expression profile of their proteins and messages by immunofluorescence and *in situ* hybridization on serial sections of chick embryos as well as on whole embryos, between stages 3 and 19 of Hamburger and Hamilton (HH) (Hamburger and Hamilton, 1951), i.e., between the 12th and the 72nd hour of incubation. In parallel, we analyzed the distribution patterns of their main transcriptional regulators, i.e., Snail-1, Snail-2, Zeb-2 (also known as SIP-1), and Twist-1, acting as repressors of E-cadherin, and Sox-2, known as an activator of N-cadherin transcription (Nieto, 2002; Matsumata et al., 2005; Peinado et al., 2007). Sox-2 was also used as a marker for definitive neural tissues (Uchikawa et al., 2003, 2011; Linker and Stern, 2004).

### Timing and Kinetics of E- to N-Cadherin Switch During Early Neural Induction

To determine first whether the switch from E- to N-cadherin during neural development occurs as a consequence of neural induction and is involved in the morphological transformation of neural epithelial cells (Takeichi, 1988; Halbleib and Nelson, 2006; Suzuki and Takeichi, 2008), we analyzed their expression patterns throughout the process of neural induction in the anterior region of the embryo. In the chick, neural induction starts during gastrulation at stage HH3 and becomes apparent at stage HH4 by expression of Sox-2 in the neural plate, in a horse-shoe-shaped area surrounding the Hensen's node (Uchikawa et al., 2003, 2011). At this stage (Fig. 1A, B), immunostaining for E-cadherin was strong on the whole surface of all superficial epithelial cells both in the nascent neural plate and in the non-induced epiblast. No E-cadherin was found in the mesoderm, but, as shown previously (Nakaya et al., 2008; Hardy et al., 2011), it was detectable in the primitive streak, in both ingressing and early migrating mesodermal cells. N-cadherin exhibited a reciprocal pattern to E-cadherin, with a strong expression in the mesoderm and a complete exclusion from the neural plate and the epiblast. In the primitive streak, it was

codistributed with E-cadherin in the ingressing mesodermal cells. *In situ* hybridizations on whole embryos (Fig. 1C) revealed that E-cadherin messages were uniformly expressed in the superficial layer of the whole blastoderm, with a slight decrease in the primitive streak and neural plate. N-cadherin, in contrast, was conspicuous in the primitive streak and mesoderm, but neither in the neural plate nor the non-induced epiblast. Of interest, its expression pattern matched precisely that of Brachyury, a T-box transcription factor involved in mesoderm formation (Kispert et al., 1995). While they were not detected at stage HH3 (not shown, but see Sheng et al., 2003; Uchikawa et al., 2003, 2011), Sox-2 and Zeb-2 became both induced in conjunction at stage HH4 in the neural plate. Snail-2, in contrast, was absent from this region, being essentially confined to the primitive streak (see also Sefton et al., 1998; Acloque et al., 2011). Finally, among the other transcriptional repressors of E-cadherin tested, neither Twist-1 nor Snail-1 was expressed in the neural plate during early neural induction as well as at later stages during neurulation (Figs. 1C, 2B–D; see also Sefton et al., 1998; Tavares et al., 2001).

By stage HH7 (Fig. 2A, B), during formation of the head fold, while E-cadherin remained conspicuous in the entire neural plate, expression of N-cadherin transcripts was initiated in its anterior-most portion. However, no N-cadherin protein could be detected in neural epithelial cells by immunofluorescence at this stage. At stage HH8 (Fig. 2C), N-cadherin expression became significantly more pronounced in the anterior neural plate up to the first somites, and this was accompanied by gradual accumulation of the protein on the cell surface (see Fig. 4A–C). In contrast, E-cadherin persisted in the anterior neural plate until stage HH10 (Fig. 2C, D), and its complete repression was observed only at stage HH11 (see Figs. 4, 5). Between stages HH4 and HH8, Sox-2 and Zeb-2 expressions were markedly increased in the entire neural plate ahead of the regressing node, with the notable exception of the notochord, while Snail-2 remained limited to the primitive streak as earlier.

Therefore, our results show that, at the onset of neural induction at stage HH3, cells of the prospective neural plate were undistinguishable from the rest of the epiblast in their shape and cadherin content, and expressed none of the known transcriptional regulators of E- and N-cadherins. During progression of neural induction at stage HH4, neural epithelial cells started to acquire their morphological traits, in particular their elongated, spindle-like shape. However, this was not accompanied by an immediate and significant modification in cadherin expression. Changes in cadherin expression occurred only gradually over time, first with increase in N-cadherin messages well after neural induction and formation of the neural plate, then with repression of E-cadherin even later (Fig. 3A). These observations fully support previous genetic studies in the mouse and Zebrafish showing that, in the absence of N-cadherin, onset of formation of the neural epithelium develops normally. The first signs of neural tube malformations are detected relatively late, in the mouse, by the appearance of undulations along the neural tube after closure (Radice et al., 1997) and, in the fish, by the absence of cavitation due to alterations in movements of convergence and intercalation (Hong and Brewster, 2006). Therefore, rather than a prerequisite to the morphological changes, cadherin switch appears merely as a secondary event during neurulation.

Of the transcriptional regulators of cadherin examined here, only Sox-2 and Zeb-2 appeared to exhibit a spatial expression pattern consistent with the cadherin switch in neural epithelial cells, as they were uniformly expressed throughout the entire neural plate and absent from the ectoderm. Previous genetic studies in the mouse showed that embryos lacking Zeb-2 exhibit persistent expression of E-cadherin in the neural tube, thereby revealing that Zeb-2 is necessary for E-cadherin repression in the neural epithelium (Van de Putte et al., 2003). On the other hand, misexpression of Sox-2 in the cranial ectoderm of early chick embryos has been found to cause ectopic N-cadherin expression, indicating that Sox-



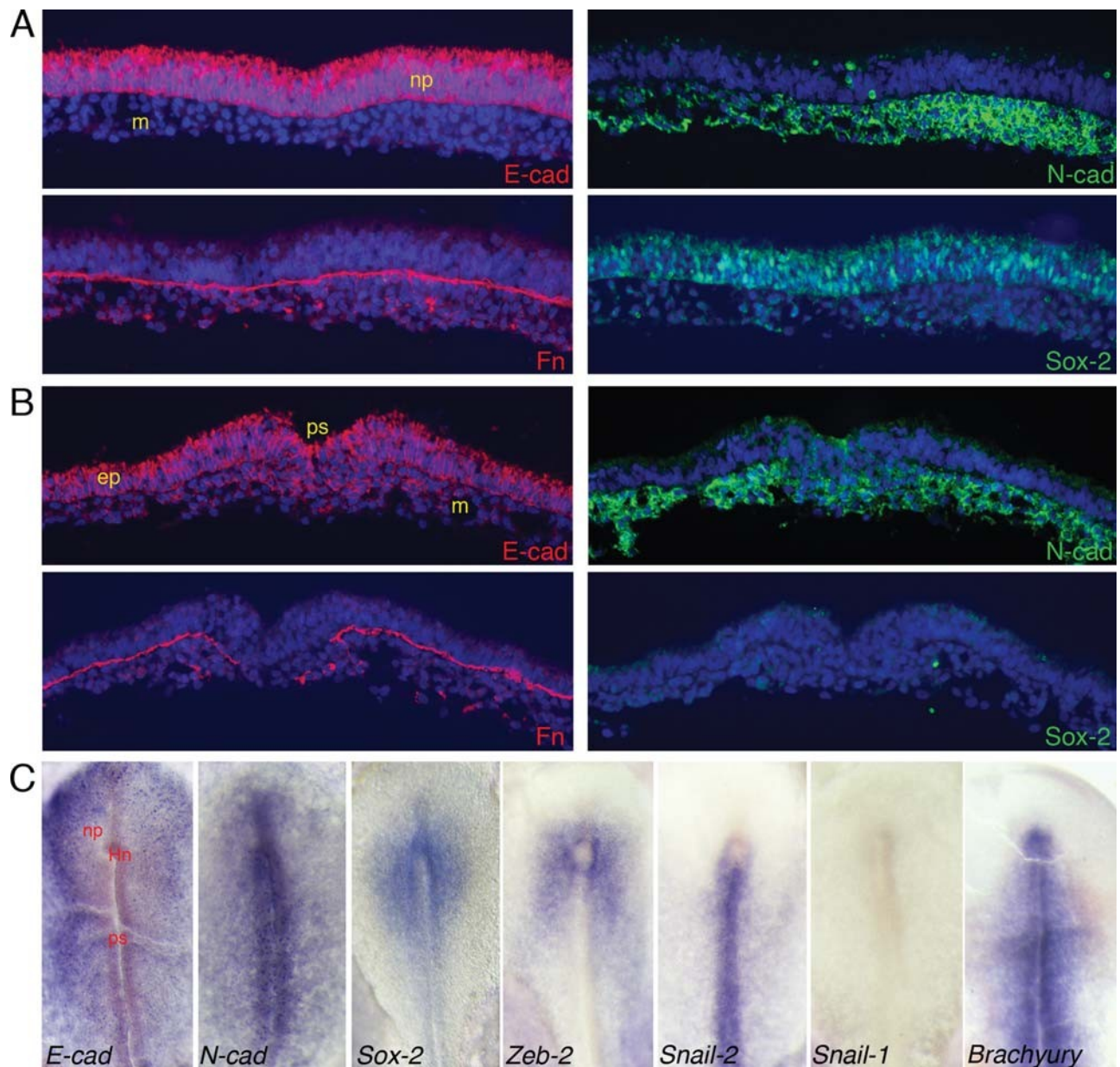


Fig. 1. Expression patterns of E- and N-cadherins and their transcriptional regulators during early neural induction. A,B: Immunostainings for E-cadherin (E-cad), N-cadherin (N-cad), fibronectin (Fn), and Sox-2 on cross-sections through the neural plate (A) and the primitive streak (B) of a stage-HH4 chick embryo. Cells nuclei were stained with DAPI. ep, epiblast; m, mesoderm; np, neural plate; ps, primitive streak. C: In situ hybridizations for E-cadherin, N-cadherin, Sox-2, Zeb-2, Snail-2, Snail-1, and Brachyury on whole embryos at stage HH4/4p. Hn, Hensen's node; np, neural plate; ps, primitive streak.

2 is sufficient to drive expression of N-cadherin in neuroectodermal tissues (Matsumata et al., 2005). In addition, in agreement with the fact that both factors have been ascribed critical roles in neural induction in chick and *Xenopus* (Eisaki et al., 2000; Sheng et al., 2003; Uchikawa et al., 2003, 2011; Takemoto et al., 2006), we also found that Sox-2 and Zeb-2 are induced almost coincidentally in neural plate cells at an early step of neural induction. These observations there-

fore suggest that Sox-2 and Zeb-2, in conjunction, are key players in the spatiotemporal control of the E- to N-cadherin switch in the nervous system. However, rather unexpectedly, we observed that induction of N-cadherin and complete extinction of E-cadherin occurred long after onset of expression of Sox-2 and Zeb-2 in the neural plate (Fig. 3A). While the 6-hr delay between Sox-2 and N-cadherin expression in the neural plate is consistent with the 4-hr delay reported

previously for the sensory placodes (Matsumata et al., 2005), repression of cadherin expression more than 12 hr after induction of Zeb-2 suggests that, albeit necessary, this factor may not be sufficient to modify transcription of the E-cadherin gene in neural epithelial cells and that additional cofactors required for complete repression may be induced only at late stages during neural induction. Additionally, it cannot be excluded that post-transcriptional regulatory events

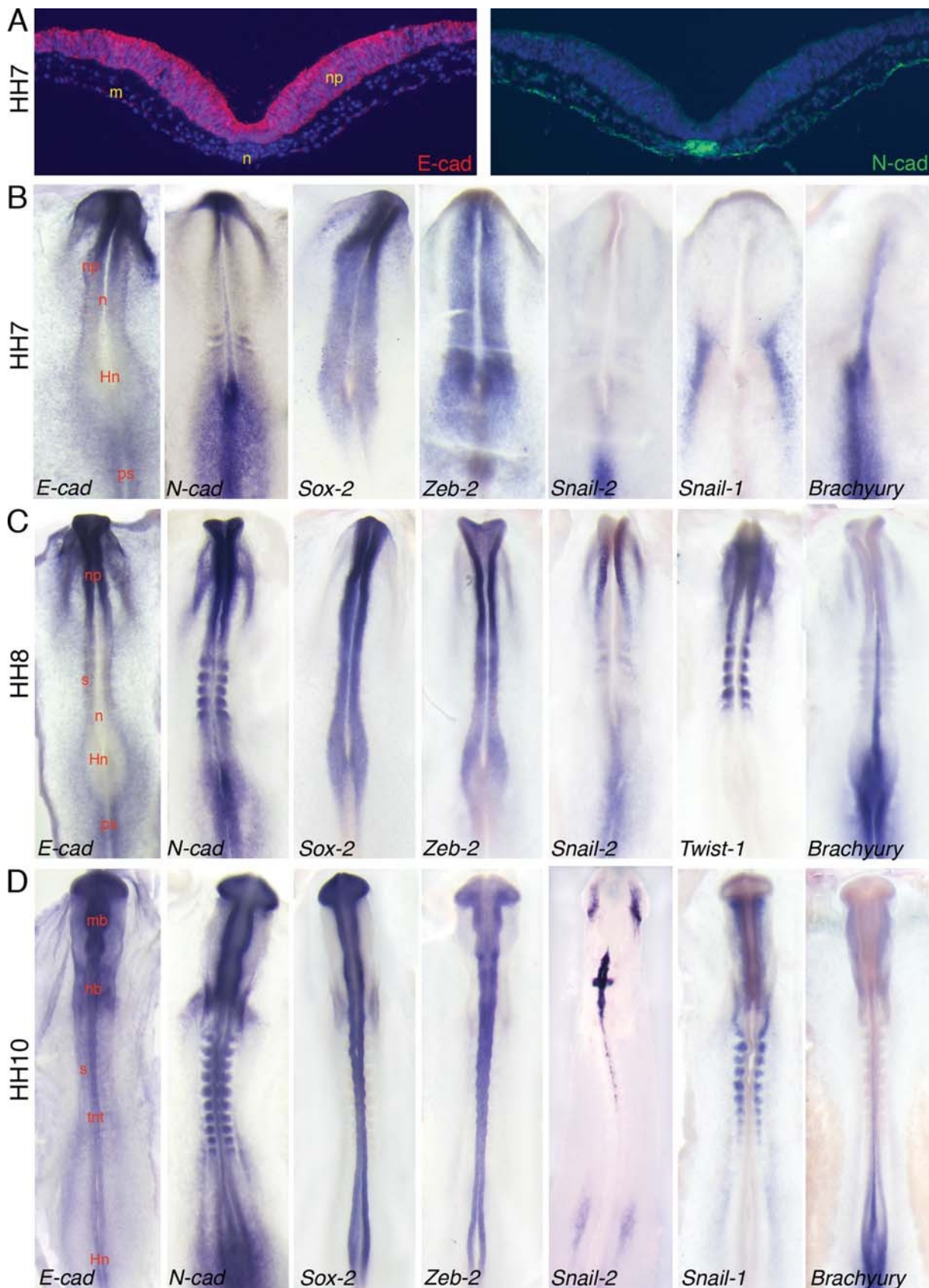


Fig. 2. Expression patterns of E- and N-cadherins and their transcriptional regulators during late neural induction. A: Immunostainings for E-cadherin (E-cad) and N-cadherin (N-cad) on cross-sections through the neural plate of a stage-HH7 chick embryo. Cell nuclei were stained with DAPI. m, mesoderm; n, notochord; np, neural plate. B–D: In situ hybridizations for E-cadherin, N-cadherin, Sox-2, Zeb-2, Snail-2, Snail-1, Twist-1, and Brachyury on whole embryos at stages HH7 (1–2 somites), HH8 (4–6 somites), and HH10 (9–11 somites). hb, hindbrain; Hn, Hensen's node; mb, midbrain; n, notochord; np, neural plate; ps, primitive streak; s, somite; tnt, trunk neural tube.

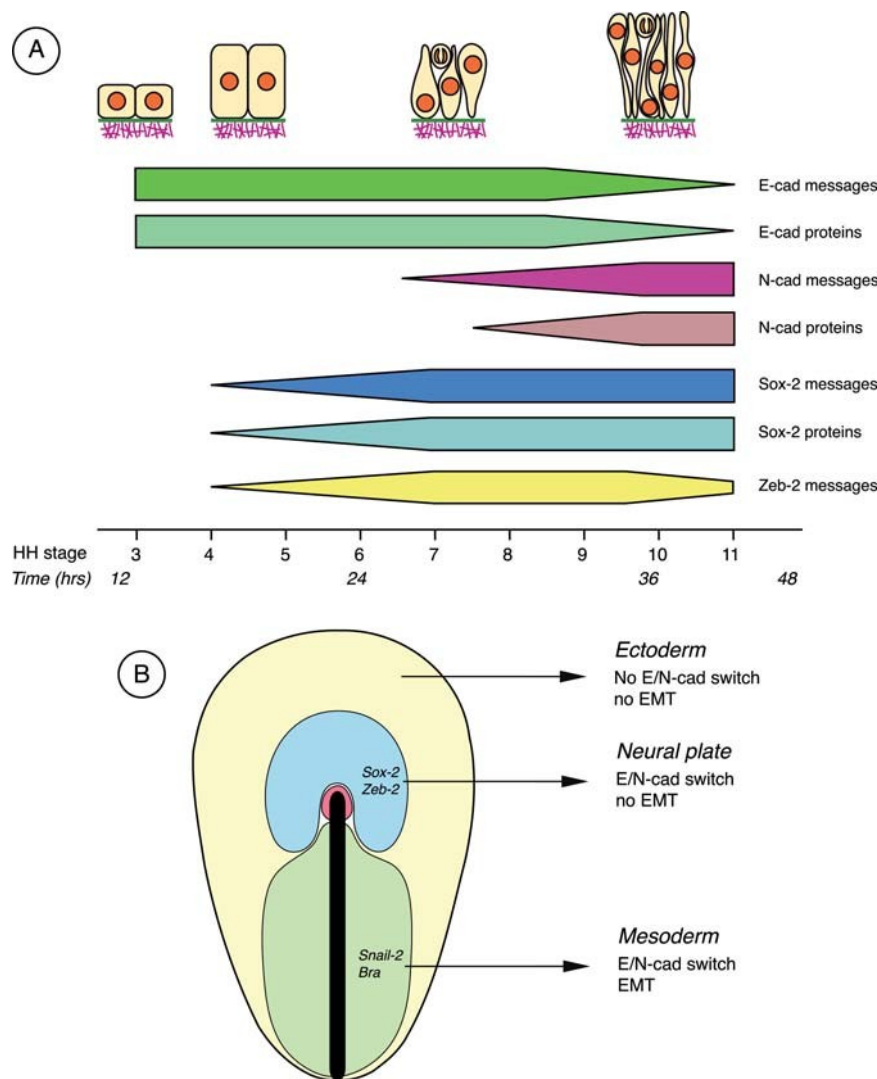


Fig. 3. A: Schematic representation of the timing of expression of E- and N-cadherins and of Sox-2 and Zeb-2 during neurulation in relation to the morphological changes of neural epithelial cells from cuboidal to elongated and pseudo-stratified. B: Tentative fate map of epiblast cells in the chick blastoderm at stage HH4. Three distinct territories have been defined that differ in cell fates, expression of Sox-2, Zeb-2, Snail-2, and Brachyury transcription factors, and in the ability of cells to execute E- to N-cadherin switch and EMT. The territory fated to give rise to ectodermal cells (yellow) expresses no cadherin-regulating transcription factor, and undergoes neither an E- to N-cadherin switch nor an EMT. In contrast, the territory from which the mesoderm develops (green) expresses both Snail-2 and Brachyury, and undergoes an E- to N-cadherin switch and an EMT followed by extensive cell migration. Finally, the neural plate territory (blue), that expresses both Sox-2 and Zeb-2 executes a gradual switch from E- to N-cadherin but this is not accompanied by EMT.

may account for the delay between the timing of expression of Sox-2 and Zeb-2 and the changes in surface expression of E- and N-cadherin in neural epithelial cells. Indeed, both E- and N-cadherins may be subjected to post-transcriptional regulations, such as proteolytic cleavage or cytoplasmic trafficking (Halbleib and Nelson, 2006), that may locally modulate their activity. However, the overall consistent expression of E- and N-cad-

herin messages and proteins throughout neurulation suggests that cadherin activity in neural epithelial cells is primarily regulated at the transcriptional level. Moreover, we found no major difference in immunostainings using antibodies directed against the cytoplasmic tail or the external part of E- and N-cadherin (not shown).

The slow replacement of E-cadherin by N-cadherin in the neural plate con-

trasts strikingly with the situation found in the primitive streak, where ingressing mesodermal cells express Snail-2 and Brachyury and immediately execute a complete EMT program with breakdown of the basement membrane, loss of cell polarity, and a rapid E- to N-cadherin switch (Sefton et al., 1998; Nakaya et al., 2008; Aclouque et al., 2011). Beside Snail-1, Snail-2 is considered as the prototype of EMT inducers. It is often aberrantly overexpressed in metastatic tumor cells and is commonly recruited in tissues normally undergoing rapid and massive EMT (Thiery and Sleeman, 2006; Peinado et al., 2007; Thiery et al., 2009). Moreover, functional studies in the chick have demonstrated that it is sufficient to induce ectopic cell delamination in the epiblast during gastrulation (Aclouque et al., 2011). Concerning Brachyury, although it has been regarded essentially as an inducer of mesodermal identity, it is also necessary for mesodermal cell movements during gastrulation as shown by clonal analyses in the mouse embryo (Wilson and Beddington, 1997), and recent findings revealed that it can trigger EMT in epithelial cell lines both directly and indirectly through Snail-1/2 (Fernando et al., 2010). Thus, in the early chick gastrula, Snail-2 in possible conjunction with Brachyury may promote a rapid switch between E- and N-cadherin in primitive streak cells, associated with complete EMT. On the other hand, although Zeb-2 has been found to perform the same roles as Snail-1/2 in epithelial cells maintained in vitro (Thiery and Sleeman, 2006; Peinado et al., 2007; Vandewalle et al., 2009), our data show that, during neural induction, its expression does not correlate with events of EMT and previous functional studies revealed that, rather than inducing disintegration of the epithelial structure, its ectopic expression in the epiblast at the gastrula stage prevents EMT and cell movements through the primitive streak (Sheng et al., 2003). Moreover, Zeb-2 is also known to be a potent repressor of Brachyury (Papin et al., 2002; Sheng et al., 2003). Intriguingly enough, ectopic expression of Snail-2 in the neural tube at a time when it also expresses Zeb-2 is not sufficient

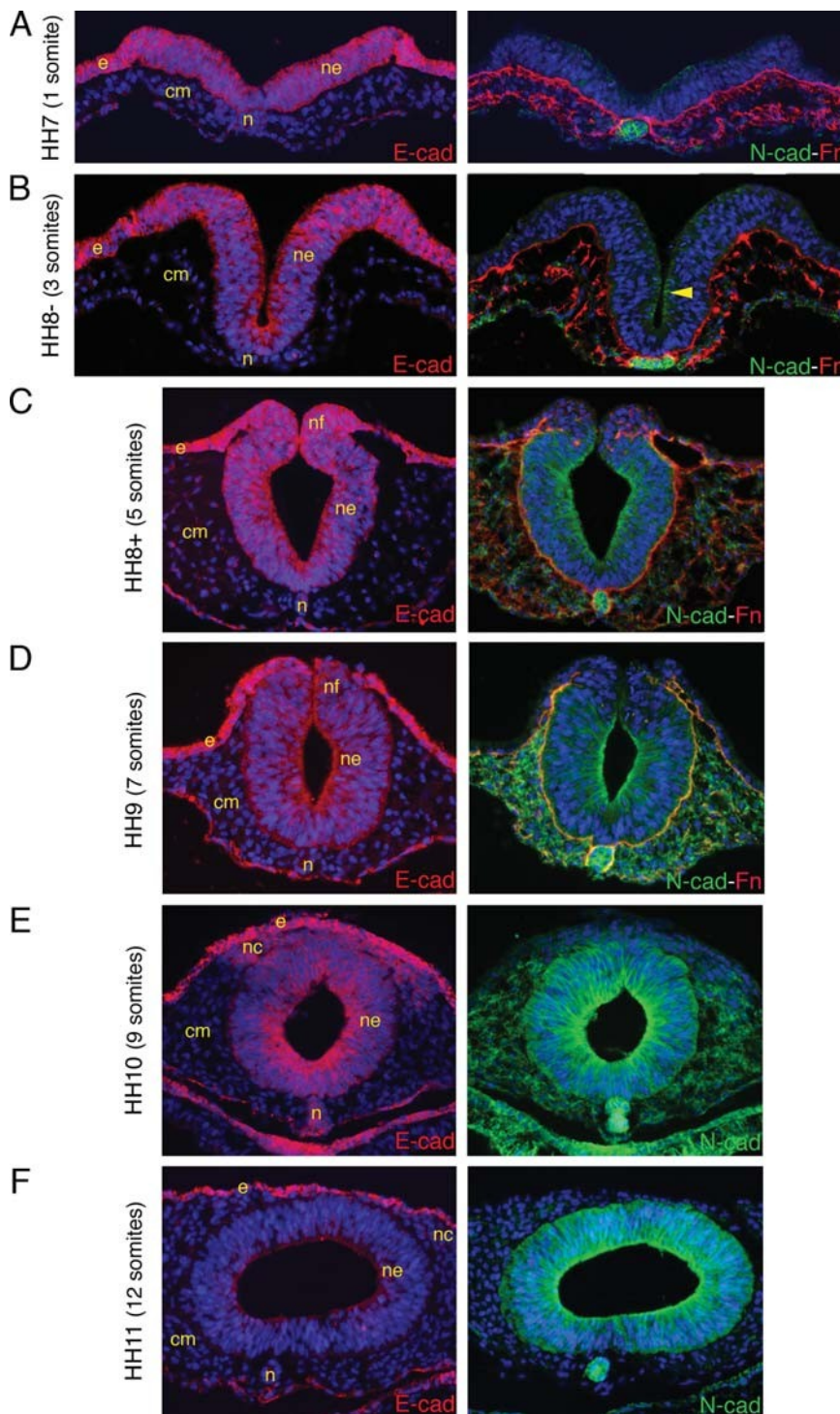


Fig. 4. Expression patterns of E- and N-cadherins during neurulation at the midbrain level. Immunostainings for E-cadherin (E-cad), N-cadherin (N-cad), and fibronectin (Fn in A–D) or cross-sections through the mesencephalon of chick embryos at stages HH7 (1 somite), HH8 (3 somites), HH8 $\beta$  (5 somites), HH9 (7 somites), HH10 (9 somites), and HH11 (12 somites). Cell nuclei were stained with DAPI. cm, cranial mesoderm; e, ectoderm; n, notochord; nc, neura crest; ne, neural epithelium; nf, neural fold.

regulators. Thus, it can be hypothesized that Snail-2 and Brachyury, on the one side, and Zeb-2 and Sox-2, on the other side, may define two distinct territories in the chick blastoderm with divergent fates, but both characterized by a switch from E- to N-cadherin (Fig. 3B). Cells expressing Snail-2 and Brachyury may become fated to become mesodermal cells and undergo a rapid E- to N-cadherin switch followed by EMT and ingression through the primitive streak whereas cells expressing Sox-2 and Zeb-2 would acquire a neural identity and execute a slow transition between E- and N-cadherin while being prevented from losing their epithelial character and ingressing in the underlying space.

### Timing and Kinetics of E- to N-Cadherin Switch During Primary Neurulation

To determine whether the switch from E- to N-cadherin in the neural epithelium correlates with the movements of neurulation and neural tube closure (Takeichi, 1988; Bronner-Fraser et al., 1992; Redies, 1995; Halbleib and Nelson, 2006), we studied their expression patterns during the whole process of neurulation at various defined positions along the neural axis, from the midbrain up to the posterior trunk. In the chick, the neural tube is formed by two independent mechanisms involving different morphogenetic movements and termed primary and secondary neurulations (Colas and Schoenwolf, 2001; Lowery and Sive, 2004). Primary neurulation occurs in the head and upper trunk by rolling of the neural plate and formation of neural folds that then fuse dorsally, resulting in the typical hollow shape of the neural tube.

Analysis of the expression patterns of cadherins at different levels of the neural tube formed by primary neurulation revealed essentially two regions that differ in the timing and kinetics of the E- to N-cadherin switch: the first one encompasses the midbrain and anterior hindbrain and the second one extends from the posterior hindbrain to the anterior trunk. At the midbrain and anterior hindbrain levels, movements of neurulation start early at stage HH7. At this stage (Fig. 4A), both the neural plate

to provoke EMT of neural epithelial cells (del Barrio and Nieto, 2002; Cheung et al., 2005; Theveneau et al., 2007). All together, these observations

suggest possible antagonistic roles for Snail-2 and Zeb-2 in the control of EMT in neurectodermal cells, irrespective of their function as cadherin

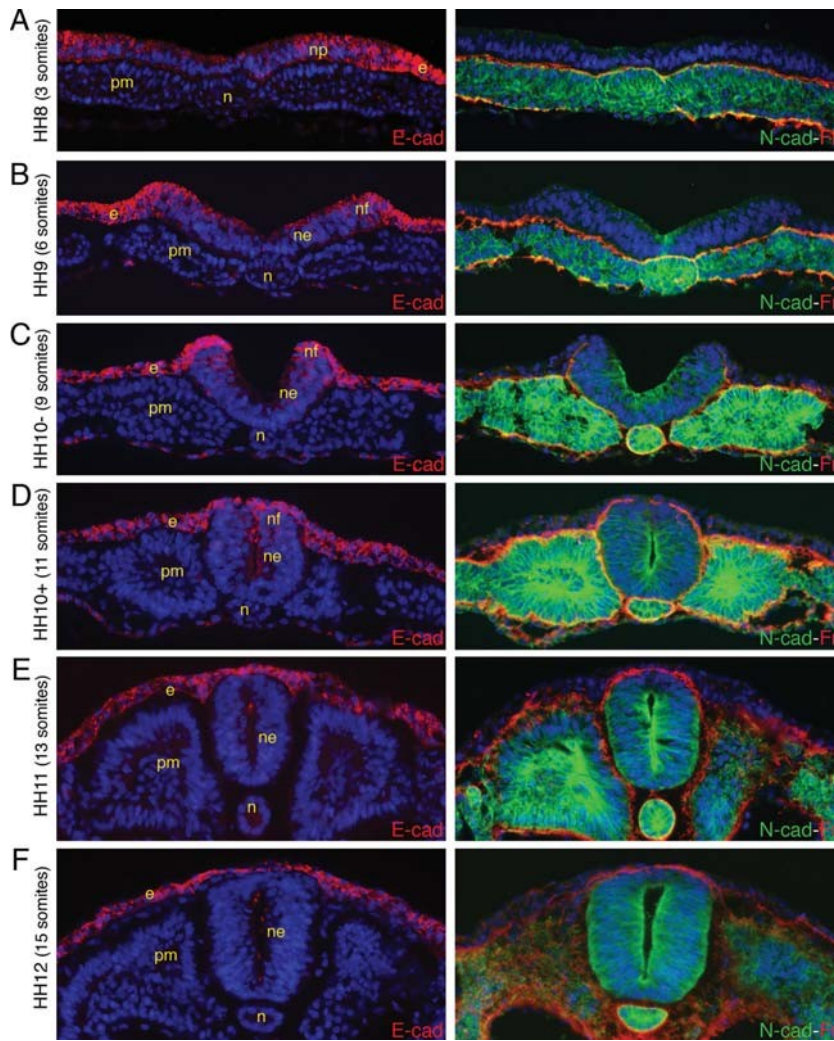


Fig. 5. Expression patterns of E- and N-cadherins during neurulation at the anterior trunk (cervical) level. Immunostainings for E-cadherin (E-cad), N-cadherin (N-cad), and fibronectin (Fn) on cross-sections through the anterior trunk (level of somites 7–10) of chick embryos at stages HH8 (3 somites), HH9 (6 somites), HH10 (9 somites), HH10p (11 somites), HH11 (13 somites), and HH12 (15 somites). Cells nuclei were stained with DAPI. e, ectoderm; n, notochord; np, neural plate; ne, neural epithelium; nf, neural fold; pm, paraxial mesoderm.

and the ectoderm expressed uniformly high amounts of E-cadherin but no N-cadherin. During elevation of the neural folds at stage HH8 (Fig. 4B), while E-cadherin remained conspicuous over the entire cell surface of all neural epithelial cells, a faint, punctate staining for N-cadherin could be detected at the apical side of cells situated close to the midline (arrowhead in Fig. 4B). At stages HH8p and HH9, during apposition of the neural folds (Fig. 4C, D), staining for N-cadherin became gradually stronger, but still concentrated at the apical side of cells, in the entire neural tube, with the notable exception of the prospective neural crest cells in

the folds. Coincidentally, staining for E-cadherin declined slowly and became markedly less intense than in the ectoderm. In contrast to N-cadherin staining, which propagated gradually from the midline up to the lateral (then dorsal) sides of the neural tube, E-cadherin staining decreased uniformly throughout the neural tube, with no obvious converse gradient from lateral to medial. After fusion of the folds and at the time of crest cell emigration from the neural tube at stage HH10 (Fig. 4E), N-cadherin staining became prominent over the entire surface of all neural epithelial cells. However, although it was completely closed and separated from the

ectoderm, the neural tube still expressed detectable amounts of E-cadherin. Strikingly, neural crest cells expressed no N-cadherin but retained E-cadherin expression throughout delamination, as well as at the initial steps of migration. At stage HH11 (Fig. 4F), after completion of neural tube closure and neural crest cell emigration, E-cadherin staining has totally disappeared from the neural tube, which instead expressed uniformly high levels of N-cadherin.

In the posterior hindbrain and anterior trunk, movements of neurulation commence between stage HH8 and HH9 when the paraxial mesoderm is still unsegmented <math>\langle \text{zaq } 4 \rangle</math> (Fig. 5A, B). In this region, although the neural plate was initially organized as a flat epithelial layer in continuity with the ectoderm as in the midbrain, it clearly differed from the more anterior levels by the spatial distribution of cadherins over its surface. E-cadherin showed a latero-medial gradient in the neural plate with strong and uniform expression in the ectoderm and neural folds, weaker and apically-polarized expression in the intermediate neural tube, and a very faint, barely detectable expression in the median part. N-cadherin exhibited an almost exactly complementary pattern in the neural plate, being present medially, though at low levels, and absent laterally. Of note, unlike more anteriorly, codistribution of E- and N-cadherins was limited both spatially and temporally to cells of the intermediate portion of the neural tube. During elevation and apposition of the neural folds at stage HH10 (Fig. 5C, D), expression of E-cadherin disappeared almost entirely from the neural tube to become restricted to a few cells in the dorsal midline. Conversely, N-cadherin was expressed by all neural tube cells with the notable exception of the prospective neural crest population. By stage HH11 (Fig. 5E), after fusion of the neural folds and healing of the ectoderm, E-cadherin has entirely disappeared from all neural tube cells. Most remarkably, neural crest cells that have not yet started delaminating remained negative for N-cadherin. At stage HH12 (Fig. 5F), neural crest cell migration has just begun and neither E-cadherin nor N-

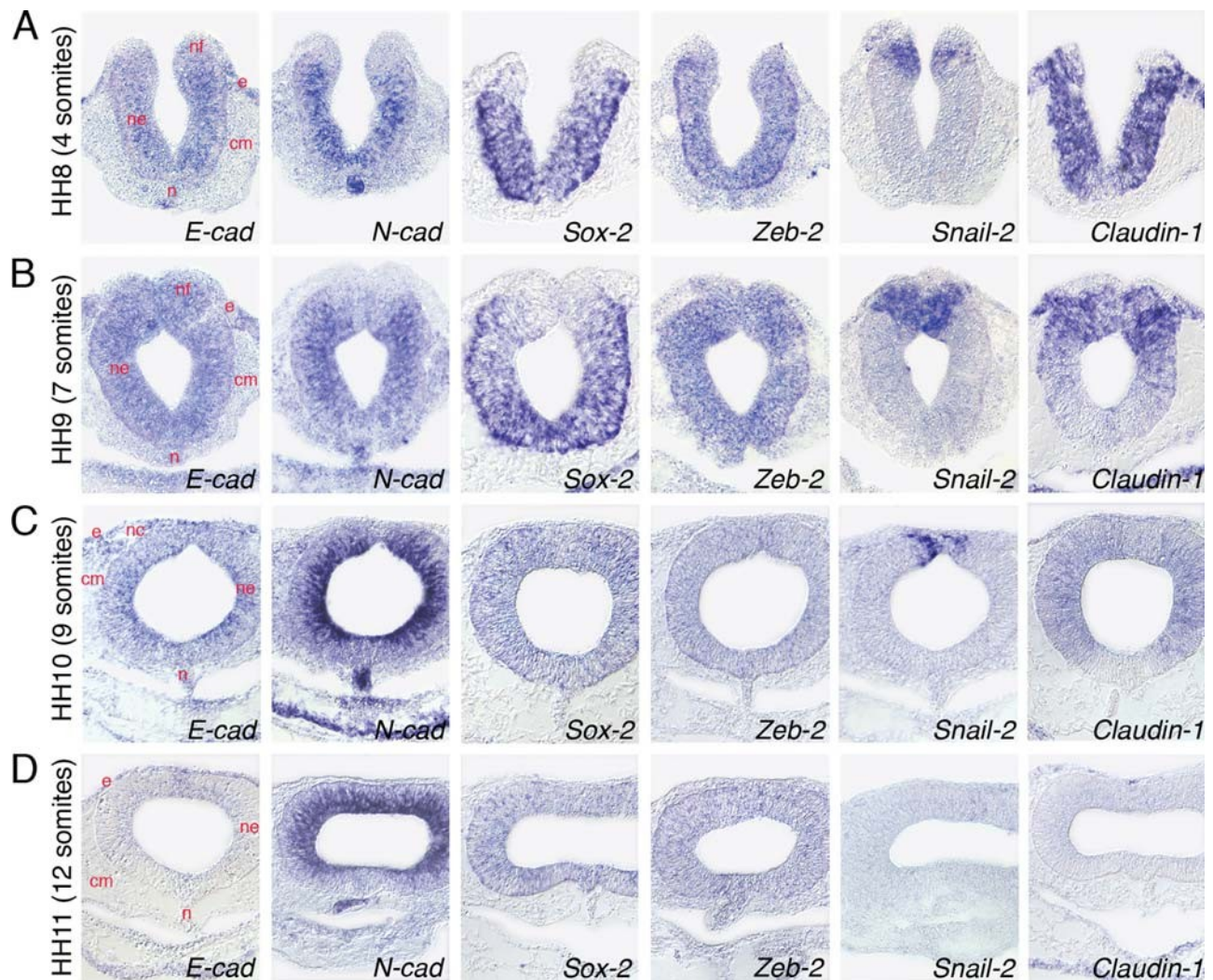


Fig. 6. Expression patterns of E- and N-cadherins and their transcriptional regulators during neurulation at the midbrain level. In situ hybridizations for E-cadherin, N-cadherin, Sox-2, Zeb-2, Snail-2, and Claudin-1 on cross-sections through the mesencephalon of chick embryos at stages HH8 (4 somites), HH9 (7 somites), HH10 (9 somites), and HH11 (12 somites). cm, cranial mesoderm; e, ectoderm; n, notochord; nc, neural crest; ne, neural epithelium; nf, neural fold.

cadherin was expressed on their surface during delamination and early migration. As at more anterior levels, cessation of neural crest cell delamination was accompanied by a gradual increase in N-cadherin expression in the dorsal midline (not shown).

In situ hybridization analyses revealed that, at both head and upper-trunk levels, expression of E- and N-cadherin transcripts matched approximately the spatio-temporal profile of their corresponding proteins (Figs. 2, 6, 7). In addition, Sox-2 exhibited the same expression pattern as N-cadherin in cells derived from the neurectoderm: it was abundant in neural tube cells, but absent from the ectoderm and progenitors of the neural crest in the folds (see also Waka-

matsu et al., 2004). As amply described previously (for a review, see Duband, 2006), Snail-2 was restricted to prospective neural crest cells until they became segregated entirely from the neural tube. Immunostaining using antibodies to Snail-2 gave essentially the same pattern (not shown). In contrast to Snail-2 and Sox-2, which marked distinct cell populations in the neural tube, Zeb-2 was equally expressed in neural tube and neural crest cells during neural tube closure and it was excluded from the ectoderm. Interestingly, at posterior hindbrain and truncal levels, while Zeb-2 was uniform throughout the neural tube prior to neural crest cell emigration, it became markedly enhanced in crest cells as soon as

they commenced their migration (Fig. 7D).

These observations, therefore, reveal that, in the rostral half of the embryo, from the midbrain up to the anterior trunk, neural epithelial cells underwent a complete switch from E- to N-cadherin during neurulation. However, both the timing and the kinetics of replacement of E-cadherin by N-cadherin varied significantly along the embryonic axis (Fig. 8). At the cranial level, the E- to N-cadherin switch occurred only gradually with a relatively long time period where both molecules were coexpressed in cells, and the complete disappearance of E-cadherin from the neural epithelium was complete only after neural tube closure and neural crest cell

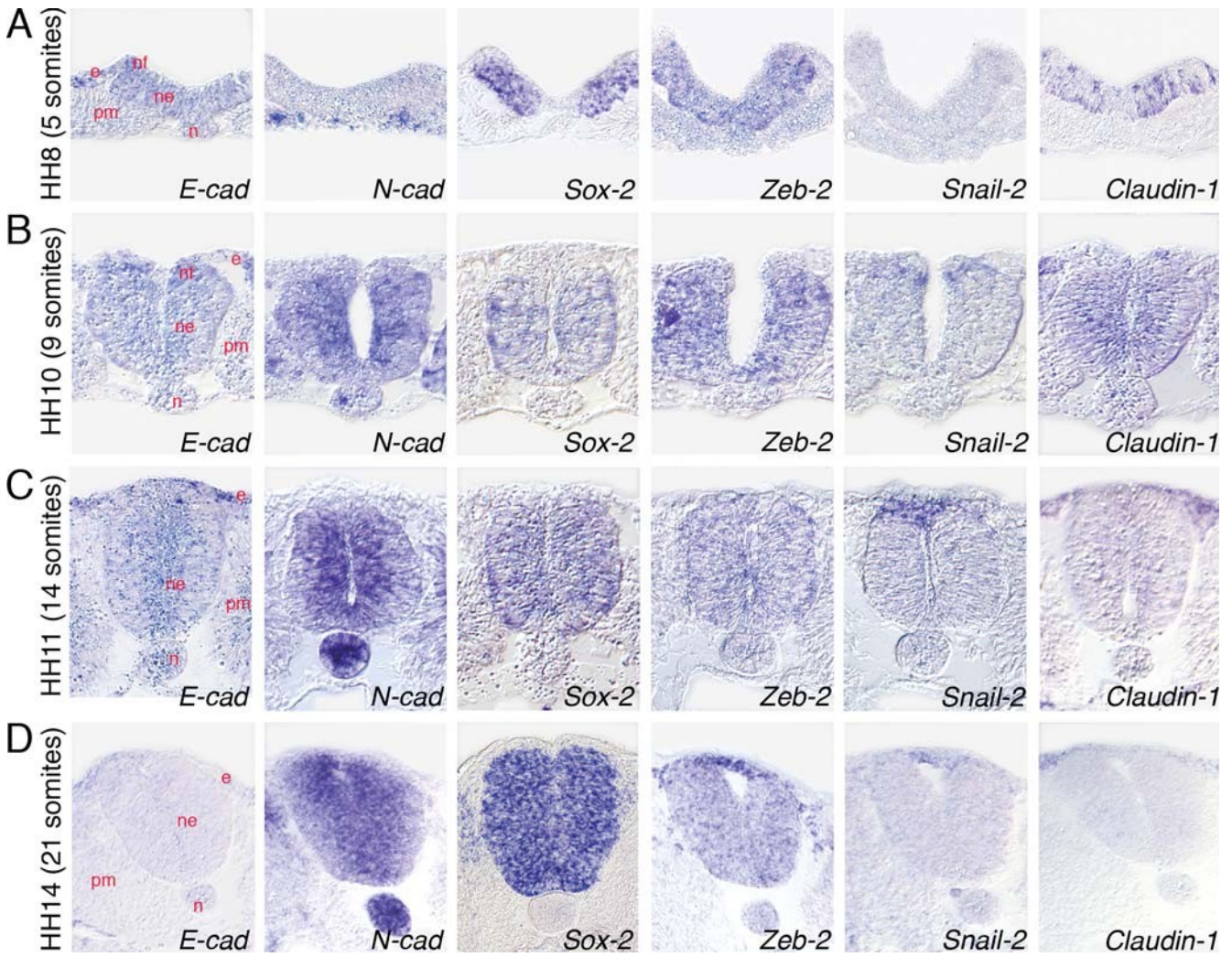


Fig. 7. Expression patterns of E- and N-cadherins and their transcriptional regulators during primary neurulation at the anterior trunk (cervical) level. In situ hybridizations for E-cadherin, N-cadherin, Sox-2, Zeb-2, Snail-2, and Claudin-1 on cross-sections through the anterior trunk (level of somites 7–10) of chick embryos at stages HH8 (5 somites), HH10 (9 somites), HH11 (14 somites), and HH14 (21 somites). e, ectoderm; n, notochord; ne, neural epithelium; nf, neural fold; pm, paraxial mesoderm.

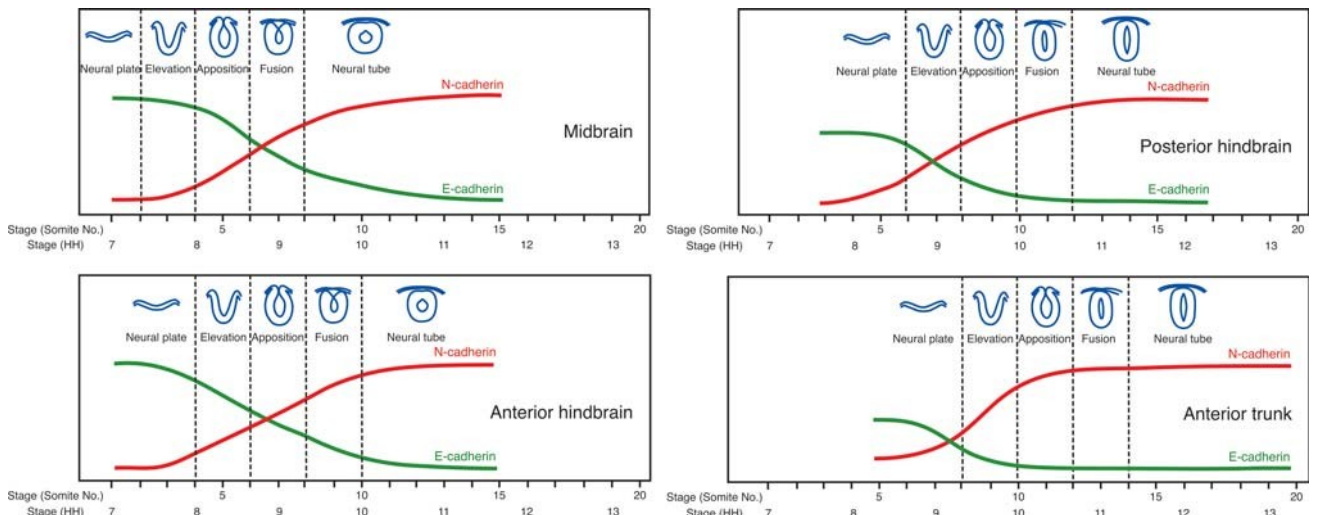


Fig. 8. Schematic representation of the timing and kinetics of the switch from E- to N-cadherin in neural epithelial cells in the intermediate zone of the neural plate during movements of neurulation at different axial levels along the anterior half of the embryo.

emigration. In the anterior trunk, the switch also occurred gradually, but much earlier during the process of neural tube closure than in the midbrain. It started before bending of the neural plate and was complete at apposition of the neural folds. In addition, in contrast to the midbrain level where the domain of overlap between E- and N-cadherins extended over the entire neural tube, in the trunk, this domain was restricted to the intermediate zone of the neural tube.

By comparing the time of complete E-cadherin repression in neural epithelial cells with that of completion of neural tube closure at different axial levels from the midbrain to the anterior trunk, we found that loss of E-cadherin occurred approximately at a single time point at all levels (between stages HH10 and HH11), whereas closure of the neural tube was effective in these regions in a sequential manner from stage HH10 to HH12 (Fig. 8). This indicates that the timing and kinetics of E- to N-cadherin switch are not synchronized with the movements of neurulation. Analysis of the expression patterns of E- and N-cadherin transcripts in whole embryos at stages HH7–11 (Fig. 2B–D) revealed large domains along the anteroposterior axis in which cadherin expression evolves in a coordinated manner within each domain and differently from the other domains. Thus, three regions could be identified, encompassing the whole brain up to the otic placode for the first one, the anterior trunk covering approximately the first 10–15 somites for the second one, and the rest of the trunk for the third one. Surprisingly, Sox-2 and Zeb-2 displayed uniform expression domains showing no obvious correspondence with these domains, suggesting that additional, yet undefined co-regulators may contribute to the fine tuning of cadherin expression in the neural tube. It should be stressed, however, that although Sox-2 expression in the early embryonic nervous system appears uniform, it is subdivided into several domains by multiple enhancers with distinct spatio-temporal specificities (Uchikawa et al., 2003). Given that the regulatory sequences of the N-cadherin gene itself contains several region-specific

enhancers that all rely on Sox-2 for their activity (Matsumata et al., 2005), it is conceivable that the spatial control of N-cadherin expression in the nervous system also depends on Sox-2 activation.

At the onset of neurulation, the neurectoderm comprises exclusively E-cadherin-expressing cells, while at its completion, at least three populations with distinct cadherin repertoires are segregated spatially: laterally, the ectoderm in which E-cadherin expression persists; medially, the neural tube at the origin of the central nervous system in which E-cadherin is substituted for N-cadherin; and at the connection between both compartments, the neural crest progenitors in which E-cadherin is lost but not replaced by N-cadherin. These domains are also characterized by different repertoires of cadherin regulators: none in the ectoderm, Sox-2 and Zeb-2 in the neural tube, and Zeb-2 and Snail-2 in the neural crest. Besides cell adhesion, one of the major roles of cadherins is to mediate cell recognition and segregation. Using transfected cell lines (Duguay et al., 2003) showed that sorting depends on both the type of cadherin expressed by the cells and its relative amount on the cell surface. Therefore, it is tempting to propose that the timing and kinetics of E- to N-cadherin switch during neurulation reflects the spatial segregation of the different lineages arising from the neurectoderm along the medio-lateral axis.

#### Expression Pattern of Claudin-1 During Primary Neurulation

Loss of occludin, a component of tight junctions, from the surface of neural epithelial cells has been proposed to occur at the time of increase of N-cadherin expression during neural tube closure (Aaku-Saraste et al., 1996). To define whether the disappearance of tight junctions correlates with E- to N-cadherin switch in neural epithelial cells, we analyzed the expression pattern of Claudin-1, another component of tight junctions expressed early during avian development (Simard et al., 2005). As shown in Figures 5 and 7, Claudin-1 expression matched precisely that of E-cadherin in the ecto-

derm and neural epithelium, indicating that they are co-regulated during reorganization of junctional complexes occurring during neurulation. Of note, transcriptional regulators of E-cadherin, and notably Zeb-2, have also been shown to repress Claudin-1 expression in epithelial cells (Vandewalle et al., 2005).

#### Timing and Kinetics of E- to N-Cadherin Switch During Secondary Neurulation in the Caudal Trunk

Secondary neurulation starts at closure of the posterior blastopore at stage HH13, and concerns a large portion of the trunk extending beyond the 28th somite and corresponding to the future lumbosacral region. In this region, the neural tube derives from the tail bud, a mesenchymal population of cells that coalesce into a rod and transform into an epithelium. The lumen is formed secondarily by cavitation to produce a hollow tube (Colas and Schoenwolf, 2001).

In the caudal extremity of the embryo at stages HH14–18, undifferentiated tail bud cells formed a uniform solid cord in which early neural progenitors expressing low levels of Sox-2 were morphologically undistinguishable from the paraxial mesoderm. At this level, while E-cadherin was confined to the overlying superficial ectoderm, N-cadherin was uniformly expressed in all tail bud cells (Fig. 9A). During epithelialization of the neural blastema and cavitation, N-cadherin became preferentially accumulated in the apical side of the Sox-2-positive neural epithelial cells, while it remained uniform in the mesenchymal paraxial mesoderm (Fig. 9B–E). In situ hybridizations studies (Fig. 10) confirmed that the expression profiles of E- and N-cadherins showed no region of overlap. E-cadherin expression was restricted to the ectoderm and to the caudal tip of the tail bud, corresponding to the remnants of the primitive streak (Ohta et al., 2007), abutting precisely the region where N-cadherin is expressed. The expression domain of N-cadherin appeared significantly larger than that of Sox-2 in the tail bud, suggesting that, contrary to more anterior



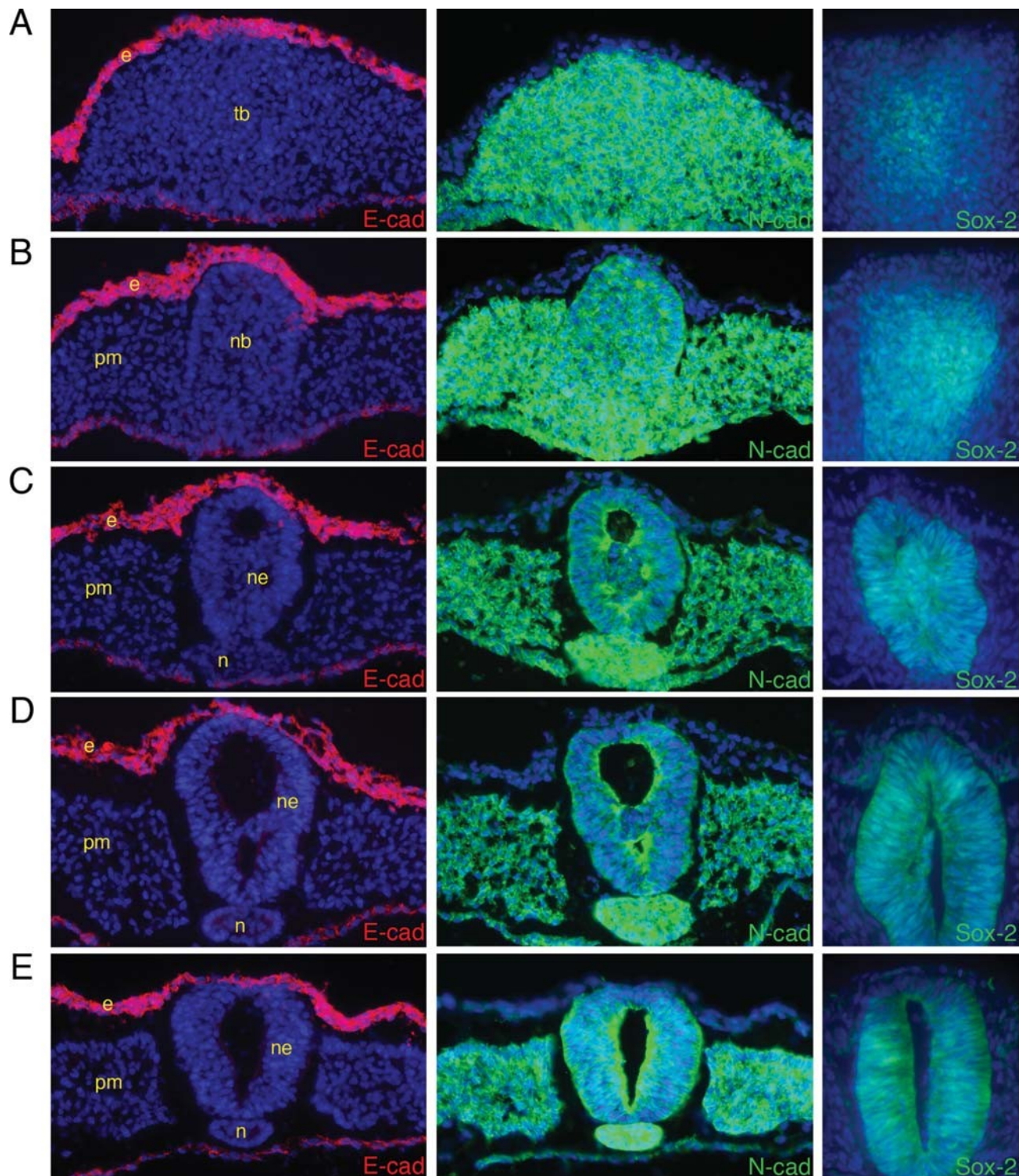


Fig. 9. Expression patterns of E- and N-cadherins during secondary neurulation at the posterior trunk (lumbar) level. Immunostainings for E-cadherin (E-cad), N-cadherin (N-cad), and Sox-2 on consecutive cross-sections through the posterior trunk of a chick embryo at stage HH13/14 (19–23 somites). A is most posterior and E most anterior. Cell nuclei were stained with DAPI. e, ectoderm; n, notochord; ne, neural epithelium; pm, paraxial mesoderm; tb, tail bud.

levels, Sox-2 plays no role in the initiation of N-cadherin expression in the caudal neural tube. Rather than Sox-2, Tbx-6L, a close relative to Brachyury, exhibited an expression profile

matching precisely with that of N-cadherin in the tail bud. More anteriorly, however, in the region where the neural tube is being formed, Tbx-6L was replaced by Sox-2 in the N-cadherin-

expressing cells of the neural tube (see also Takemoto et al., 2011). Finally, reflecting the absence of E-cadherin in neural progenitors throughout the course of secondary

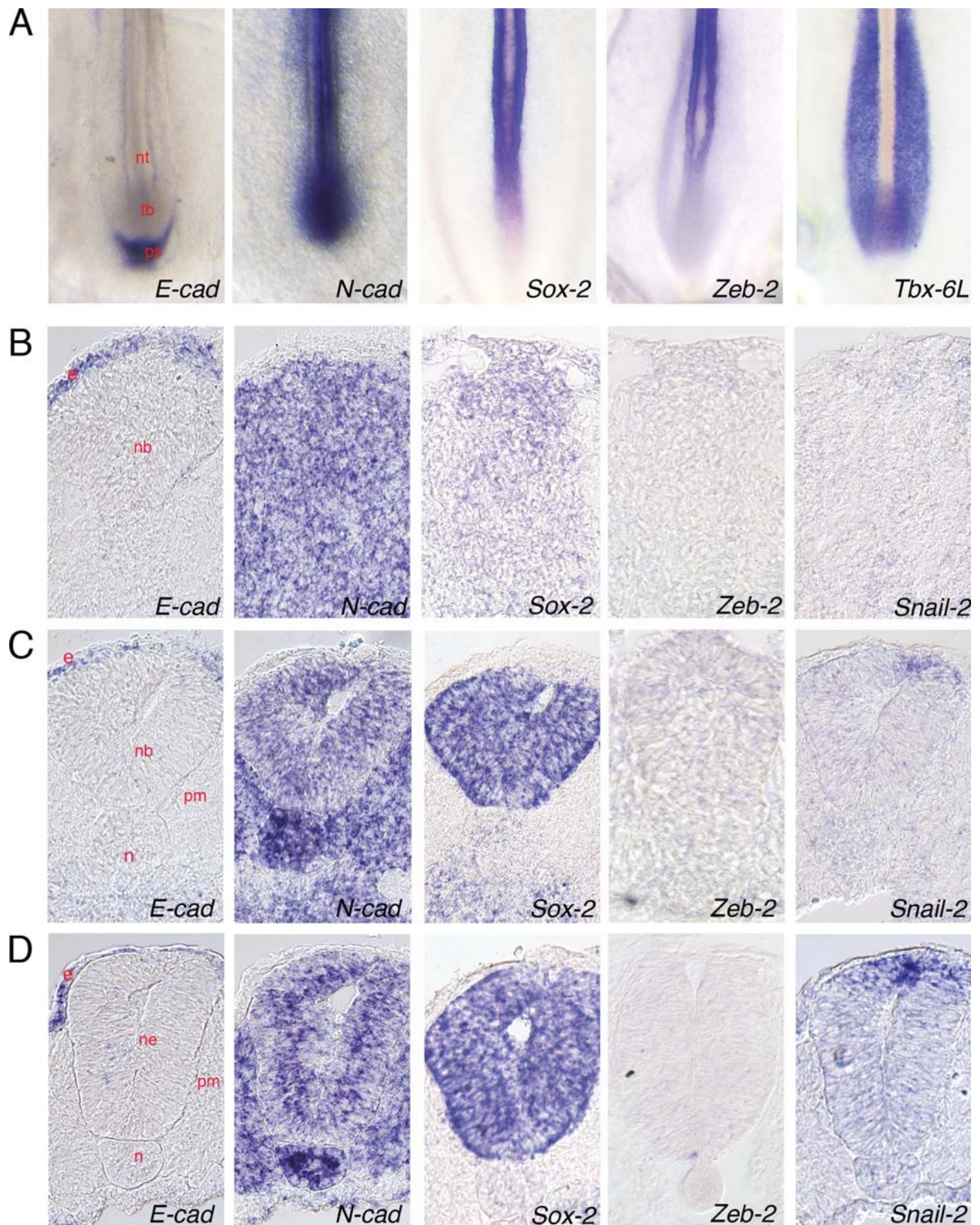


Fig. 10. Expression patterns of E- and N-cadherins and their transcriptional regulators during secondary neurulation at the posterior trunk (lumbar) level. A: In situ hybridizations for E-cadherin, N-cadherin, Sox-2, and Zeb-2 on whole embryos at stage HH14 (21 somites), showing the caudal part of the embryo. B-D: In situ hybridizations for E-cadherin, N-cadherin, Sox-2, Zeb-2, and Snail-2 on consecutive cross-sections through the posterior trunk of a chick embryo at stage HH14 (22 somites). B is most posterior and D most anterior. e, ectoderm; n, notochord; nb, neural blastema; ne, neural epithelium; pm, paraxial mesoderm.

neurulation, Zeb-2 was not found in the caudal neural tube.

These observations, therefore, indicate that, during secondary neurulation, elaboration of the neural tube does not involve an E- to N-cadherin switch consecutive to transition from a neuroectodermal progenitor to a neural fate. Instead, the neural tube forms from a pool of cells at the origin of the paraxial mesoderm and caudal neural tube (Wilson et al., 2009). These cell populations express N-cadherin from the very beginning on and become gradually segregated probably as a result of selective adhesion. However, we observed no striking difference in the relative cadherin content over time between the neural and mesodermal precursors, indicating that differential level of expression of N-cadherin does not constitute the triggering signal for cell segregation. Yet, expression of cadherin on the surface of the neural cells gradually evolved from uniform to polarized, most likely accompanying the transition from a mesenchymal organization to an epithelial structure.

### Cadherin Switch During Node Regression and Formation of the Notochord

Neurulation is accompanied by the formation of the notochord, which is laid down during regression of the Hensen's node. To investigate whether cadherins are involved in notochord segregation, we analyzed the expression patterns of E- and N-cadherins in the node at different stages of its regression during primary neurulation. At stages HH6 to HH8, node regression generates the notochord corresponding to the head and anterior trunk levels, while at stage HH10 it lays down the notochord of the mid-trunk. At stages HH6–8, node cells were organized as a compact mass of Sox-2-negative cells, distributed over the midline and splitting the neural plate into two lateral parts (Fig. 11A, B). These cells could be easily visualized by their high N-cadherin and low E-cadherin content, contrasting with both neural plate cells that expressed exclusively E-cadherin and primitive streak cells that co-expressed both E- and N-cadherins. At stage HH10, the neural

plate is no longer organized as a flat, uniform epithelium along the plan of the embryo; rather, it is composed of two epithelial sheets facing each other and oriented along the dorso-ventral axis. At this level, the node is located deeply at the junction between the two neural plate sheets (Fig. 11C). It is often referred to as chordo-neural hinge. As in more proximal regions, node cells could be discerned from the neighboring neural cells by the lack of Sox-2 expression and their strong and uniform staining for N-cadherin. These observations, therefore, suggest that notochord progenitors may segregate from the rest of the neural epithelium owing to their high N-cadherin content. Interestingly, of the various transcriptional regulators of cadherins studied, neither Sox-2, Zeb-2, Snail-1, Snail-2, nor Twist-1 exhibited a spatiotemporal pattern consistent with the selective increase of N-cadherin in node cells. Brachyury, in contrast, was conspicuous at all stages in the node and in notochord (Figs. 1C, 2B–D). The recent demonstration that Brachyury may control cadherin expression and EMT (Fernando et al., 2010) raises the intriguing possibility that it may up-regulate N-cadherin in nodal cells, allowing their segregation from the rest of the neural plate.

### Concluding Remarks

Several features emerge from our detailed survey of the expression patterns of E- and N-cadherins during neurogenesis in the chick embryo. First, there is no strict correlation between the E- to N-cadherin switch and the major morphological events accompanying neural induction and neural tube formation. Thus, in the rostral half of the embryo, expression of N-cadherin on the surface of neural epithelial cells follows rather than precedes changes in their cell shape from cuboidal to elongated and pseudo-stratified while the complete disappearance of E-cadherin is not synchronized with closure of the neural tube and separation from the ectoderm. In the caudal half of the embryo, in contrast, N-cadherin pre-exists the process of neurogenesis and there is no switch between E- and N-cadherin. Second, in regions where it

occurs, the timing and kinetics of the E- to N-cadherin switch is in general progressive both in time and space and orchestrated by a set of transcriptional regulators distinct from those deployed during EMT, possibly accounting for the transformation of the neural epithelium without substantial modification of its organization. Third, cadherin switch accompanies the gradual partition and final commitment of the neuroectoderm into three distinct populations, the ectoderm, neural crest, and neural tube, characterized by different cadherin repertoires under the control of specific sets of transcriptional regulators.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Chick Embryos

Fertilized chicken eggs (*Gallus gallus*) from a commercial source (Morizeau, Dangers, France) were incubated at 38 C in a humidified incubator. Embryos were staged according to somite numbers and to the Hamburger and Hamilton staging chart.

### Primary Antibodies and In Situ mRNA Probes

Several antibodies to E- and N-cadherins were selected for their complete lack of cross-reaction. These are the mouse monoclonal antibodies (mAb) to chick N-cadherin (FA5, GC4, and ID723 clones) purchased from Sigma (St. Louis, MO). FA5 and GC4 clones both recognize epitopes in the molecule situated close to the N-terminus and involved in cadherin binding while ID723 clone recognizes a site proximal to the membrane. All three mAbs gave identical stainings by immunofluorescence, irrespective of the developmental stages of the embryos. The mAb to mouse E-cadherin (clone 36/E-cadherin) directed against its cytoplasmic tail and cross-reacting with chick E-cadherin (also known as L-CAM) was from BD Transduction Laboratories (San Diego, CA). This mAb produced the same staining as rabbit polyclonal antibodies to the external part of the L-CAM molecule (Thiery et al., 1984). The rabbit polyclonal antibody to chick fibronectin was described

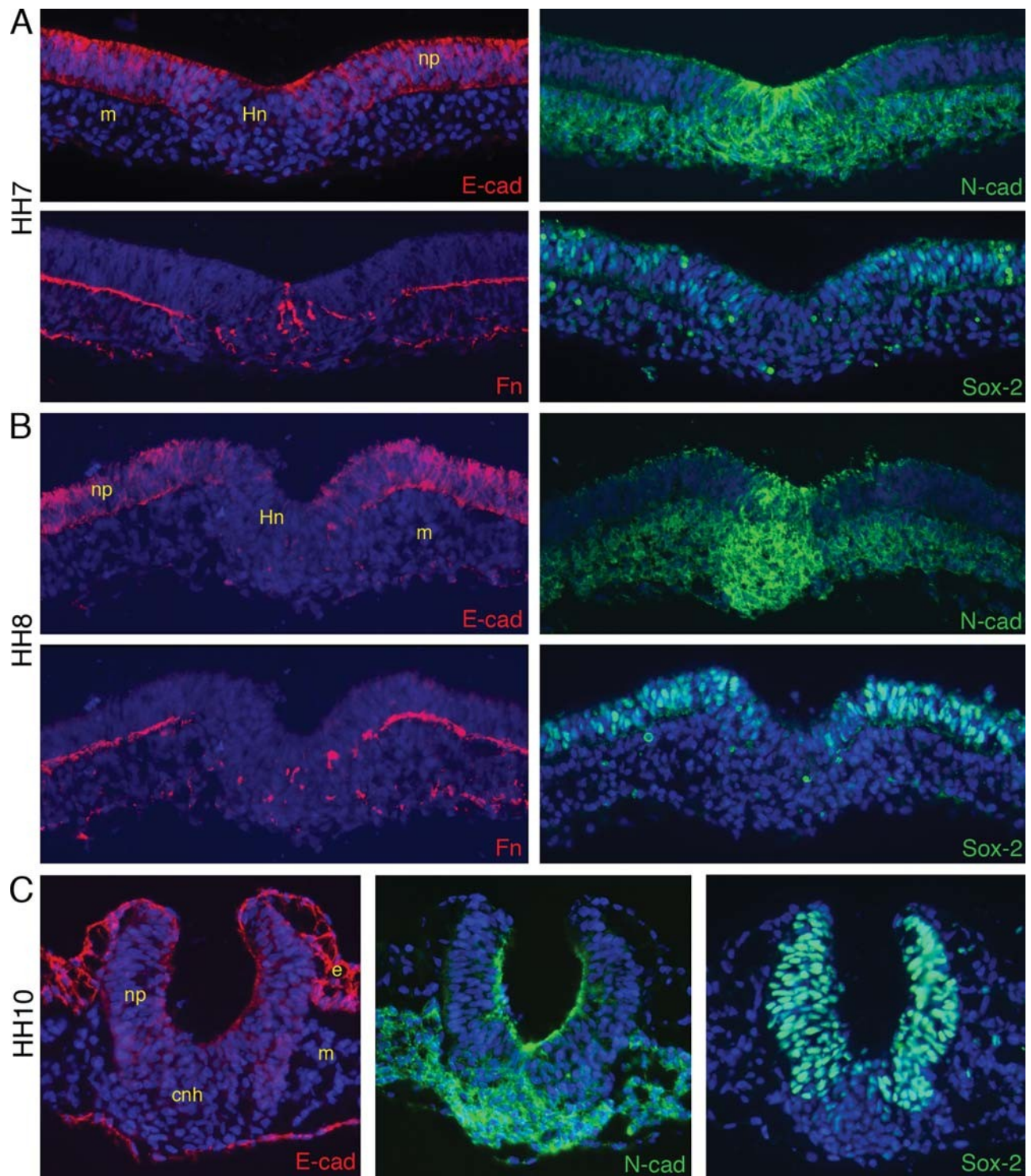


Fig. 11. Expression patterns of E- and N-cadherins during node regression and formation of the notochord. Immunostainings for E-cadherin (E-cad), N-cadherin (N-cad), fibronectin (Fn), and Sox-2 on cross-sections through the node of chick embryo at stage HH7 (A), and at stage HH8 (B), and through the chordo-neural hinge at stage HH10 (C). Cell nuclei were stained with DAPI. cnh, chordo-neural hinge; e, ectoderm; Hn, Hensen's node; m, mesoderm; np, neural plate.

previously (Rovasio et al., 1983). The rabbit polyclonal antibody to human Sox-2 was from Abcam (Cambridge, MA) and the mouse mAb anti-chick Snail-2 (clone 62.1E6) from the Devel-

opmental Study Hybridoma Bank at the University of Iowa (Iowa City, IA). Plasmids for mRNA probe synthesis for chick N-Cadherin was obtained from M. Takeichi, for chick E-Cad-

herin from W. Gallin, for chick Brachyury from K. Storey, for chick Claudin-1 from A. Ryan, for chick Sox-2 from P. Scotting, for chick Snail-1 and Snail-2 from A. Nieto, and for chick

Tbx-6L from M.-A. Teillet. The probes for chick Zeb-2 and Twist-1 were produced from EST clones (ChEST0090B17 and ChEST0313G23, respectively) developed by the BBSRC-UMIST ChickEST Library and purchased from ARK Genomics (Midlothian, Scotland, UK). Linearized DNA was used to synthesize digoxigenin-UTP (Roche, Indianapolis, IN) labeled antisense probes with RNA polymerases from Promega (Madison, WI) and RNA probes were purified with Illustra ProbeQuant G-50 microcolumns (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

### Histological Sections and Immunolabelings

For immunolabelings of sections, embryos were fixed in most cases in a 1% paraformaldehyde solution in PBS supplemented with 4% sucrose and 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> (PBS-sucrose) for 2 hr at room temperature for the preservation of the antigenicity of Sox-2 and Snail-2. In some cases, embryos were fixed overnight at 4 C in 4% paraformaldehyde in PBS-sucrose. After rinsing in PBS-sucrose, embryos were embedded first in a 15% sucrose solution, then in a 15% sucrose-7.5% gelatin solution, and frozen in chilled isopentane. Sections were cut at 10–12 μm on a cryostat and collected on Superfrost/Plus slides (CML, Besancon, France). Sections were permeabilized with 0.1% Triton-X100 in PBS, subjected to immunofluorescence labeling using appropriate secondary antibodies conjugated to Alexa-fluor 488 or 555 (Invitrogen, Carlsbad, CA), and processed, before mounting, for DAPI staining to visualize cells' nuclei. Preparations were observed with a Nikon microscope equipped for epifluorescence and data were collected using the QCapture Pro software (QImaging, Surrey, Canada) and processed using Adobe Photoshop software. Data were acquired using equal exposure times.

### In Situ Hybridizations to Whole Mount Embryos and to Tissue Sections

For in situ hybridizations on tissue sections, embryos were fixed and processed for sectioning as for immunolabelings, except that sections were cut at 20 μm. After extensive washes

in PBS-sucrose, sections were hybridized for 15 hr at 65 C with the digoxigenin-UTP-labeled RNA probes in 50% formamide, 10% dextran sulfate, and Denhart's buffer (10 ml probe at 0.5–1 mg/ml for 1 ml hybridization buffer and 500 ml buffer/slide). Sections were washed twice during 30 min in 50% formamide, 1 SSC, and 0.1% Tween 20 at 65 C, then 4 times during 20 min at room temperature in 100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5, and 0.1% Tween 20 (MABT buffer). After a pre-incubation of 1 hr in MABT buffer containing 10% blocking reagent (Roche) and 10% heat-inactivated lamb serum, sections were incubated overnight at room temperature with the anti-digoxigenin antibody (Roche). After several rinsings with MABT, the sections were rinsed in 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Tween 20, and 25 mM Tris-HCl, pH 9.5, and stained with NBT-BCIP (Roche) following the manufacturer's guidelines. Preparations were observed and data collected and processed as for immunostainings. Essentially the same procedure was used for the in situ hybridizations on whole mount embryos.

### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Maria Jussila, who was supported by the Erasmus European Exchange Program, for her excellent work at the early stages of the study. We thank A. Nieto, A. Ryan, P. Scotting, K. Storey, and M. Takeichi for providing cDNA probes, and Sophie Gournet for advice on the illustrations. Alwyn Dady is a recipient of doctoral fellowships of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Association pour la Recherche contre le Cancer.

### REFERENCES

Aaku-Saraste E, Hellwig A, Huttner WB. 1996. Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure-remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol* 180:664–679.

Acloque H, Ocana OH, Matheu A, Rizzotti K, Wise C, Lovell-Badge R, Nieto MA. 2011. Reciprocal repression between Sox3 and snail transcription factors defines embryonic territories at gastrulation. *Dev Cell* 21:546–558.

Braga VMM. 2002. Cell-cell adhesion and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:546–556.

Bronner-Fraser M, Wolf JJ, Murray BA. 1992. Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube. *Dev Biol* 153:291–301.

Cheung M, Chaboissier M-C, Mynett A, Hirst E, Schedl A, Briscoe J. 2005. The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Dev Cell* 8:179–192.

Chu YS, Eder O, Thomas WA, Simcha I, Pincet F, Ben-Ze'ev A, Perez E, Thiery JP, Dufour S. 2006. Prototypical type I E-cadherin and type II cadherin-7 mediate very distinct adhesiveness through their extracellular domains. *J Biol Chem* 281:2901–2910.

Colas J-F, Schoenwolf GC. 2001. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* 221:117–145.

del Barrio MG, Nieto MA. 2002. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development* 129:1583–1593.

Detrick RJ, Dickey D, Kintner CR. 1990. The effects of N-cadherin misexpression on morphogenesis in *Xenopus* embryos. *Neuron* 4:493–506.

Duband JL. 2006. Neural crest delamination and migration: integrating regulations of cell interactions, locomotion, survival and fate. *Adv Exp Med Biol* 589:45–77.

Duband J-L, Volberg T, Sabanay I, Thiery JP, Geiger B. 1988. Spatial and temporal distribution of the adherens-junction-associated adhesion molecule A-CAM during avian embryogenesis. *Development* 103:325–344.

Duband J-L, Blavet C, Jarov A, Fournier-Thibault C. 2009. Spatio-temporal control of neural epithelial cell migration and epithelium-to-mesenchyme transition during neural tube development. *Dev Growth Diff* 51:25–44.

Dufour S, Beauvais-Jouneau A, Delouvée A, Thiery JP. 1999. Differential function of N-cadherin and cadherin-7 in the control of embryonic cell motility. *J Cell Biol* 146:501–516.

Duguay D, Foty RA, Steinberg MS. 2003. Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Dev Biol* 253:309–323.

Eisaki A, Kuroda H, Fukui A, Asashima M. 2000. XSIP1, a member of two-handed zinc finger proteins, induced anterior neural markers in *Xenopus laevis* animal cap. *Biochem Biophys Res Commun* 271:151–157.

Fernando RI, Litzinger M, Trono P, Hamilton DH, Schlom J, Palena C. 2010. The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. *J Clin Invest* 120:533–544.

Halbleib JM, Nelson WJ. 2006. Cadherins in development: Cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 20:3199–3214.

Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 88:49–92.

Hardy KM, Yatskiyevych TA, Konieczka J, Bobbs AS, Antin PB. 2011. FGF

- signalling through RAS/MAPK and PI3K pathways regulates cell movement and gene expression in the chicken primitive streak without affecting E-cadherin expression. *BMC Dev Biol* 11:20.
- Hatta K, Takagi S, Fujisawa H, Takeichi M. 1987. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol* 120:215–227.
- Hong E, Brewster R. 2006. N-cadherin is required for the polarized cell behaviors that drive neurulation in the zebrafish. *Development* 133:3895–3905.
- Kan NG, Stemmler MP, Junghans D, Kanzler B, de Vries WN, Dominis M, Kemler R. 2007. Gene replacement reveals a specific role for E-cadherin in the formation of a functional trophectoderm. *Development* 134:31–41.
- Kispert A, Koschorz B, Herrmann BG. 1995. The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor. *EMBO J* 14:4763–4772.
- Lele Z, Folchert A, Concha M, Rauch GJ, Geisler R, Rosa F, Wilson SW, Hammerschmidt M, Bally-Cuif L. 2002. parachute/n-cadherin is required for morphogenesis and maintained integrity of the zebrafish neural tube. *Development* 129:3281–3294.
- Libusova L, Stemmler MP, Hierholzer A, Schwarz H, Kemler R. 2010. N-cadherin can structurally substitute for E-cadherin during intestinal development but leads to polyp formation. *Development* 137:2297–2305.
- Linker C, Stern CD. 2004. Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development* 131:5671–5681.
- Lowery LA, Sive H. 2004. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mech Dev* 121:1189–1197.
- Luo Y, Ferreira-Cornwell M, Baldwin H, Kostetskii I, Lenox J, Lieberman M, Radice G. 2001. Rescuing the N-cadherin knockout by cardiac-specific expression of N- or E-cadherin. *Development* 128:459–469.
- Matsumata M, Uchikawa M, Kamachi Y, Kondoh H. 2005. Multiple N-cadherin enhancers identified by systematic functional screening indicate its Group B1 SOX-dependent regulation in neural and placodal development. *Dev Biol* 286:601–617.
- Nakaya Y, Sukowati EW, Wu Y, Sheng G. 2008. RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nat Cell Biol* 10:765–775.
- Nandadasa S, Tao Q, Menon NR, Heasman J, Wylie C. 2009. N- and E-cadherins in *Xenopus* are specifically required in the neural and non-neural ectoderm, respectively, for F-actin assembly and morphogenetic movements. *Development* 136:1327–1338.
- Nelson WJ, Nusse R. 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303:1483–1487.
- Nieto M. 2002. The Snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:155–166.
- Ohta S, Suzuki K, Tachibana K, Tanaka H, Yamada G. 2007. Cessation of gastrulation is mediated by suppression of epithelial-mesenchymal transition at the ventral ectodermal ridge. *Development* 134:4315–4324.
- Panorchan P, Thompson MS, Davis KJ, Tseng Y, Konstantopoulos K, Wirtz D. 2006. Single-molecule analysis of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Sci* 119:66–74.
- Papin C, van Grunsven LA, Verschueren K, Huylebroeck D, Smith JC. 2002. Dynamic regulation of Brachyury expression in the amphibian embryo by XSIPI. *Mech Dev* 111:37–46.
- Patel SD, Chen CP, Bahna F, Honig B, Shapiro L. 2003. Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol* 13:690–698.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7:415–428.
- Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112:535–548.
- Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO. 1997. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* 181:64–78.
- Radies C. 1995. Cadherin expression in the developing vertebrate CNS: From neuromeres to brain nuclei and neural circuits. *Exp Cell Res* 220:243–256.
- Rovasio RA, Delou ee A, Yamada KM, Timpl R, Thiery JP. 1983. Neural crest cell migration: Requirements for exogenous fibronectin and high cell density. *J Cell Biol* 96:462–473.
- Sefton M, Sanchez S, Nieto MA. 1998. Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development* 125:3111–3121.
- Sheng G, dos Reis M, Stern CD. 2003. Churchill, a zinc finger transcriptional activator, regulates the transition between gastrulation and neurulation. *Cell* 115:603–613.
- Simard A, Di Pietro E, Ryan AK. 2005. Gene expression pattern of Claudin-1 during chick embryogenesis. *Gene Expr Patterns* 5:553–560.
- Suzuki SC, Takeichi M. 2008. Cadherins in neuronal morphogenesis and function. *Dev Growth Differ* 50(Suppl 1):S119–130.
- Takeichi M. 1988. The cadherins: Cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102:639–655.
- Takemoto T, Uchikawa M, Kamachi Y, Kondoh H. 2006. Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1. *Development* 133:297–306.
- Takemoto T, Uchikawa M, Yoshida M, Bell DM, Lovell-Badge R, Papaioannou VE, Kondoh H. 2011. Tbx6-dependent Sox2 regulation determines neural or mesodermal fate in axial stem cells. *Nature* 470:394–398.
- Tavares AT, Izpisua-Belmonte JC, Rodriguez-Leon J. 2001. Developmental expression of chick twist and its regulation during limb patterning. *Int J Dev Biol* 45:707–713.
- Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M. 2000. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:91–100.
- Theveneau E, Duband J-L, Altabel M. 2007. Ets-1 confers cranial features on neural crest delamination. *PLoS ONE* 2:e1142.
- Thiery JP, Sleeman JP. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131–142.
- Thiery JP, Delou ee A, Gallin W, Cunningham BA, Edelman GM. 1984. Ontogenetic expression of cell adhesion molecules: L-CAM is found in epithelia derived from the three primary germ layers. *Dev Biol* 102:61–78.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871–890.
- Uchikawa M, Ishida Y, Takemoto T, Kamachi Y, Kondoh H. 2003. Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Dev Cell* 4:509–519.
- Uchikawa M, Yoshida M, Iwafuchi-Doi M, Matsuda K, Ishida Y, Takemoto T, Kondoh H. 2011. B1 and B2 Sox gene expression during neural plate development in chicken and mouse embryos: universal versus species-dependent features. *Dev Growth Differ* 53:761–771.
- Van de Putte T, Maruhashi M, Francis A, Nelles L, Kondoh H, Huylebroeck D, Higashi Y. 2003. Mice lacking Zfh1b, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet* 72:465–470.
- Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F, Bex G. 2005. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* 33:6566–6578.
- Vandewalle C, Van Roy F, Bex G. 2009. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 66:773–787.
- Wakamatsu Y, Endo Y, Osumi N, Weston JA. 2004. Multiple roles of Sox2, an HMG-box transcription factor in avian neural crest development. *Dev Dyn* 229:74–86.
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. 2008. Cadherin switching. *J Cell Sci* 121:727–735.
- Wilson V, Beddington R. 1997. Expression of T protein in the primitive streak is necessary and sufficient for posterior mesoderm movement and somite differentiation. *Dev Biol* 192:45–58.
- Wilson V, Olivera-Martinez I, Storey KG. 2009. Stem cells, signals and vertebrate body axis extension. *Development* 136:1591–1604.
- Yagi T, Takeichi M. 2000. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* 14:1169–1180.

## Partie 2

### *Les Cellules de la Crête Ectodermique ?*

#### *La preuve par les Cadhérines !*

Au cours du développement embryonnaire, on assiste à des phénomènes de dispersion cellulaire analogues à la dissémination métastatique mais contrairement à celle-ci, ils sont parfaitement prédictibles et peuvent être directement étudiés. **Ils constituent donc des modèles pertinents pour l'étude de la TEM impliquée dans la dissémination métastatique et ses conséquences cellulaires.** C'est le cas notamment des cellules des crêtes neurales (CCN), une population cellulaire originellement située à l'interface entre ectoderme de surface et tube neural et à l'origine du système nerveux périphérique, des mélanocytes et de l'ossature de la tête (Le Douarin and Kalcheim, 1999).

Selon le modèle actuel, la dissémination des CCN à partir du neuroépithélium s'effectuerait suivant une TEM qui mettrait en jeu une séquence de cadhérines différente de celle décrite pour les cellules épithéliales en culture et les carcinomes (Taneyhill, 2008) (Duband, 2006). La première molécule d'adhérence intercellulaire exprimée par les cellules neuroépithéliales et les précurseurs des CCN est la E-cadhérine. Cette molécule serait remplacée par la N-cadhérine au cours du repliement de la plaque neurale et de sa fermeture en tube neural mais, contrairement à ce que l'on observe dans les carcinomes, ce phénomène n'induirait pas de migration cellulaire. Les CCN exprimeraient également la cadhérine-6B, et comme la N-cadhérine, ces molécules disparaîtraient de la surface des CCN dès le début de la migration. Ensuite, les CCN en migration exprimeraient d'autres cadhérines, la 7 et la 11. **Toutefois, aussi surprenant que cela puisse paraître, ce modèle n'a jamais été directement vérifié. D'une part, on ne sait pas quand a lieu la transition E/N-cadhérine, si elle a lieu, et d'autre part, la fonction de la cadhérine-6B est sujette à controverse** (Taneyhill et al., 2007) (Coles et al., 2007) (Park and Gumbiner, 2010).

Afin de comprendre précisément la cinétique et les conséquences de ces transitions entre cadhérines sur la dissémination des CCN, nous avons réalisé une analyse spatio-temporelle approfondie des profils d'expression des cadhérines -E, -N et -6B au cours de l'intégralité du processus de formation des CCN, depuis la phase de spécification des

progéniteurs de ces cellules jusqu'à leur migration. En parallèle, nous avons étudié le profil d'expression de marqueurs des lignages cellulaires présents (ectoderme, tube neural et CCN) ainsi que la distribution de marqueurs de polarité cellulaire apicale et basale. Nos observations font apparaître de nombreux éléments nouveaux qui ne soutiennent en rien les modèles précédemment établis.

Nos résultats suggèrent ainsi que **(1) la disparition de la E-cadhérine de la surface des cellules du neurectoderme n'est pas requise pour la spécification des progéniteurs des CCN mais pour leur dissémination en même temps que la cadhérine-6B et (2) l'inhibition de l'expression de la N-cadhérine serait nécessaire à la fois pour la spécification et la dissémination des CCN. Cette ségrégation cellulaire est mise en place par une combinaison subtile de morphogènes. D'une part, un membre de la famille des TGF $\beta$ , BMP-4, favorise la dissémination des CCN en agissant à deux niveaux : le premier, en prévenant l'expression de la N-cadhérine en réprimant Sox-2 puis en induisant l'expression de la cadhérine-6B permettant ainsi la spécification et la ségrégation des CCN ; le deuxième, en induisant l'expression de Snail-2 et ZEB-2 afin de réprimer les cadhérines -E et -6B, permettant ainsi la TEM de ces cellules ; et d'autre part, les membres de la famille des FGF, FGF-4 dans cette étude, favorisent un destin cellulaire neural en induisant l'expression de Sox-2 conduisant ainsi à celle de la N-cadhérine et réprimant le déterminisme Crête.**

**Les Cellules de la Crête constituent ainsi un tissu à part du tube neural. Ces cellules se distinguent du reste du neuroépithélium par un répertoire d'expression de cadhérines spécifiques : la E-cadhérine exprimée par les cellules de l'ectoderme de surface non-neural, la cadhérine-6B exprimée par les cellules de la crête et enfin la N-cadhérine exprimée par les cellules neurales canoniques. De plus, les CCN expriment le morphogène BMP-4 spécifiquement exprimé par l'ectoderme non-neural. Cet argument ajouté au répertoire spécifique de cadhérines exprimé par les cellules de la Crête exclut ou du moins atténue la terminologie de neurale attribué à cette population cellulaire. En effet, les cellules de la Crête seraient plutôt d'origine ectodermique que neurale « canonique » !! Nos données rejoignent ainsi d'une certaine manière les résultats de Tom Jessell et la théorie développée par Jim Weston au cours de la première décennie 2000. Dès lors devrait-on parler plutôt de **Cellules de la Crête Ectodermique ?****



## *I. Un répertoire spécifique de cadhérines ségrège les Cellules de la Crête des tissus avoisinants*

Afin de comprendre précisément les conséquences et la cinétique de ces changements de cadhérines lors du développement des cellules de la Crête, nous avons tout d'abord analysé les profils d'expression des protéines et des transcrits codant pour les cadhérine -E, -N et -6B par immunohistochimie et hybridation in situ à la fois sur coupes et sur embryons d'oiseau entiers entre les stade 7 et 16 de la classification établie par Hamburger et Hamilton (HH ; (Hamburger and Hamilton, 1992) soit entre 20h et 48h de développement. En parallèle, nous avons également analysé les profils d'expression des principaux régulateurs de ces cadhérines décrits dans la littérature : Snail-1, Snail-2/Slug, ZEB-2/SIP-1 et Twist-1, réprimant la E-cadhérine et la cadhérine-6B ; Sox-2, facteur de transcription à boîte HMG connu comme activateur transcriptionnel de la N-cadhérine (del Barrio and Nieto, 2002; Matsumata et al., 2005; Nieto et al., 1992; Nieto et al., 1994; Peinado et al., 2007; Taneyhill et al., 2007). Sox-2 est également utilisé comme marqueur du tissu neural définitif (Linker and Stern, 2004; Uchikawa et al., 2003; Uchikawa et al., 2011). Sox-10 et HNK-1 sont utilisés comme marqueurs de CCN (Cheng et al., 2000; Cheung and Briscoe, 2003; Newgreen et al., 1990; Tucker et al., 1984; Vincent and Thiery, 1984).

### *A. Cinétique des transitions de Cadhérines au cours de la spécification des cellules de la Crête*

La formation des CCN est traditionnellement liée aux mouvements de neurulation. Lors du développement des amniotes, la formation du système nerveux central (comme nous l'avons décrit dans le chapitre 2) fait intervenir deux mécanismes morphogénétiques très différents selon l'axe rostro-caudal : dans la région antérieure (région céphalique jusqu'à la région du tronc moyen-future région thoracique) a lieu la neurulation primaire et dans la région postérieure (future région lombo-sacrée), la neurulation secondaire (Colas and Schoenwolf, 2001). La spécification des cellules de la Crête débute chez l'oiseau dès la fin de la gastrulation et se fait en concomitance avec la mise en place des régions-frontières de la plaque neurale suggérant des intrications complexes entre les deux programmes génétiques de formation (Khudyakov and Bronner-Fraser, 2009). Afin de déterminer si les transitions de cadhérines étaient des conséquences de ces programmes de formation des régions-frontières de la plaque neurale et de spécification des CCN, nous avons analysé les profils d'expression

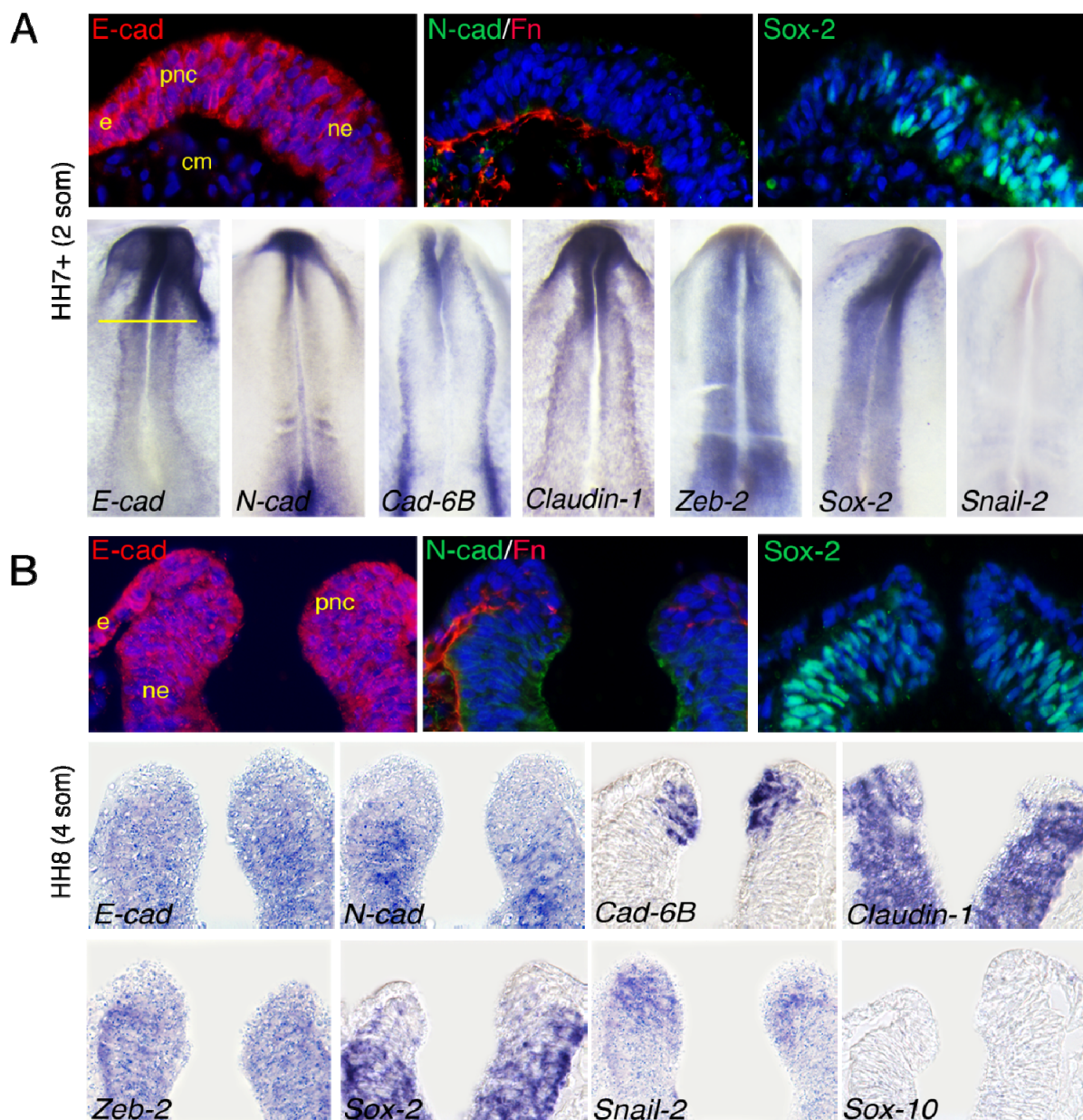
des cadhérine -E/-N et -6B depuis l'apparition des bourrelets neuraux au niveau céphalique (HH 7+) jusqu'à la fermeture du tube neural du tronc moyen (HH11), régions de formation d'un tube neural primaire (Colas and Schoenwolf, 2001). Dans la région céphalique, la E-cadhérine est fortement exprimée, aussi bien au niveau protéique qu'au niveau des messagers, dans l'ensemble de la plaque neurale comprenant la région des précurseurs des CCN mais également, comme il l'a déjà été décrit, par les cellules de l'ectoderme non-neural (Thiery et al., 1984) (Fig. 27A, B). Au niveau protéique, l'expression de la E-cadhérine se restreint progressivement aux précurseurs des CCN dans les régions troncales antérieure et moyenne (Fig. 28 ; Fig. 29). Contrairement à la protéine, les transcrits codant pour la E-cadhérine sont observés dans l'ensemble des cellules de la gouttière neurale à tous les niveaux anatomiques de l'embryon (Fig. 27 ; Fig. 28 ; Fig. 29) jusqu' à la fermeture complète du tube neural où les messagers sont uniquement exprimés par les cellules de l'ectoderme non-neural et à l'interface entre les deux bourrelets neuraux lors de leur fusion (Fig. 29 C). L'expression de la Claudin-1, protéine des jonctions serrées, suit globalement celle de la E-cadhérine au cours du développement embryonnaire (Fig. 27 ; Fig. 28 ; Fig. 29). La N-cadhérine commence à être exprimée très faiblement par les cellules neurales ventrales au stade HH8 (Hatta et al., 1987; Hatta and Takeichi, 1986) (Fig. 27 B) et l'expression de cette molécule d'adhérence reste restreinte aux cellules neurales latéro-ventrales du tube neural dans la région antérieure de l'embryon (Fig. 28 ; Fig. 29). Il apparaît ainsi que les précurseurs des CCN n'expriment jamais la N-cadhérine dans une région anatomique très large de l'embryon : allant de la région céphalique jusqu'à la région lombo-sacrée. De plus, dans cette région anatomique, l'expression de la protéine suit précisément celle des transcrits codant pour la N-cadhérine (Fig. 27 ; Fig. 28 ; Fig.29) contrairement aux observations réalisées par le laboratoire de Chaya Kalcheim (Shoval et al., 2007). La cadhérine-6B présente un profil d'expression complémentaire à celui de la N-cadhérine à tous les niveaux anatomiques avec une expression forte dans la région des précurseurs des CCN (Nakagawa and Takeichi, 1995; Nakagawa and Takeichi, 1998) (Fig. 27 ; Fig. 28 ; Fig. 29). Cependant, une co-distribution cadhérine-E/-6B est communément observée dans la région des précurseurs des CCN (Fig. 27B ; Fig.28 ; Fig.29A, B) jusqu'à la fermeture effective du tube neural. En effet, les précurseurs des CCN n'expriment plus que la cadhérine-6B après formation du tube neural, la E-cadhérine étant exprimée uniquement par les cellules de l'ectoderme de surface (Fig. 29C). Nos résultats suggèrent ainsi que lors de leur spécification, les précurseurs de CCN connaissent une transition cadhérine-E/-6B et n'expriment jamais la N-cadhérine contrairement au modèle communément admis.

En ce qui concerne les régulateurs examinés ici, seuls les facteurs de transcription Sox-2 et ZEB-2 semblent impliqués dans les transitions de cadhérines à la surface des cellules du futur tube neural et en particulier à la surface des précurseurs de CCN. En effet, des études génétiques chez la souris montrent une persistance d'expression de la E-cadhérine dans le tube neural d'embryons mutés pour le gène *zeb-2*, suggérant ainsi un rôle nécessaire de ZEB-2 dans la répression de la E-cadhérine dans le tissu neural (Van de Putte et al., 2003). De plus, une expression ectopique de Sox-2 dans les cellules de l'ectoderme au niveau céphalique d'embryons très précoces d'oiseau conduit à une expression ectopique de N-cadhérine, indiquant *de facto* que le facteur de transcription Sox-2 est susceptible d'induire l'expression de la N-cadhérine dans le tissu neuroépithélial (Matsumata et al., 2005). Le facteur de transcription ZEB-2 est ainsi exprimé dans l'ensemble des cellules neurales dès les stades précoces du développement embryonnaire, dès l'induction neurale (Fig. 27A) suggérant un rôle canonique de répresseur de la E-cadhérine. Cependant, ce facteur de transcription est très faiblement exprimé par les précurseurs de CCN, à tous les niveaux anatomiques, lors de la spécification de ces cellules coïncidant ainsi avec une expression forte et plus longue de la E-cadhérine mais également de la cadhérine-6B à la surface des précurseurs (Fig. 27 ; Fig.28 ; Fig.29). La distribution de Sox-2 est très dynamique au cours de la spécification des CCN et suit les mouvements de la neurulation primaire. Tout d'abord, l'expression de Sox-2 précède largement celle de la N-cadhérine par les cellules neurales (Fig. 27A) et s'étend, dans un premier temps, jusqu'à la région-frontière entre plaque neurale et ectoderme de surface à tous les niveaux anatomiques de l'embryon (Fig. 27A ; Fig. 28A et Fig. 29A). Puis les mouvements de neurulation se poursuivent conduisant à la formation d'une gouttière neurale dont les cellules à l'apex des bourrelets neuraux, les précurseurs des CCN, n'expriment plus Sox-2 tant au niveau protéique qu'au niveau des messagers suivant ainsi le profil d'expression de la N-cadhérine dans le tissu neural (Fig. 27B ; Fig. 28 ; Fig. 29B et C). Il apparaît ainsi que l'absence d'expression de N-cadhérine à la surface des précurseurs de CCN est liée à une répression de Sox-2 juste avant la fusion des bourrelets neuraux. Cependant, lors des phases précoces de la neurulation, au stade plaque neurale jusqu'au début du soulèvement des bourrelets neuraux, l'expression de Sox-2 par l'ensemble des cellules de la plaque neurale suggère une régulation transcriptionnelle beaucoup plus complexe de la N-cadhérine au niveau des précurseurs des CCN. Alors que Sox-2 semble ainsi être un acteur moléculaire requis pour l'induction de la N-cadhérine par les cellules neurales canoniques, nos observations suggèrent que d'autres facteurs de transcription impliqués dans la mise en place de la région-frontière plaque neurale/ectoderme de surface tel que Pax-7 seraient nécessaires à

la répression de la N-cadhérine dans cette région, surtout lors des phases précoces de la formation du tube neural (Basch et al., 2006). Le facteur de transcription Snail-2 est exprimé uniquement par les précurseurs de CCN (Nieto et al., 1994) et l'expression de ce facteur commence à être observée uniquement lors des phases tardives de la neurulation, c'est-à-dire juste avant la fusion des bourrelets neuraux (Fig. 27 B ; Fig. 28 B ; Fig.29 C) suggérant un rôle requis de Snail-2 uniquement lors de la Transition Epithélium-Mésenchyme des CCN en réprimant la E-cadhérine et la cadhérine-6B (Coles et al., 2007; Taneyhill et al., 2007). L'absence d'expression de Sox-10, facteur de transcription exprimé par les CCN (Cheng et al., 2000; Cheung and Briscoe, 2003), indique bien que notre étude est réalisée avant la délamination des CCN.

Nos résultats suggèrent finalement que le répertoire de cadhérines exprimés par les CCN est lié à la mise en place des régions-frontières entre plaque neurale/ectoderme de surface et est dépendant des mouvements de la neurulation primaire. En effet, lors de leur spécification, les CCN ne connaissent jamais une transition cadhérine -E/-N dans les régions antérieures de l'embryon d'oiseau, siège de la neurulation primaire, mais plutôt une transition progressive cadhérine -E/-6B. Cette ségrégation cellulaire et tissulaire nécessiterait ainsi une absence d'expression de la N-cadhérine par les CCN conduit par une répression du facteur de transcription Sox-2 dont l'expression dans la région des précurseurs de CCN varie en fonction des mouvements morphogénétiques de la neurulation primaire.

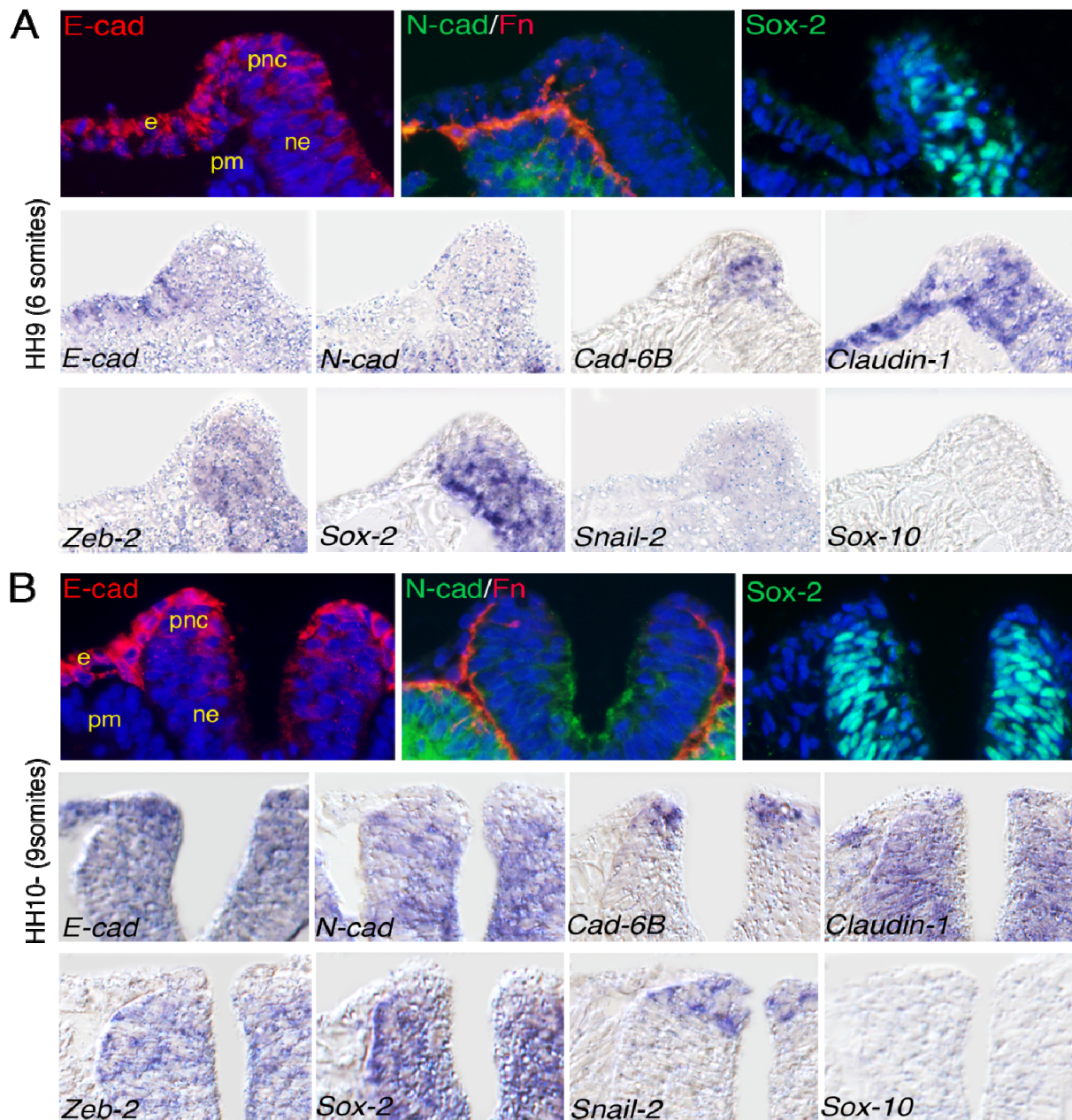
## NC specification : Cranial level



**Figure 27** : Profil d'expression des cadhérines *-E*, *-N* et *-6B* et de leurs régulateurs transcriptionnels lors de la spécification des Cellules de la Crête dans la région céphalique d'embryons d'oiseau

Immunohistochimie sur coupes réalisées au niveau du mésencéphale d'embryons d'oiseau au stade HH7+ (2 somites) (A) et au stade HH8 (4 somites) (B) montrant l'expression au niveau protéique de la E-cadhérine (E-cad), la N-cadhérine (N-cad), la fibronectine (Fn) et Sox-2. Le noyau des cellules est marqué au DAPI. *cm* : mésenchyme céphalique ; *e* : ectoderme de surface ; *ne* : neuroépithélium ; *pnc* : précurseurs des cellules de la crête neurale. Hybridation in situ sur des embryons entiers au stade HH7+ (2 somites) (A) et hybridation in situ sur coupes d'embryons d'oiseau au stade HH8 (4 somites) montrant l'expression des transcrits de la E-cadhérine (E-cad), N-cadhérine (N-cad), cadhérine-6B (Cad-6B), Claudin-1, Zeb-2, Sox-2, Snail-2 et Sox-10.

## NC specification : Anterior Trunk

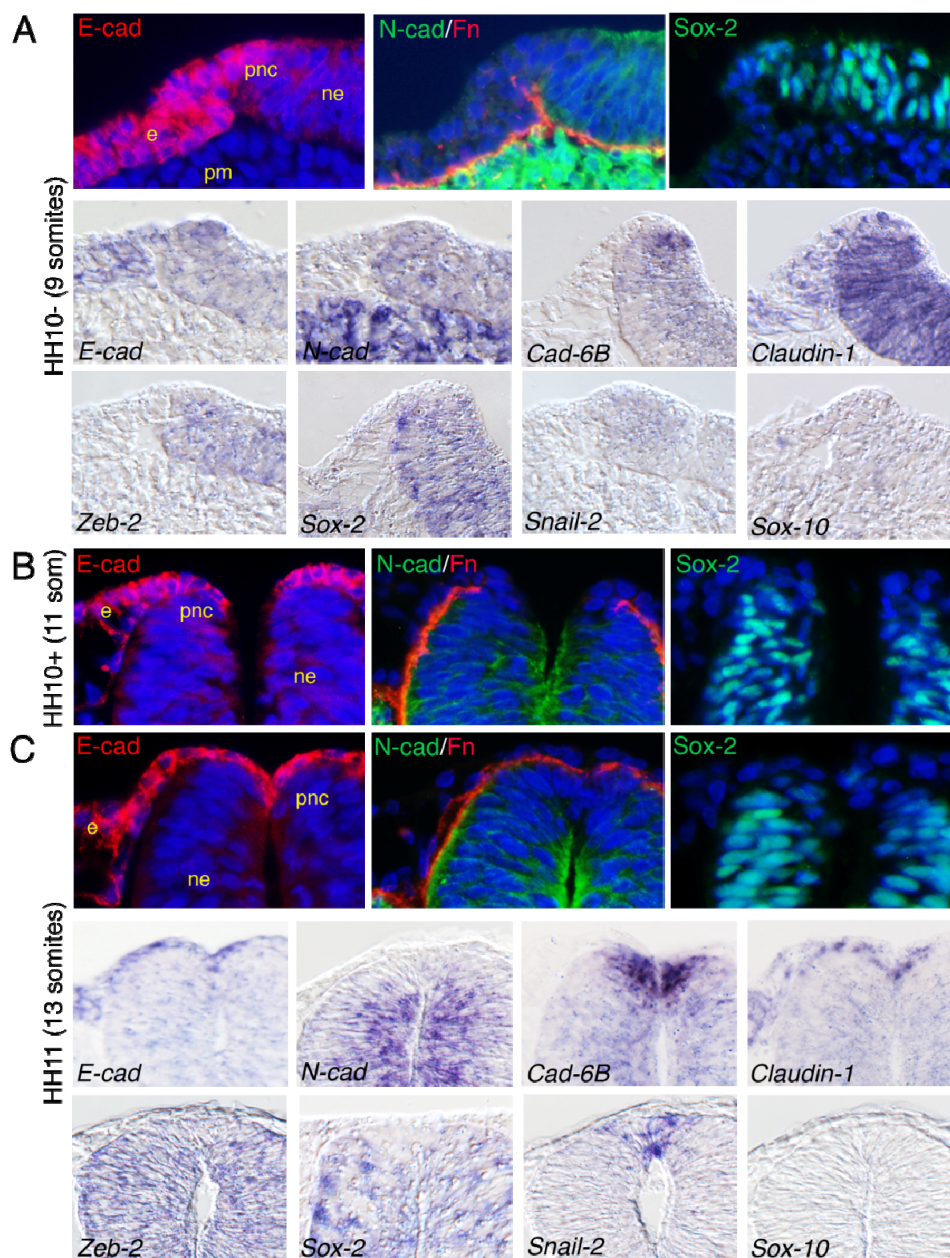


**Figure 28 :** Profil d'expression des cadhérine -E, -N et -6B et de leurs régulateurs

*transcriptionnels lors de la spécification des Cellules de la Crête dans la région du tronc antérieur (région des futures vertèbres cervicales) d'embryons d'oiseau*

ImmunoHistochimie sur coupes réalisées au niveau du tronc antérieur d'embryons d'oiseau au stade HH9 (6 somites) (A) et au stade HH10- (9 somites) (B) montrant l'expression au niveau protéique de la E-cadhérine (E-cad), la N-cadhérine (N-cad), la fibronectine (Fn) et Sox-2. Les noyaux nucléaires sont marqués au DAPI. *e* : ectoderme ; *ne* : neuroépithélium ; *pm* : mésoderme présegmenté ; *pnc* : précurseurs des cellules de la crête neurale. Hybridation in situ sur coupes d'embryons d'oiseau au stade HH9 (6 somites) (A) et au stade HH10- (9 somites) montrant l'expression des transcrits de la E-cadhérine (E-cad), N-cadhérine (N-cad), cadhérine-6B (Cad-6B), Claudin-1, Zeb-2, Sox-2, Snail-2 et Sox-10.

## NC Specification : Mid-trunk



**Figure 29 :** Profil d'expression des cadhérines -E, -N et -6B et de leurs régulateurs transcriptionnels lors de la spécification des Cellules de la Crête dans la région du tronc moyen (région des futures vertèbres thoraciques) d'embryons d'oiseau

Immunohistochimie sur coupes réalisées au niveau du tronc antérieur d'embryons au stade HH10- (9 somites) (A), au stade HH10+ (11 somites) (B) et au stade HH11 (13 somites) montrant l'expression au niveau protéique de la E-cadhérine (E-cad), la N-cadhérine (N-cad), la fibronectine (Fn) et de Sox-2. Les noyaux sont marqués au DAPI. *e* : ectoderme de surface ; *ne* : neuroépithélium ; *pm* : mésoderme présegmenté ; *pnc* : précurseurs des cellules de la crête neurale. Hybridation in situ sur coupes d'embryons d'oiseau au stade HH10- (9 somites) (A) et au stade HH11 (13 somites) montrant l'expression des transcrits de la E-cadhérine (E-cad), N-cadhérine (N-cad), cadhérine-6B (Cad-6B), Claudin-1, Zeb-2, Sox-2, Snail-2 et Sox-10.

### *B. Profils d'expression des cadhérines lors de la délamination des Cellules de la Crête*

Afin de déterminer précisément les mécanismes d'adhérence mises en jeu lors de la délamination des CCN, nous avons analysé précisément les profils d'expression des cadhérines -E/-N et -6B ainsi que de leurs régulateurs lors de ce mécanisme au cours du développement embryonnaire d'oiseau. Dans la région antérieure de l'embryon allant de la région céphalique au tronc moyen, la ségrégation cellulaire et tissulaire initiée lors de la spécification des CCN se poursuit. En effet, la E-cadhérine, la cadhérine-6B ainsi que la Claudin-1 continuent encore à être exprimées par les précurseurs des CCN au début du programme de délamination (Fig. 30A ; Fig. 31A). Cependant, alors que l'expression de ces trois molécules d'adhérence demeure encore très forte dans le tube neural céphalique tant au niveau protéique qu'au niveau des ARN messagers (Fig. 30A), celle des transcrits codant pour la E-cadhérine et de la Claudin-1 diminue tout de même dans le tube neural du tronc antérieur et moyen (Fig. 31A ; Fig. 32A). Néanmoins, l'expression de la E-cadhérine au niveau protéique reste élevée à la surface des précurseurs des CCN du tronc antérieur suggérant ainsi un programme de répression transcriptionnelle déjà bien engagé (Fig. 31A). Lors de la phase intense de délamination, la E-cadhérine n'est plus exprimée par les précurseurs de CCN de la région du tronc antérieur et moyen (Fig. 31B ; 32). Nos résultats suggèrent ainsi qu'une transition cadhérine-E /-6B voire une co-expression a lieu à la surface des précurseurs des CCN des régions antérieures de l'embryon. La N-cadhérine, quant à elle, n'est toujours pas exprimée par les précurseurs de CCN tant au niveau protéique qu'au niveau des transcrits dans ces régions anatomiques lors de la délamination des CCN (Fig. 30A ; Fig. 31 ; Fig. 32). De plus, afin d'exclure tout phénomène de clivage protéolytique, nous avons observé différentes régions de la N-cadhérine à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement un épitope de la région proche de la membrane plasmique (Fig. 30 – 33, N-cad-pm) et un anticorps reconnaissant spécifiquement un épitope dans la région N-terminale qui va être clivée par action de protéases (Fig. 30 – 33, N-cad-N). Aucune différence significative entre les deux profils d'expression n'a été observée sur l'ensemble de l'axe antéro-postérieur de l'embryon d'oiseau (Fig. 30 – 33) suggérant ainsi que l'absence de N-cadhérine à la surface des précurseurs des CCN n'est pas liée à un mécanisme de régulation post-traductionnelle par clivage protéolytique contrairement au modèle proposé par Chaya Kalcheim (Shoval et al., 2007). Dans la région céphalique, en plus d'une ségrégation cellulaire et tissulaire orchestrée par un répertoire de cadhérines spécifiques, la lame basale représentée par la fibronectine



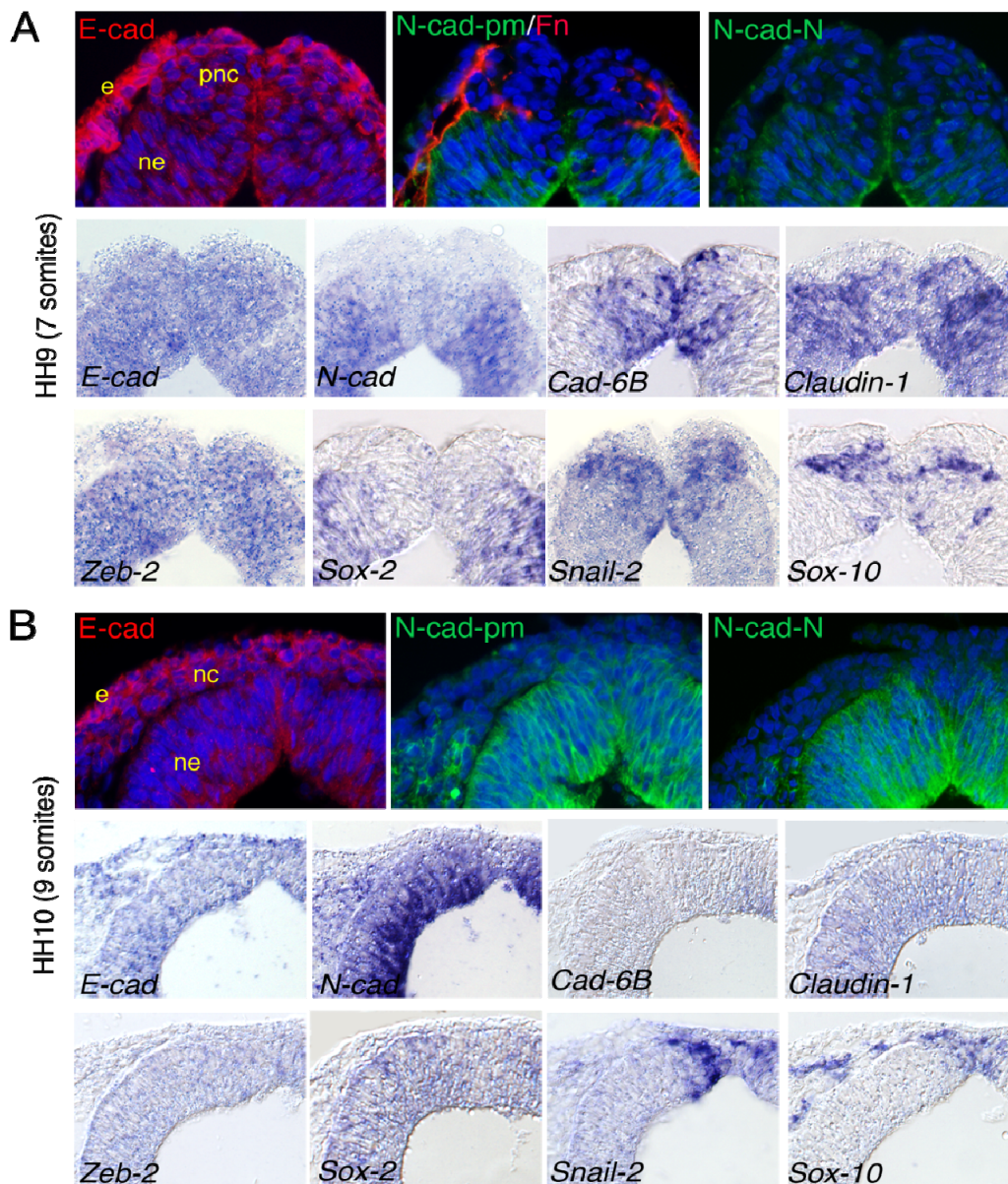
vient séparer physiquement les CCN céphaliques du reste du tube neural (Fig. 30A) marquant une véritable frontière entre ces différentes populations cellulaires du tube neural. Dans la région postérieure de l'embryon ou future région lombo-sacrée issue d'une neurulation secondaire, la situation semble très différente. Contrairement aux régions antérieures, un nouveau répertoire spécifique de cadhérines est mis en place dans cette région postérieure issue d'un mode de neurulation différent. En effet, les précurseurs de CCN expriment à la fois la cadhérine-6B et surtout la N-cadhérine et n'expriment plus ni la E-cadhérine ni la Claudin-1 (Fig. 33). Nous retrouvons ainsi (enfin) une image dogmatique du répertoire des cadhérines exprimés par les CCN (Shoval et al., 2007; Taneyhill, 2008). Cependant l'expression particulière de la lame basale suggère un phénomène de tri cellulaire commun aux régions antérieures de l'embryon. En effet, la cinétique de formation selon un mode secondaire du tube neural montre tout de même une région du toit dont les cellules finissent par ne plus exprimer la N-cadhérine (Fig. 33A et Fig. 33D). Nos résultats suggèrent ainsi que les précurseurs de CCN exprimant la cadhérine-6B et la E-cadhérine se situeraient très dorsalement au niveau du bourgeon caudal lors de l'initiation de la neurulation secondaire (Fig. 33A) puis vont être réintégrées pour former le toit du tube neural (Fig. 33A, B et C). On retrouverait ainsi une image finale commune selon l'axe antéro-postérieur d'un tube neural dont les précurseurs de CCN n'expriment pas la N-cadhérine mais uniquement la cadhérine-6B lors du départ en délamination. Néanmoins cette hypothèse reste à vérifier...

En ce qui concerne les régulateurs, dans les régions antérieures, le facteur de transcription ZEB-2 continue à être exprimé dans l'ensemble du tube neural coïncidant avec la diminution d'expression de la E-cadhérine lors de l'initiation de la délamination des CCN suggérant un rôle de répresseur canonique de la E-cadhérine (Fig. 30 – 32). Cependant le profil d'expression de ZEB-2 concorde avec celui de Snail-2 lors de la transition épithélium-mésenchyme des CCN du tronc antérieur et moyen (Fig. 31B et 32A). En effet, la forte expression de ZEB-2 dans les précurseurs ainsi que les CCN qui émergent du tube neural et celle de Snail-2 suggèrent une action synergique de ces deux facteurs de transcription lors de la TEM de ces cellules (Van de Putte et al., 2007). Ces deux facteurs de transcription reconnaissent les mêmes séquences régulatrices situées sur le promoteur du gène codant pour la E-cadhérine mais également observées sur celui codant pour la cadhérine-6B (Taneyhill et al., 2007). La distribution de Sox-2 suit celle de la N-cadhérine dans les régions antérieures, ce facteur de transcription n'est pas exprimée par les précurseurs de CCN (Fig. 30A ; Fig. 31 ; Fig. 32) suggérant ainsi très fortement une induction d'expression de la N-cadhérine par ce

facteur de transcription uniquement par les cellules neurales canoniques (Matsumata et al., 2005). Nos résultats suggèrent ainsi que l'absence d'expression de la N-cadhérine par les précurseurs de CCN est liée à une nécessaire répression de Sox-2. Cependant, dans la région du tube neural postérieur, le profil d'expression de Sox-2 devient complexe (Fig. 33). En effet, il n'est toujours pas exprimé par les précurseurs de la CCN malgré une expression de N-cadhérine (Fig. 33) suggérant une régulation sensiblement différente de la N-cadhérine dans la région postérieure de l'embryon d'oiseau.

Nos résultats suggèrent ainsi que la mise en place du répertoire spécifique de cadhérines initiée lors de la spécification des CCN est un prérequis nécessaire à la transition épithélium-mésenchyme de ces cellules du toit du tube neural. En effet, dans la plus grande partie de l'embryon d'oiseau, les précurseurs de CCN expriment soit les cadhérine-E et -6B à la fois soit uniquement la cadhérine-6B mais jamais la N-cadhérine. L'expression spécifique de cadhérines ségrège ainsi trois populations cellulaires, l'ectoderme de surface exprimant la E-cadhérine, les CCN exprimant la cadhérine-6B et les cellules neurales exprimant la N-cadhérine. Enfin cette distribution spécifique de cadhérines dans la région des précurseurs de CCN confirme ainsi et renforce le rôle majeur des facteurs de transcription ZEB-2 et surtout Snail-2 dans la transition épithélium-mésenchyme des cellules de la Crête neurale. Dans la région postérieure, cette ségrégation tissulaire semble plus complexe. En effet, les précurseurs de CCN expriment la cadhérine-6B et la N-cadhérine suggérant ainsi un programme de TEM sensiblement différent entre les régions antérieures et postérieures de l'embryon d'oiseau et qui peut être corrélé au mode de formation du tube neural.

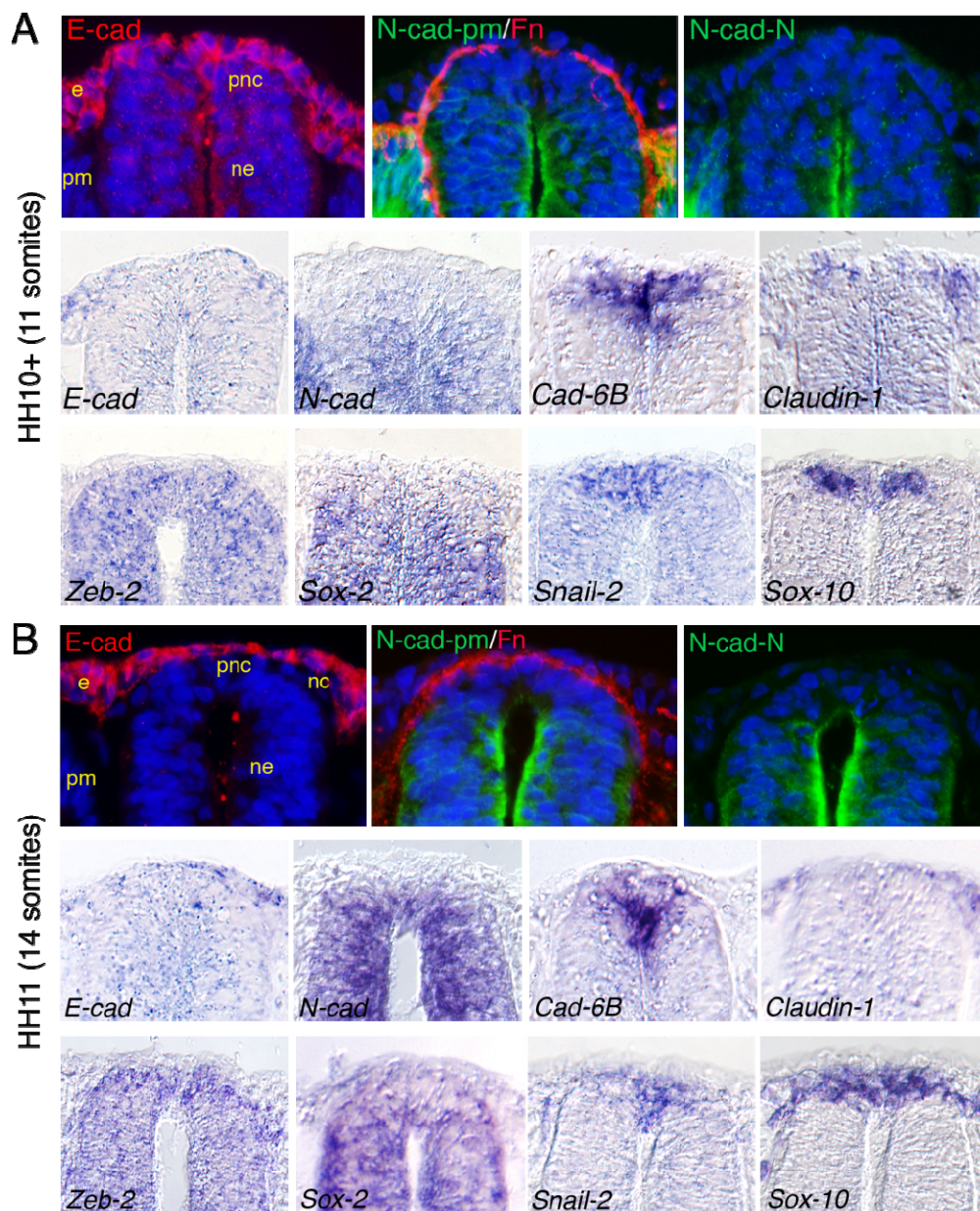
## NC delamination : Cranial level



**Figure 30** : Profil d'expression des cadhérines *-E*, *-N* et *-6B* et de leurs régulateurs transcriptionnels lors de la délamination des Cellules de la Crête dans la région céphalique d'embryons d'oiseau

Immunohistochimie sur coupes réalisées au niveau du tronc antérieur d'embryons au stade HH9 (7 somites) (A) et au stade HH10 (9 somites) montrant l'expression au niveau protéique de la E-cadhérine (E-cad), la N-cadhérine (N-cad-pm : épitope proche de la membrane cytoplasmique ; N-cad-N : épitope au niveau N-terminal), la fibronectine (Fn). Les noyaux sont marqués au DAPI. *e* : ectoderme de surface ; *ne* : neuroépithélium ; *pnc* : précurseurs des cellules de la crête neurale. Hybridation in situ sur coupes d'embryons d'oiseau au stade HH9 (7 somites) (A) et au stade HH10 (9 somites) montrant l'expression des transcrits de la E-cadhérine (E-cad), N-cadhérine (N-cad), cadhérine-6B (Cad-6B), Claudin-1, ZEB-2, Sox-2, Snail-2 et Sox-10.

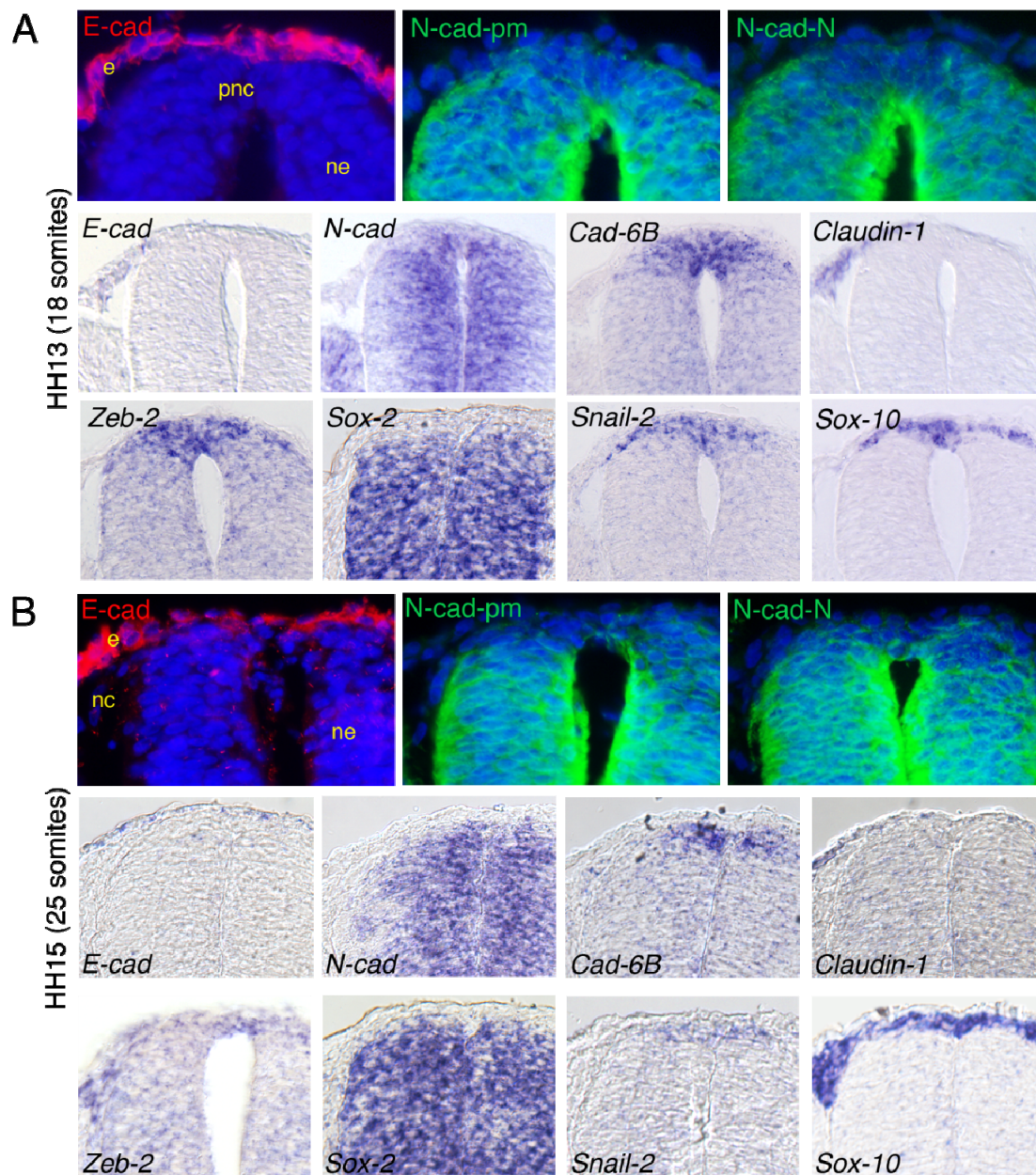
## NC delamination : Anterior Trunk



**Figure 31** : Profil d'expression des cadhérines -E, -N et -6B et de leurs régulateurs transcriptionnels lors de la délamination des Cellules de la Crête dans la région du tronc antérieur d'embryons d'oiseau

Immunohistochimie sur coupes réalisées au niveau du tronc antérieur d'embryons au stade HH10+ (11 somites) (A) et au stade HH11 (14 somites) montrant l'expression au niveau protéique de la E-cadhérine (E-cad), N-cadhérine (N-cad-pm : épitope proche de la membrane cytoplasmique ; N-cad-N : épitope au niveau N-terminal), fibronectine (Fn). Les noyaux sont marqués au DAPI. *e* : ectoderme de surface ; *ne* : neuroépithélium ; *nc* : cellules de la Crête ; *pnc* : précurseurs des cellules de la crête neurale. Hybridation in situ sur coupes d'embryons d'oiseau au stade HH9 (7 somites) (A) et au stade HH10 (9 somites) montrant l'expression des transcrits de la E-cadhérine (E-cad), N-cadhérine (N-cad), cadhérine-6B (Cad-6B), Claudin-1, ZEB-2, Sox-2, Snail-2 et Sox-10.

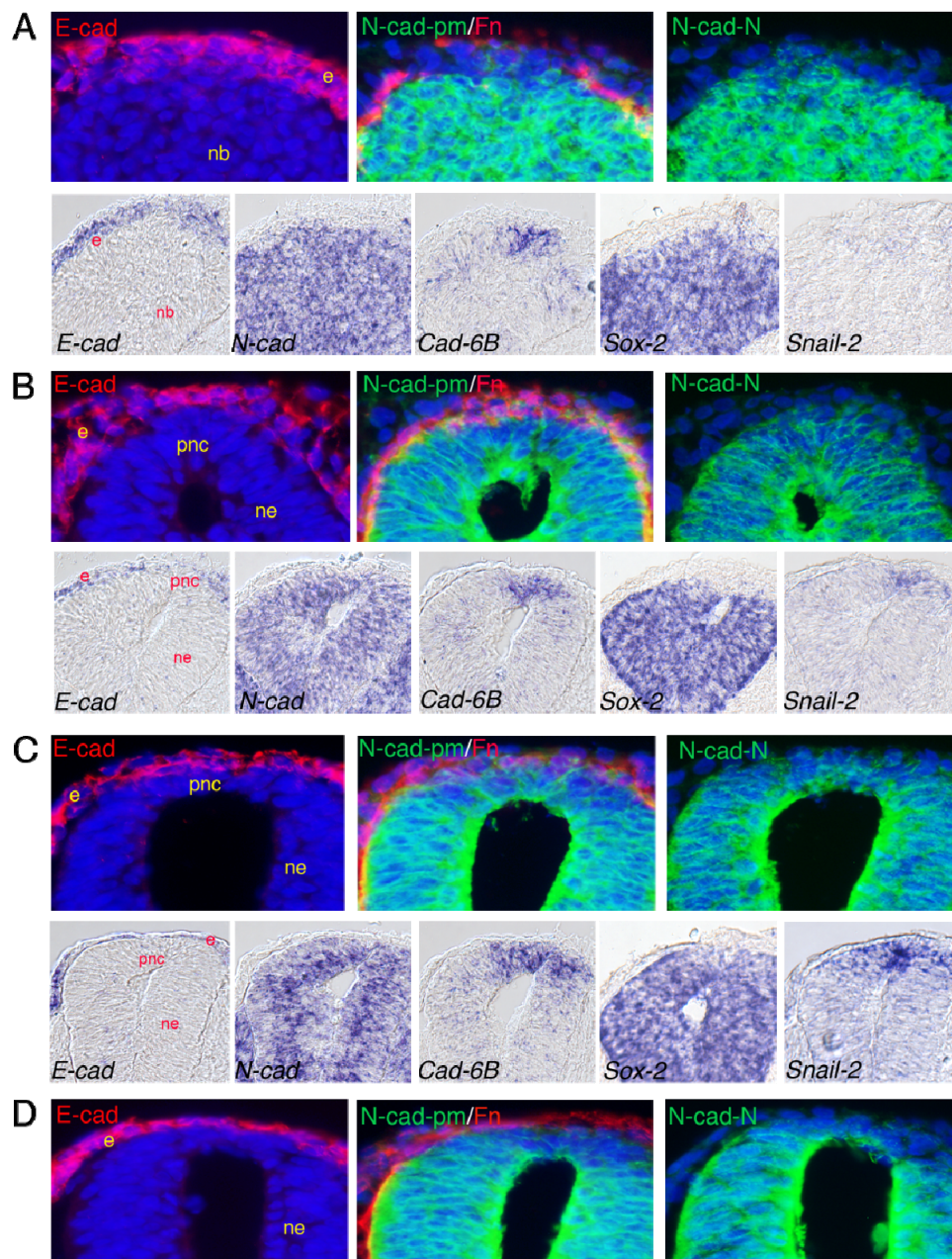
## NC delamination : Mid-Trunk



**Figure 32** : Profil d'expression des cadhérines -E, -N et -6B et de leurs régulateurs transcriptionnels lors de la délamination des Cellules de la Crête dans la région du tronc moyen d'embryons d'oiseau

Immunohistochimie sur coupes réalisées au niveau du tronc moyen d'embryons au stade HH13 (18 somites) (A) et au stade HH15 (25 somites) montrant l'expression au niveau protéique de la E-cadhérine (E-cad), N-cadhérine (N-cad-pm : épitope proche de la membrane cytoplasmique ; N-cad-N : épitope au niveau N-terminal), fibronectine (Fn). Les noyaux sont marqués au DAPI. *e* : ectoderme de surface ; *ne* : neuroépithélium ; *nc* : cellules de la Crête ; *pnc* : précurseurs des cellules de la crête neurale. Hybridation in situ sur coupes d'embryons d'oiseau au stade HH9 (7 somites) (A) et au stade HH10 (9 somites) montrant l'expression des transcrits de la E-cadhérine (E-cad), N-cadhérine (N-cad), cadhérine-6B (Cad-6B), Claudin-1, ZEB-2, Sox-2, Snail-2 et Sox-10.

## NC delamination : Posterior Trunk



**Figure 33** : Profil d'expression des cadhérines -E, -N et -6B et de leurs régulateurs transcriptionnels lors de la délamination des Cellules de la Crête dans la région du tronc postérieur (région lombo-sacrée) d'embryons d'oiseau

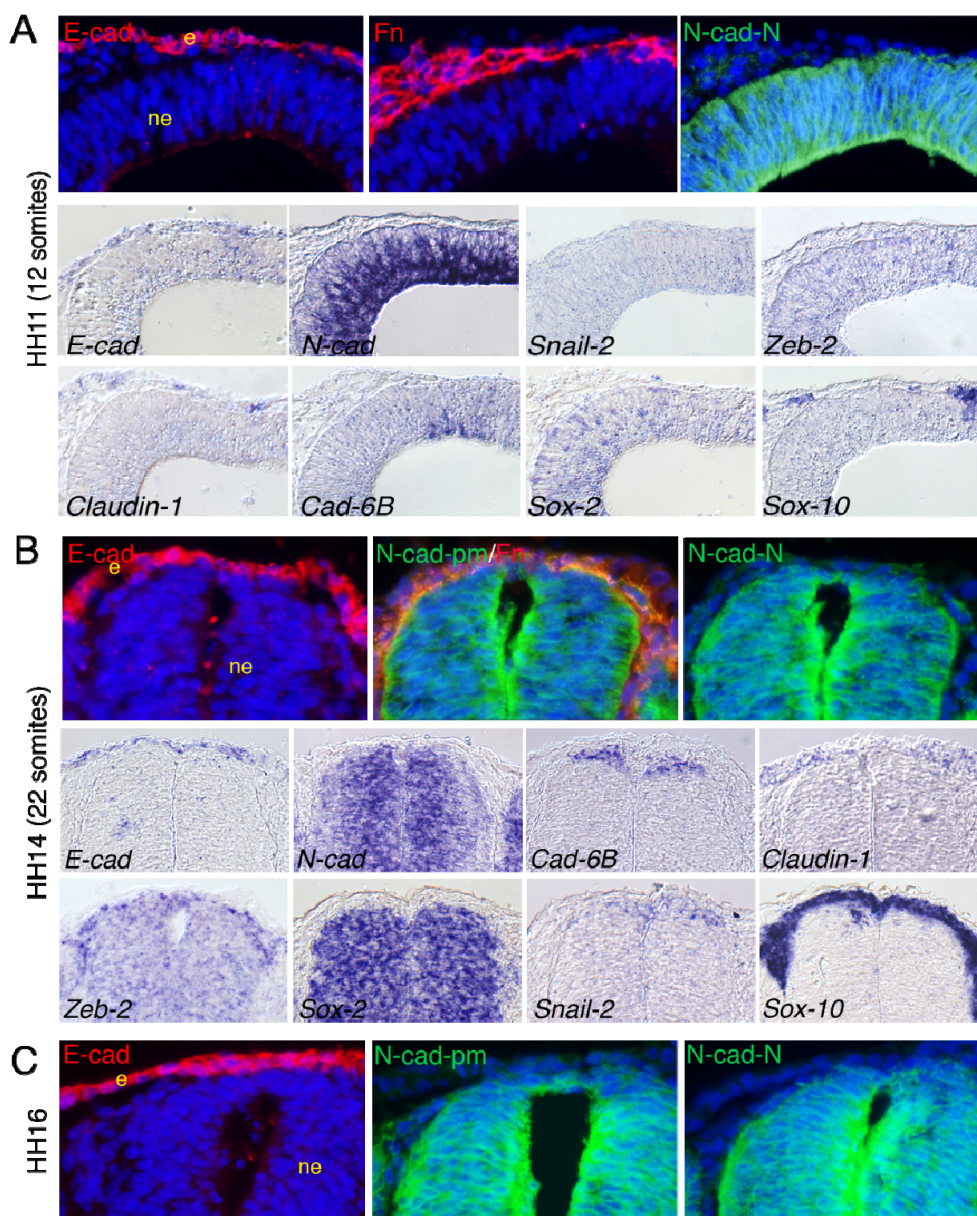
Immunohistochimie sur coupes réalisées selon l'axe caudo-rostral (A-D) au niveau du tronc postérieur d'embryons au stade HH14 (22 somites) montrant l'expression au niveau protéique de la E-cadhérine (E-cad), N-cadhérine (N-cad-pm : épitope proche de la membrane cytoplasmique ; N-cad-N : épitope au niveau N-terminal), fibronectine (Fn). Les noyaux sont marqués au DAPI. *e* : ectoderme de surface ; *nb* : bourgeon neural ; *ne* : neuroépithélium ; *pnc* : précurseurs des cellules de la crête neurale. Hybridation in situ sur coupes selon l'axe caudo-rostral d'embryons d'oiseau au stade HH14 (22 somites) (A-D) montrant l'expression des transcrits de la E-cadhérine (E-cad), N-cadhérine (N-cad), cadhérine-6B (Cad-6B), Sox-2, Snail-2.

### C. Profils d'expression des cadhérines après délamination des cellules de la Crête

Les profils d'expression des cadhérines confirment cette ségrégation tissulaire et cellulaire mise en place dès la spécification des cellules de la Crête. En effet, alors que dans la région céphalique, la E-cadhérine reste encore exprimée par les cellules du tube neural et par les CCN en migration lors de la fin de la délamination (Fig. 30B), l'expression de cette dernière molécule d'adhérence disparaît totalement du tube neural après émigration des CCN observée par l'absence d'expression de Snail-2 et Sox-10 (Fig. 34). L'expression de la cadhérine-6B disparaît également progressivement du toit du tube neural suggérant un appauvrissement de la population des CCN (Fig. 30B et Fig.34A) jusqu'à disparition complète d'expression marquant ainsi la délamination de la totalité du contingent de CCN. De façon complémentaire, la N-cadhérine est exprimée quant à elle, tant au niveau protéique qu'au niveau des transcrits, par l'ensemble des cellules du tube neural et sur l'ensemble de l'axe antéro-postérieur de l'embryon après la fin de la délamination des CCN (Fig. 34). De plus, il ne s'agirait pas d'une transition cadhérine-6B/-N à la surface des cellules de la région dorsale du tube neural mais véritablement de l'expulsion complète de la population des CCN suivi d'un mécanisme de cicatrisation du tissu neural latéral orchestré par la N-cadhérine (Fig. 30B). Encore une fois, le profil d'expression de Sox-2 accompagne celui de la N-cadhérine : Sox-2 est exprimé fortement par l'ensemble des cellules du tube neural (Fig. 30B et Fig. 34). Une expression basale de ZEB-2 est encore observée dans l'ensemble du tube neural suggérant une répression continue de la E-cadhérine et aussi le contrôle d'autres cibles afin de verrouiller le programme de développement du tissu neural canonique (Fig. 30B et Fig. 34).

L'ensemble de cette étude montre ainsi qu'un répertoire de cadhérines spécifiques ségrège la population des cellules de la crête des autres tissus avoisinants : les cellules de l'ectoderme de surface exprimant la E-cadhérine, les cellules de la Crête exprimant la cadhérine-6B et les cellules neurales exprimant quant à elles la N-cadhérine. Nos résultats montrent ainsi que la seule transition de cadhérines connue par les CCN dans une région très longue de l'embryon d'oiseau est la transition progressive cadhérine-E/-6B et suggèrent surtout que cette ségrégation cellulaire est le prérequis indispensable et nécessaire à la transition épithélium-mésenchyme des CCN orchestré par les acteurs majeurs que sont Snail-2 et ZEB-2. Cependant, dans la région postérieure de l'embryon, le programme de délamination semble plus complexe. En effet, dans cette région où le tube neural se forme par neurulation secondaire, les CCN expriment la cadhérine-6B et la N-cadhérine.

## Cessation of NC emigration



**Figure 34 :** Profil d'expression des cadhérine -E, -N et -6B et de leurs régulateurs transcriptionnels après la délamination des Cellules de la Crête

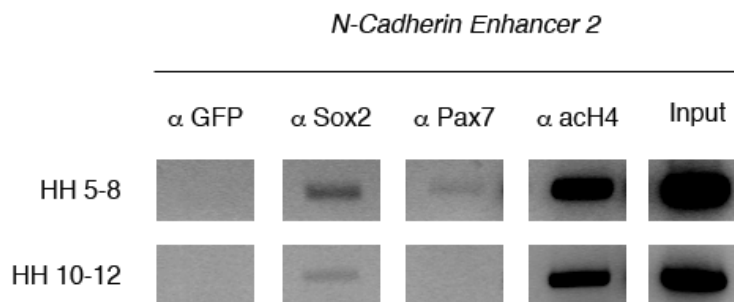
ImmunoHistochimie sur coupes réalisées au niveau du mésencéphale d'embryons d'oiseau au stade HH11 (12 somites) (A), au niveau du tronc antérieur au stade HH14 (22 somites) et au niveau du tronc moyen au stade HH16 (30 somites) montrant l'expression au niveau protéique de la E-cadhérine (E-cad), N-cadhérine (N-cad-pm : épitope proche de la membrane cytoplasmique ; N-cad-N : épitope au niveau N-terminal), fibronectine (Fn). Les noyaux nucléaires sont marqués au DAPI. *e* : ectoderme de surface ; *ne* : neuroépithélium. Hybridation in situ sur coupes des régions équivalentes au stade HH11 (12 somites) (A), au stade HH14 (22 somites) et au stade HH16 (30 somites) montrant l'expression des transcrits de la E-cadhérine (E-cad), N-cadhérine (N-cad), cadhérine-6B (Cad-6B), Claudin-1, ZEB-2, Sox-2, Snail-2 et Sox-10.



## ***II. Sox-2 induit l'expression de la N-cadhérine à la surface des cellules du tube neural en se fixant directement sur son enhancer N2***

Il apparaît ainsi que lors de la délamination des CCN, l'expression du facteur de transcription Sox-2 est restreinte uniquement aux régions latérales du tube neural où l'on retrouve une expression de N-cadhérine. Dans la région présomptive des CCN, l'absence d'expression de Sox-2 expliquerait celle de la N-cadhérine (Fig. 30 – 32). Des travaux antérieurs ont mis en évidence que le facteur nucléaire Sox-2 induit l'expression de la N-cadhérine dans les cellules du neurectoderme d'embryon d'oiseau (Matsumata et al., 2005). Afin de confirmer la fixation directe de Sox-2 sur le promoteur du gène codant pour la N-cadhérine et observer d'éventuelles variations de ces interactions moléculaires au cours du développement embryonnaire, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) d'embryons d'oiseau prélevés à des stades précoces du développement (HH 5-8) lors de la spécification des régions-frontières plaque neurale/ectoderme de surface et à des stades plus tardifs (HH 10-12) lors de délamination des cellules de la Crête (Fig. 35). Nos résultats ont montré un profil d'expression de Sox-2 très dynamique au cours du développement embryonnaire, ce facteur de transcription est exprimé par l'ensemble des cellules de la plaque neurale comprenant également les cellules de la région-frontière avec l'ectoderme non-neural sans pour autant observer d'expression de N-cadhérine par ces cellules (Fig. 27A – 29A). Lors de la délamination des CCN, Sox-2 n'est plus exprimé par les précurseurs de CCN et la N-cadhérine non plus (Fig. 30A ; Fig. 31 et 32). Ces résultats suggèrent ainsi que lors de la spécification des CCN, l'absence d'expression de la N-cadhérine dans la région-frontière n'est pas liée à celle de Sox-2 contrairement à ce qui est observé lors de la délamination de ces cellules. Nos résultats de ChIP confirment ces profils d'expression, Sox-2 se fixe à l'*enhancer* N2 du gène codant pour la N-cadhérine dès les stades précoces du développement confirmant ainsi un lien de cause à effet entre expression du facteur de transcription et expression de cette molécule d'adhérence (Fig. 35). De manière très intéressante, un autre facteur de transcription se fixe à l'*enhancer* N2 de la N-cadhérine lors de la formation des régions-frontières entre plaque neurale et ectoderme de surface, Pax-7. En effet, ce facteur de transcription est requis pour la spécification très précoce des CCN lors du développement d'embryon d'oiseau indépendamment des signaux émis par le mésoderme ou même la région-frontière ectoderme/plaque neurale car Pax-7 est exprimé durant la gastrulation bien avant la mise en place d'une plaque neurale (Basch et al., 2006;

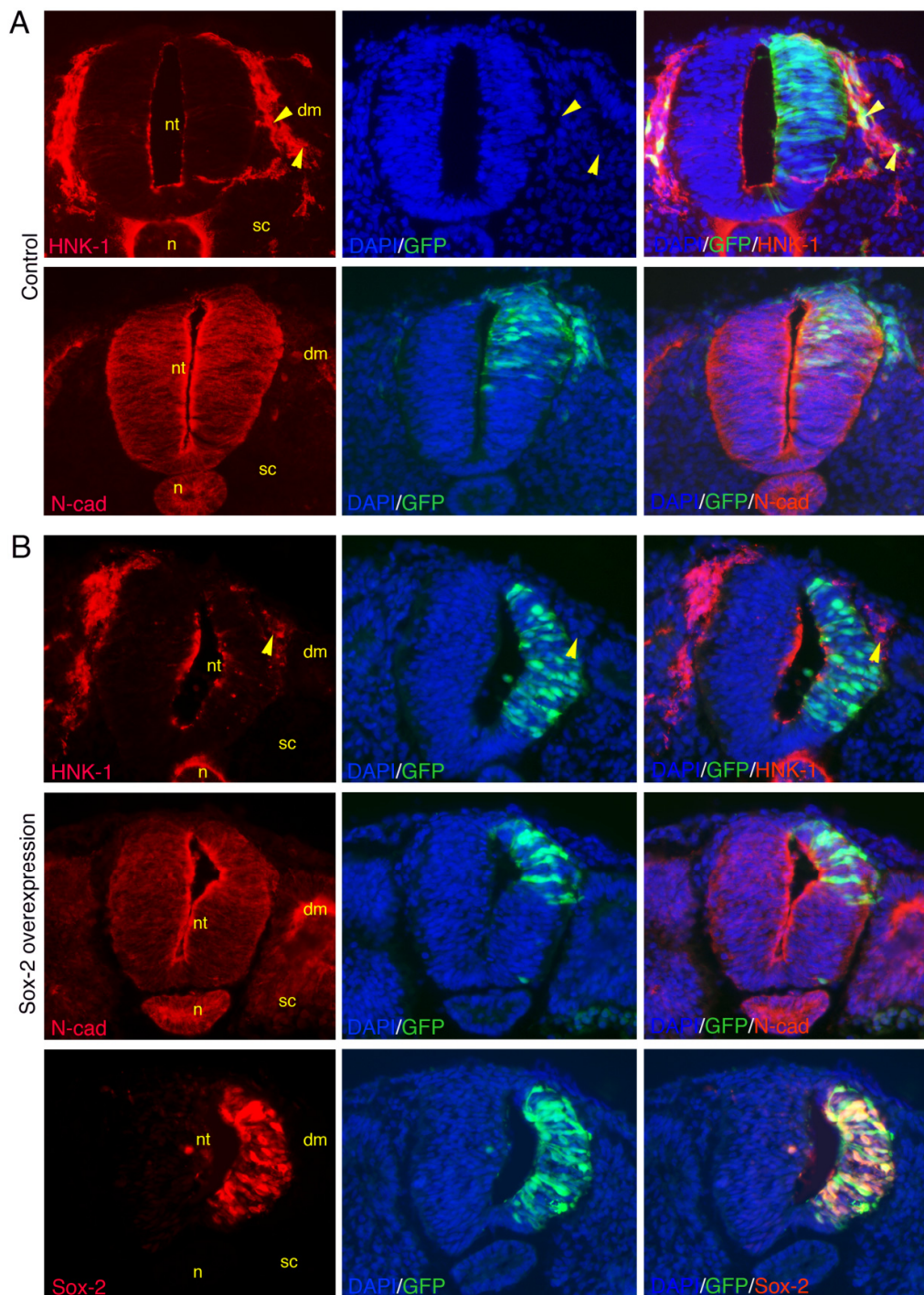
Kawakami et al., 1997). Cette fixation de Pax-7 pourrait ainsi créer un encombrement stérique empêchant la fixation de Sox-2 sur l'*enhancer* N2 de la N-cadhérine conduisant de *facto* à sa non-expression. Cependant, l'analyse par ChIP ne nous renseigne pas sur la fonction inductrice ou répressive de ces facteurs de transcription, ces résultats nous indiquent uniquement que leur fixation est possible sur l'*enhancer* N2 de la N-cadhérine.



**Figure 35** : Analyse par ChIP de la fixation des facteurs de transcription Sox-2 et Pax-7 sur l'*enhancer* N2 du gène codant pour la N-cadhérine d'oiseau

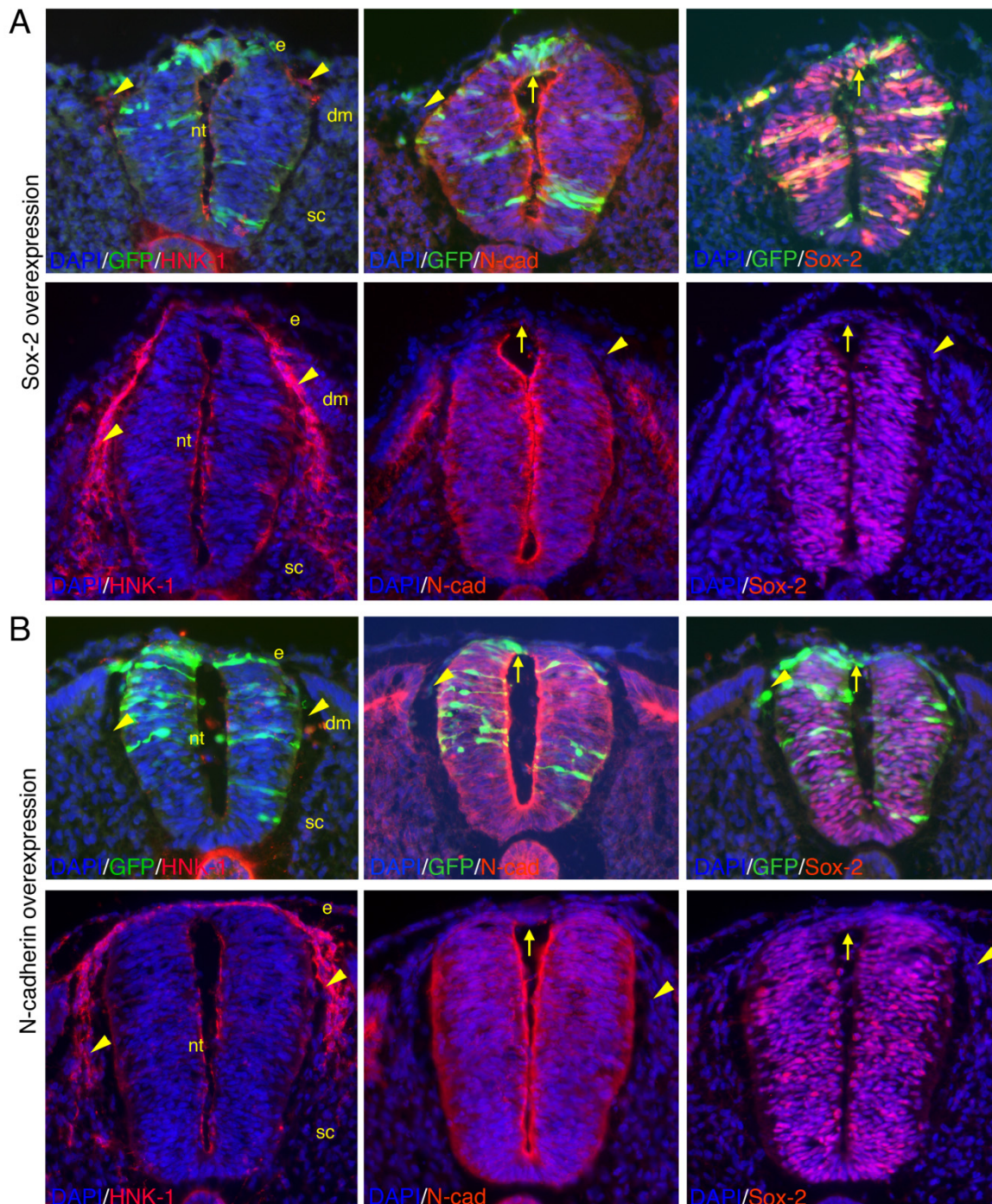
La chromatine d'embryons d'oiseau aux stades HH5-8 et HH10-12 a été immunoprécipitée avec les anticorps anti-Sox-2, anti-Pax-7, anti-Histone H4 acétylé (acH4) (contrôle positif) et anti-GFP (contrôle négatif). Les produits des ChiP sont ensuite analysés par PCR. Les deux facteurs de transcription Sox-2 et Pax-7 se fixent sur l'*enhancer* N2 du gène codant pour la N-cadhérine lors des stades précoces du développement embryonnaire d'oiseau alors que plus tardivement seul Sox-2 s'est fixé. Une PCR avec de la chromatine non immunoprécipitée (Input) a également été réalisée comme contrôle positif. (n=3)

Afin de démontrer que l'absence d'expression de la N-cadhérine à la surface des précurseurs de CCN est liée à une nécessaire répression de celle de Sox-2, nous avons réalisé des expériences de transgénèse transitoire par électroporation *in ovo* dans le but de faire exprimer Sox-2 par les précurseurs de CCN de la région troncale d'embryons d'oiseau au stade HH 10-12 (Fig. 36 et 37). L'expression ectopique de Sox-2 conduit effectivement à une expression de N-cadhérine par les cellules de la Crête (Fig. 36B et 37A) (Matsumata et al., 2005). De plus, cette induction de N-cadhérine à la surface des CCN réprime la transition épithélium-mésenchyme de ces cellules du côté du tube neural où Sox-2 est surexprimé (Fig. 36B). La surexpression de la N-cadhérine par les précurseurs des CCN conduit également à réprimer leur TEM confirmant ainsi la nécessaire absence d'expression de cette molécule d'adhérence pour la délamination de ces cellules (Fig. 37B) et non une régulation post-traductionnelle par clivage protéolytique comme l'ont observée Shoval et collaborateurs (Shoval et al., 2007).



**Figure 36** : *L'expression ectopique de Sox-2 réprime la délamination des Cellules de la Crête en induisant l'expression de la N-cadhérine*

Les plasmides comportant la séquence codante pour la GFP (contrôle) (n=10) (A) ou Sox-2 d'oiseau (n=12) (B) ont été électroporés dans le tube neural du tronc antérieur d'embryons d'oiseau au stade HH10-11 (10 à 15 somites). Ces embryons sont laissés à développer 20 à 24h puis traités afin d'effectuer des immunohistochimies sur coupes cryostat. Les anticorps anti-HNK-1, anti-Ncad et anti-Sox-2 ont été utilisés et les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI. Sox-2 induit l'expression de la N-cadhérine par les CCN réprimant ainsi leur délamination (B). *dm* : dermomyotome ; *nt* : tube neural ; *n* : notochorde ; *sc* : sclérotome.



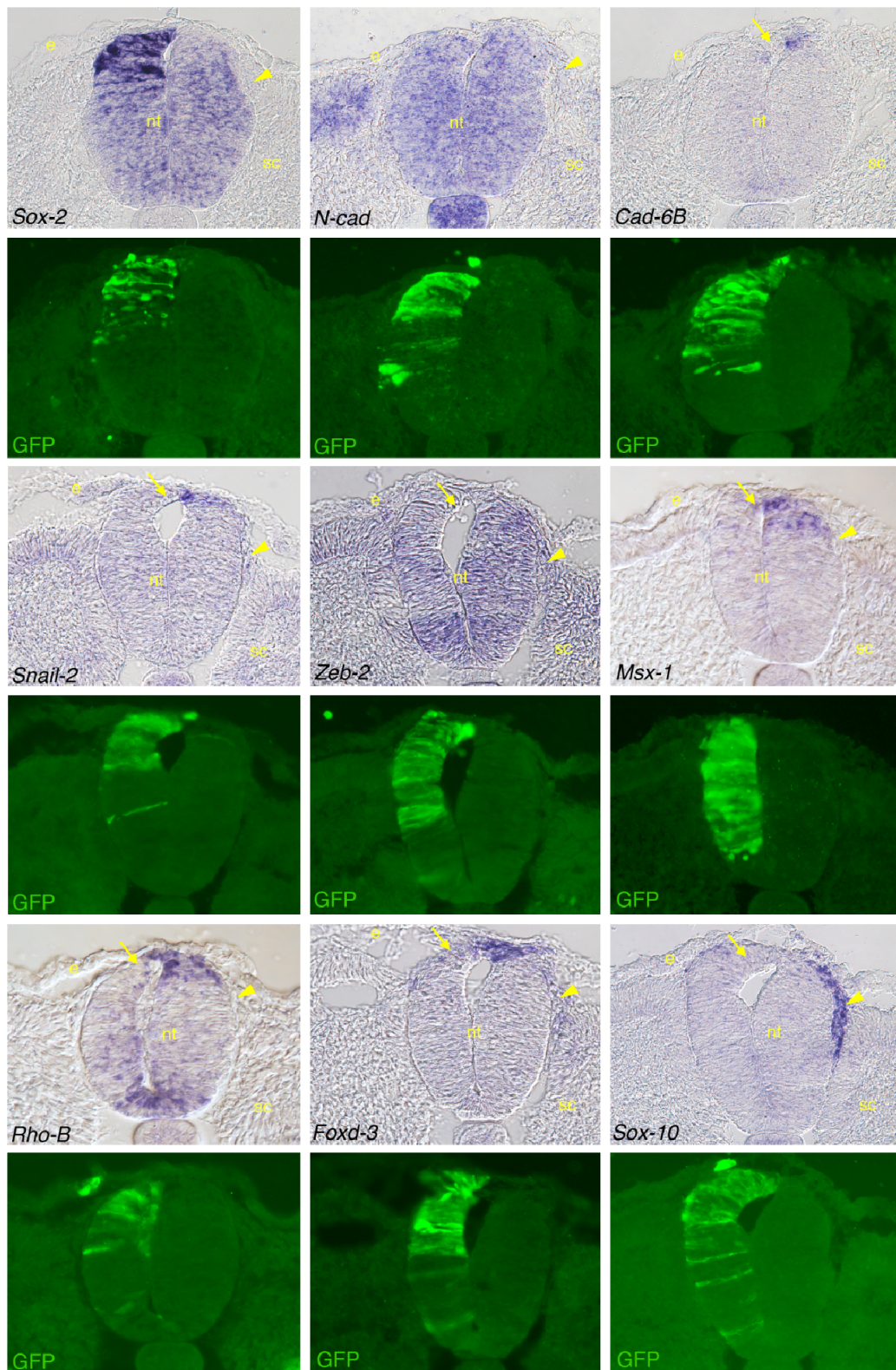
**Figure 37 :** *L'expression ectopique de la N-cadhérine par les précurseurs des CCN conduit aux mêmes conséquences que l'expression ectopique de Sox-2*

Les plasmides comportant les séquences codantes pour Sox-2 (A) (n=3) et la N-cadhérine (B) (n=4) ont été électroporés bilatéralement dans le tube neural du tronc antérieur d'embryons d'oiseau au stade HH10 (10-12 somites). Ces embryons sont ensuite laissés à développer 20-24h puis traités afin de réaliser des immunohistochimies dans le but d'analyser l'expression de HNK-1, Sox-2 et N-cad. L'expression ectopique de la N-cadhérine réprime la transition épithélium-mésenchyme des précurseurs des CCN (B) reproduisant ainsi les effets d'une expression ectopique de Sox-2 (A). L'absence d'expression de la N-cadhérine est donc nécessaire à la délamination des CCN et est liée à la nécessaire absence d'expression de Sox-2. *dm* :dermomyotome ; *e* :ectoderme ; *nt* :tube neural ; *sc* :sclérotome.

En effet, dans les régions du tube neural non électoporées ni pour Sox-2 ni pour la N-cadhérine des mêmes embryons d'oiseau, la délamination des CCN a lieu en absence d'expression de Sox-2 et surtout de la N-cadhérine à la surface des CCN (Fig. 37) Il apparaît ainsi que l'absence d'expression de la N-cadhérine à la surface les précurseurs des CCN est requise à la Transition Epithélium-Mésenchyme de ces cellules et surtout qu'elle est la conséquence d'une nécessaire répression de celle du facteur de transcription Sox-2 dans la région du toit du tube neural.

### ***III. L'expression de la N-cadhérine à la surface des cellules du tube neural induite par le facteur de transcription Sox-2 détermine un destin neural canonique***

Le facteur de transcription Sox-2 induit l'expression de la N-cadhérine à la surface des cellules du tube neural (Matsumata et al., 2005) (Fig. 36B et Fig.37A) et cette expression ectopique de N-cadhérine à la surface des précurseurs des CCN conduit à réprimer la délamination de ces cellules (Fig. 36B et Fig. 37). Afin de comprendre précisément les conséquences précises de l'expression ectopique de Sox-2 sur le destin des cellules de la Crête, nous avons observé l'expression des gènes de spécification : FoxD3 (Sasai et al., 2001) (Dottori et al., 2001; Kos et al., 2001; Stewart et al., 2006); Msx-1 (Satokata and Maas, 1994) (Catron et al., 1996; Muhr et al., 1997); Rho-B (Henderson et al., 2000; Liu and Jessell, 1998) et ceux impliqués dans la transition épithélium-mésenchyme de ces cellules : Snail-2 (Nieto et al., 1992) (del Barrio and Nieto, 2002; Nieto et al., 1994) et ZEB-2 (Vandewalle et al., 2009) après électroporation de Sox-2 (Fig. 38). Il apparaît ainsi que l'expression de Sox-2 réprime l'ensemble des gènes impliqués dans la biologie des cellules de la Crête (Fig. 38) confirmant les travaux antérieurs réalisés par Wakamatsu et collaborateurs (Wakamatsu et al., 2004). De plus, l'expression de Sox-2 induit non seulement l'expression de la N-cadhérine (Fig. 36B et Fig. 37A) (Matsumata et al., 2005) mais surtout réprime celle de la cadhérine-6B à la surface des précurseurs des CCN (Fig.38). L'ensemble de ces résultats confirment ainsi que la mise en place d'un répertoire de cadhérines spécifiques conduit à une ségrégation cellulaire et tissulaire indispensable à l'initiation de la transition épithélium-mésenchyme des CCN. Il apparaît ainsi que le facteur de transcription Sox-2 est l'acteur moléculaire majeur responsable de la détermination neurale canonique des cellules du tube neural (Wakamatsu et al., 2004). L'expression de la N-cadhérine est spécifique aux cellules neurales canoniques et les Cellules de la Crête expriment uniquement la cadhérine-6B (ou la E-cadhérine).

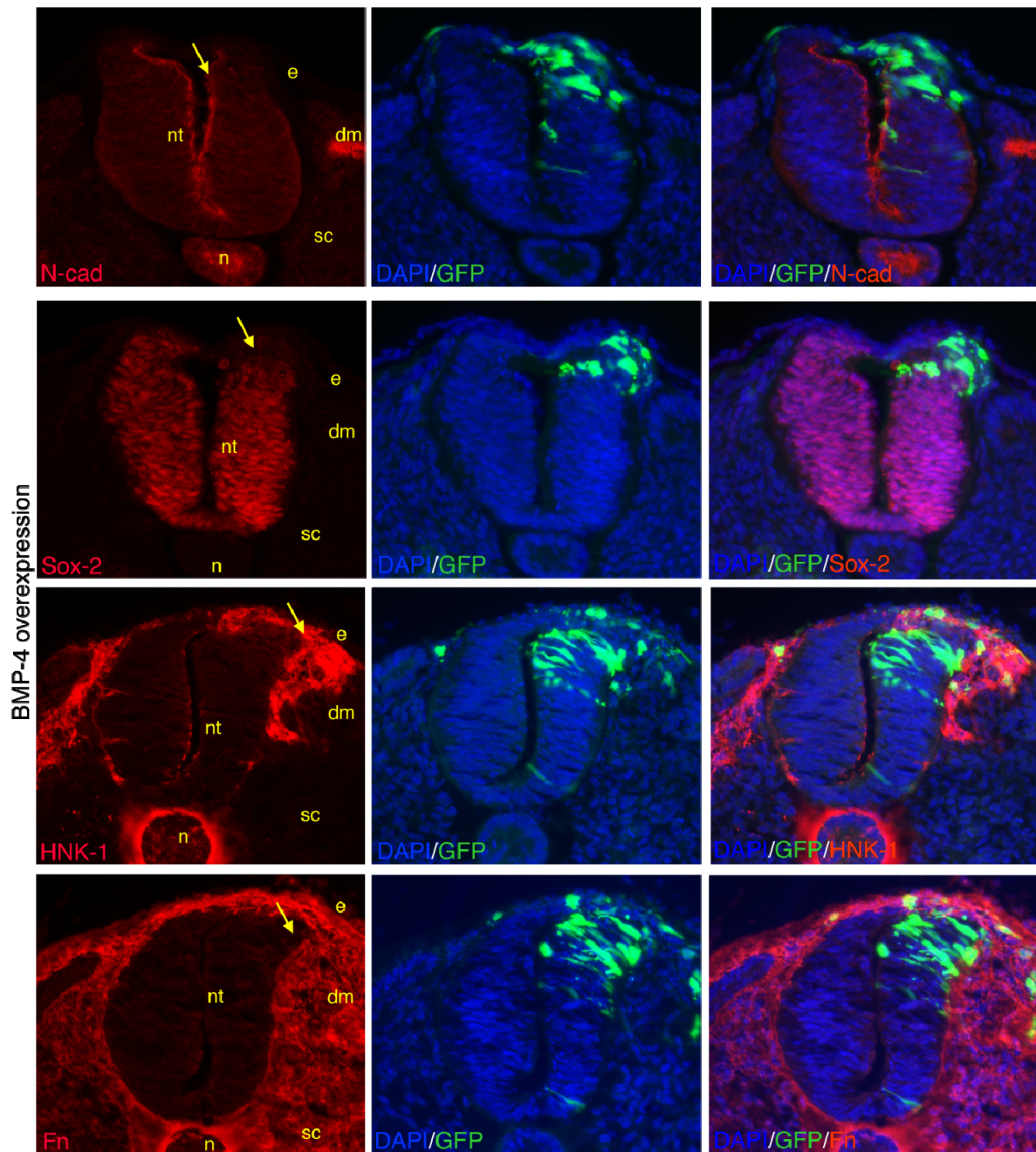


**Figure 38** : L'expression ectopique de Sox-2 réprime le destin « Cellules de la Crête » dans le toit du tube neural

Des hybridations in situ sur coupes d'embryons d'oiseau électroporés Sox-2 (n=12) ont été réalisées afin d'analyser les conséquences sur l'expression de gènes impliqués dans la spécification (FoxD3, Msx-1, Rho-B) et la délamination (Snail-2 et ZEB-2) des CCN. L'expression ectopique de Sox-2 réprime non seulement l'ensemble des gènes de ces gènes mais surtout la cadhérine-6B. *e* : ectoderme ; *nt* : tube neural ; *sc* : sclérotome.

#### ***IV. Le morphogène BMP-4 définit le territoire des cellules de la Crête en réprimant l'expression de Sox-2 et en induisant l'expression de la cadhérine-6B***

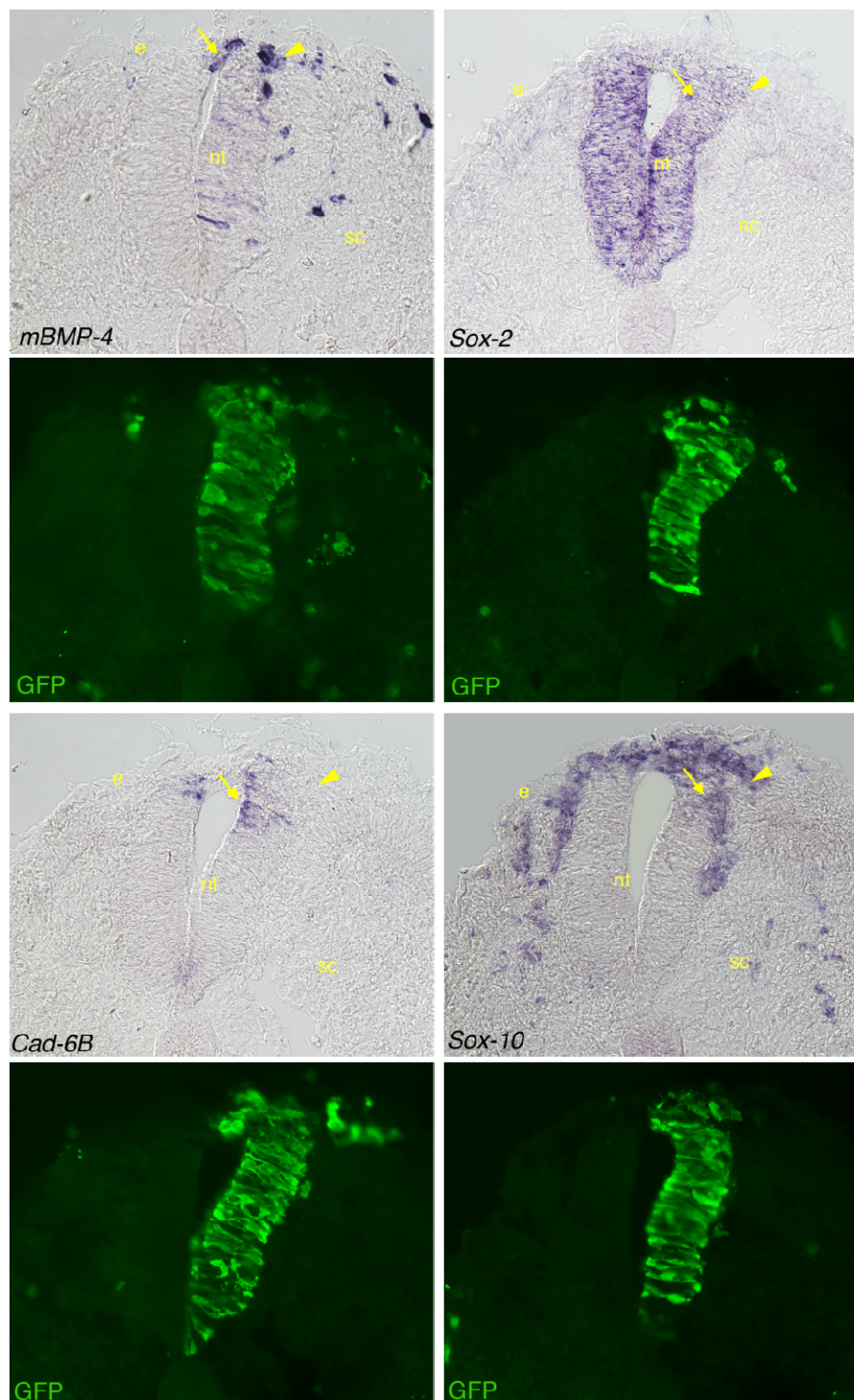
Appartenant à la superfamille des TGF $\beta$ , BMP-4 est décrit comme un acteur important non seulement de l'initiation de la transition épithélium-mésenchyme des cellules cancéreuses (Thiery, 2002; Thiery et al., 2009) mais également des cellules de la Crête neurale des oiseaux (Burstyn-Cohen et al., 2004; Duband, 2010; Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999; Shoval et al., 2007). En effet, ce morphogène est défini comme pro-métastatique en induisant entre autre l'expression des répresseurs de la E-cadhérine, Snail-2 et ZEB-2 (Duband, 2010; Thiery, 2002; Thiery et al., 2009). Au cours du développement d'oiseau, les BMPs ont été décrits comme nécessaires et suffisants à l'induction des cellules de la Crête (Liem et al., 1997; Liem et al., 1995; Selleck et al., 1998). De plus, BMP-4, exprimé par les cellules de l'ectoderme de surface qui recouvre les bourrelets neuraux puis par les futures CCN, induit l'expression de la cadhérine-6B (Liem et al., 1995). De manière très intéressante, des travaux antérieurs ont montré sur des cultures d'explants de tube neural que BMP-4 réprime l'expression de Sox-2 (Wakamatsu et al., 2004) et l'expression ectopique de Noggin, un inhibiteur de BMP-4, dans le toit du tube neural conduit à une expression ectopique forte de la N-cadhérine par ces cellules et entraîne ainsi *de facto* une suppression de la dissémination des CCN (Shoval et al., 2007). Toutefois, la fonction précise de ce morphogène n'est pas réellement bien connue lors de la spécification et la délamination des CCN. Nous avons ainsi réalisé des expériences d'expression ectopique de BMP-4 par électroporation dans le tube neural troncal d'embryons d'oiseau au stade HH10-12 afin de réévaluer la fonction réelle de ce morphogène dans la biologie des CCN (Fig. 39 – 41). Une surexpression de BMP-4 dans la région dorsale du tube neural conduit à un départ massif en délamination des CCN observé par une augmentation de cellules exprimant la molécule de surface HNK-1 (Fig. 39) ou le facteur de transcription Sox-10 (Fig. 40) comme l'avait déjà décrit le laboratoire de Chaya Kalcheim (Burstyn-Cohen et al., 2004; Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999) et la rupture de la lame basale ne se limitant pas uniquement à la région la plus dorsale du tube neural mais sur l'ensemble de la zone de surexpression (Fig. 39). Cependant, Il apparaît surtout que BMP-4 réprime l'expression de Sox-2 dans l'ensemble des cellules de la moitié dorsale du tube neural tant au niveau protéique (Fig. 39) qu'au niveau des messagers (Fig. 40). Cette répression de Sox-2 induite par BMP-4 s'accompagne également d'une diminution d'expression de la N-cadhérine à la surface de l'ensemble des cellules de la même région du tube neural (Fig. 39) confirmant encore l'induction de la N-cadhérine par Sox-2.



**Figure 39** : *BMP4* réprime l'expression de *Sox-2* conduisant ainsi à une diminution d'expression de la *N-cadhérine* ce qui entraîne ainsi une délamination massive des cellules de la moitié dorsale du tube neural

Le plasmide comportant la séquence codante complète de *BMP-4* est électroporé dans le tube neural du tronc antérieur d'embryons d'oiseau au stade HH10 (10-12 somites) (n=10). Ces embryons sont ensuite laissés à développer 20-24h puis traités par immunohistochimie dans le but d'analyser l'expression de *HNK-1*, *Sox-2*, *N-cad* et la *FN*. L'expression ectopique de *BMP4* réprime non seulement l'expression de *Sox-2* conduisant à une diminution d'expression de *N-cadhérine* mais entraîne également une délamination massive de *CCN*. *dm* :dermomyotome ; *e* :ectoderme ; *n* :notochorde ; *nt* :tube neural ; *sc* :sclérotome.



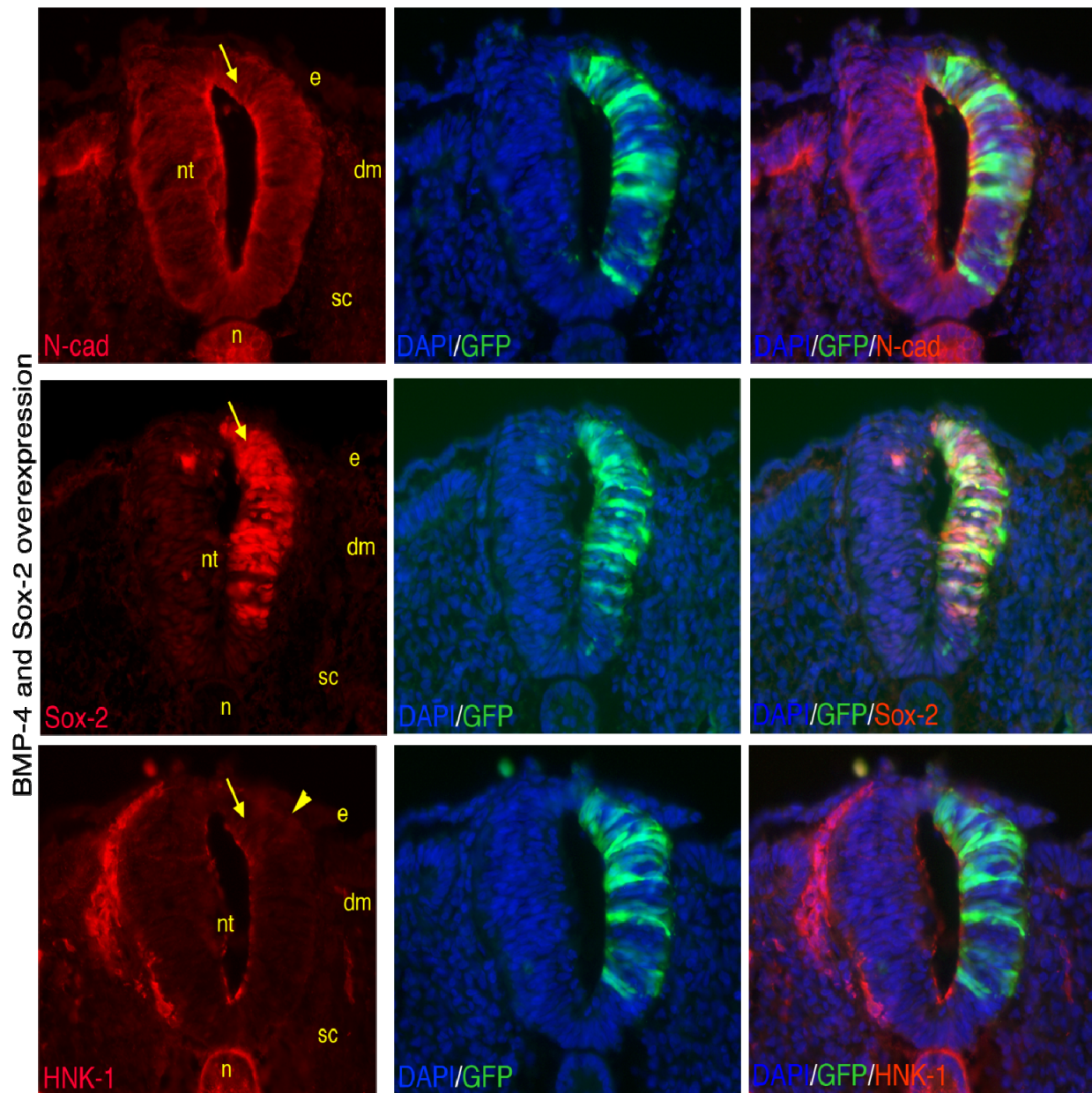


**Figure 40** : *BMP4* induit l'expression de la cadhérine-6B par les cellules de la moitié dorsale du tube neural

Des hybridations in situ sur coupes d'embryons d'oiseau électroporés *BMP-4* (n=10) ont été réalisées afin d'analyser les conséquences sur l'expression de *Sox-2*, la cadhérine-6B et de *Sox-10* exprimé lors de la migration des CCN. L'expression ectopique de *BMP-4* réprime non seulement l'expression de *Sox-2* mais surtout induit celle de la cadhérine-6B. De plus, cette expression ectopique de *BMP-4* induit une expression ectopique de *Sox-10* par l'ensemble des cellules de la région dorsale du tube neural conduisant ainsi à une délamination massive de CCN. *e* : ectoderme ; *nt* : tube neural ; *sc* : sclérotome.

De plus, l'expression ectopique de BMP-4 induit celle de la cadhérine-6B par les cellules neurales de la région dorso-latérale du tube neural (Fig. 40). L'ensemble de ces résultats montrent ainsi que le morphogène BMP-4 est nécessaire et requis à la mise en place d'un destin cellulaire Crête non seulement en induisant un grand nombre de facteurs de transcription pro-Crête tels que Msx-1 (Catron et al., 1996; Muhr et al., 1997; Satokata and Maas, 1994), Rho-B (Henderson et al., 2000; Liu and Jessell, 1998) ou bien encore impliqués dans la transition épithélium-mésenchyme de ces cellules comme Snail-2 ou ZEB-2 (Duband, 2010; Peinado et al., 2007) mais surtout en réprimant le destin cellulaire neural canonique. En effet, BMP-4 serait le chef d'orchestre ou le contremaître de la ségrégation cellulaire et tissulaire observée dans la région du toit du tube neural. Ce morphogène irait dans un premier temps réprimer l'expression de Sox-2 entraînant ainsi une absence d'expression de la N-cadhérine à la surface des précurseurs de CCN puis induire celle de la cadhérine-6B mettant ainsi en place un territoire propice à la transition épithélium-mésenchyme de ces cellules induite par les facteurs de transcription Snail-2 (Taneyhill et al., 2007) et ZEB-2 (Van de Putte et al., 2007).

Afin de vérifier une éventuelle réciprocité dans la prise de décision du destin cellulaire entre destin neural canonique et destin Crête, nous avons fait co-exprimer par les cellules du tube neural à la fois le morphogène BMP-4 et le facteur de transcription Sox-2 (Fig. 41). Cette co-expression conduit à une expression ectopique de N-cadhérine à la surface des précurseurs de CCN et donc à une inhibition de délamination de ces cellules (Fig. 41). Il apparaît ainsi que le destin neural canonique l'emporte sur le destin Crête dans ces conditions expérimentales mais l'interprétation définitive de cette expérience semble beaucoup plus complexe et nécessite d'autres investigations.

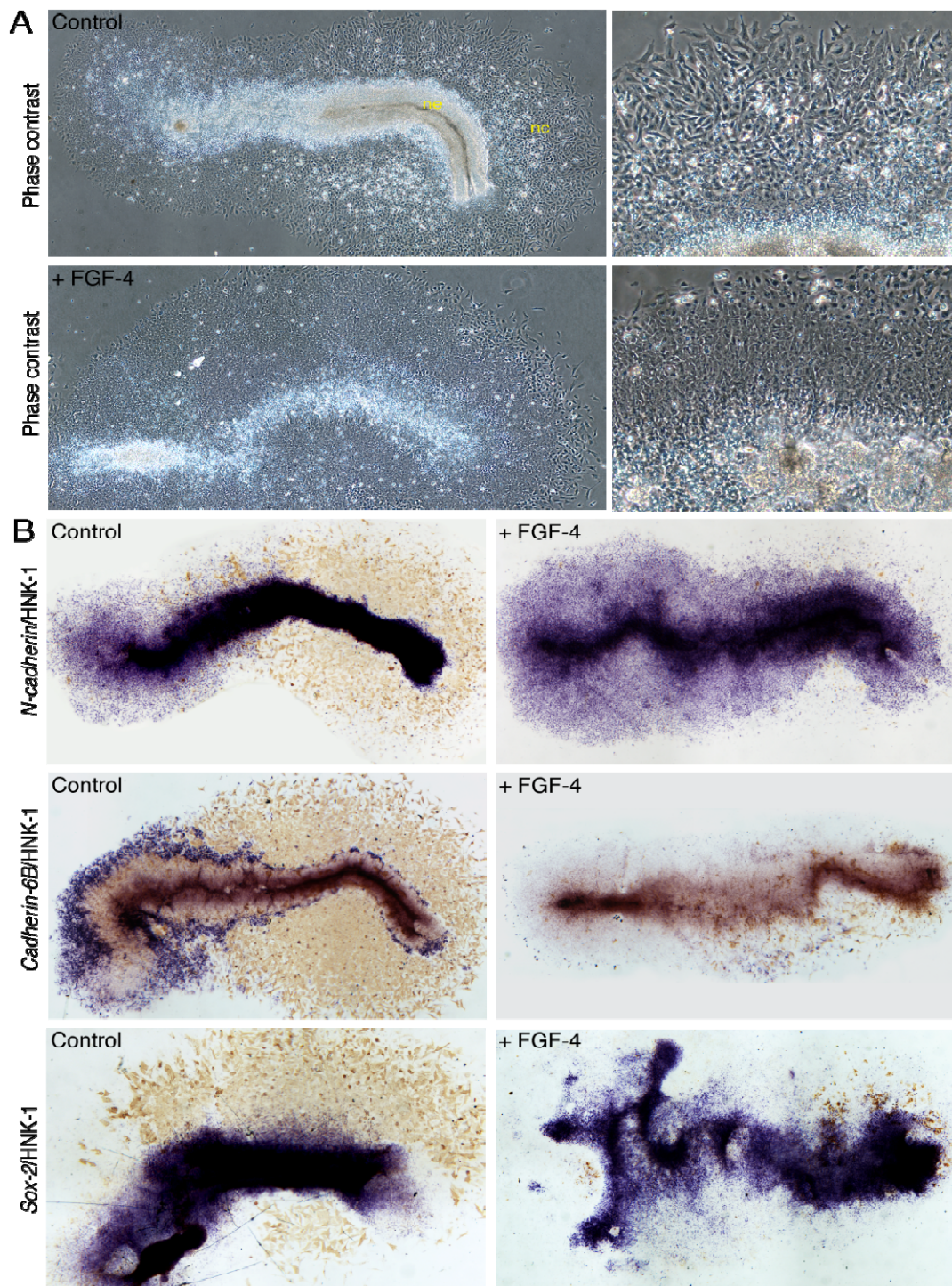


**Figure 41** : *La co-expression de BMP-4 et de Sox-2 conduit à une inhibition de la délamination des CCN montrant ainsi que le déterminisme neural l'emporte sur le déterminisme Crête*

Les plasmides comportant les séquences complètes codantes pour BMP-4 et Sox-2 ont été électroporés dans le tube neural du tronc antérieur d'embryons d'oiseau au stade HH10 (10-12 somites) (n=8). Ces embryons sont ensuite laissés à développer 20-24h puis traités afin de réaliser des immunohistochimie dans le but d'analyser l'expression de HNK-1, Sox-2 et N-cad. Cette co-expression de BMP-4 et de Sox-2 conduit à une induction de N-cadhérine à la surface des précurseurs de CCN conduisant ainsi à une inhibition de la transition épithélium-mésenchyme de ces cellules. *dm* : *dermomyotome* ; *e* : *ectoderme* ; *n* : *notochorde* ; *nt* : *tube neural* ; *sc* : *sclérotome*.

**V. Les FGF définissent le territoire neural en induisant l'expression de Sox-2 et en réprimant l'expression de la cadhérine-6B**

Chez l'amphibien, les FGF semblent nécessaires à l'induction des cellules de la Crête. En effet, une induction des CCN est observée après activation de la voie de signalisation FGF dans un ectoderme neuralisé (LaBonne and Bronner-Fraser, 1998; Mayor et al., 1995; Villanueva et al., 2002). De plus, les travaux d'Anne-Hélène Monsoro-Burq ont mis en évidence, par une approche génétique, un rôle important d'un signal FGF-8 émis par le mésoderme paraxial dans l'induction des cellules (Monsoro-Burq et al., 2003). Cependant, chez l'oiseau, Patricia L. Martínez-Morales et collaborateurs ont décrit un rôle original des FGF dans la spécification et la délamination des CCN (Martinez-Morales et al., 2011). FGF-8, exprimé fortement dans la région postérieure de l'embryon d'oiseau, réprime le programme de spécification entraînant *de facto* une inhibition de la transition épithélium-mésenchyme de ces cellules du toit du tube neural (Martinez-Morales et al., 2011). Afin de comprendre l'effet des FGF sur le déterminisme cellulaire lié à la mise en place d'une ségrégation tissulaire orchestrée par les cadhérines, nous avons réalisé des expériences de surexpression de FGF-4 sur des explants de tube neural d'embryons d'oiseau (Fig. 42). Il apparaît ainsi qu'une surexpression de FGF-4 confère des propriétés exacerbées d'étalement aux cellules du tube neural suggérant des modifications dans l'adhérence cellulaire (Fig. 42A). En effet, les tubes neuraux non traités gardent toujours leur aspect tridimensionnel compact de tube avec conservation apparente de l'axe antéro-postérieur (Fig. 42A). De plus, la morphologie très étoilée des CCN en culture disparaît lors d'une surexpression de FGF-4 (Fig. 42A). Nos résultats montrent que FGF-4 induit l'expression de Sox-2 et celle de la N-cadhérine par l'ensemble des cellules du tube neural expliquant ainsi leur étalement complet (Fig. 42B) mais, plus important, la surexpression de FGF-4 conduit à une répression de la cadhérine-6B, entraînant une inhibition de la spécification des CCN et de leur délamination (Fig. 42B). Ces résultats confirment non seulement les travaux de Martinez-Morales et al. mais apportent surtout un regard nouveau sur le rôle des FGF sur la biologie des cellules de la Crête. Lors du développement, les FGF sont les acteurs majeurs contrôlant le destin neural canonique des cellules du tube neural en induisant l'expression du facteur Sox-2 conduisant ainsi à celle de la N-cadhérine à la surface des cellules neurales canoniques (Koshida et al., 2002; Storey et al., 1998).

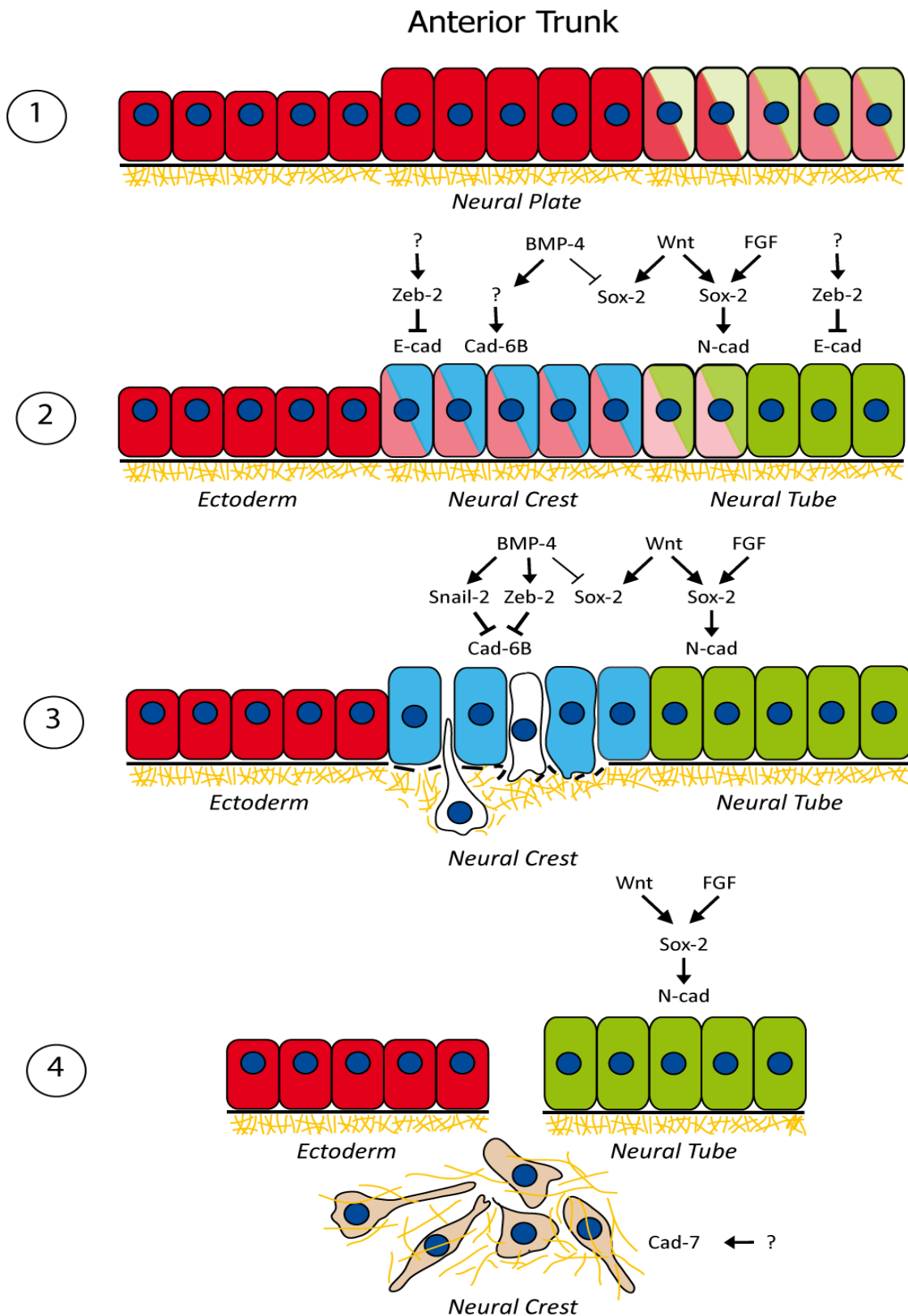


**Figure 42** : *L'expression ectopique de FGF-4 conduit à une répression du destin « Crête » en réprimant l'expression de la cadhérine-6B et induisant celle de Sox-2*

Des hybridations in situ d'explants de tube neural d'embryons d'oiseau au stade HH12-13 (15-20 somites) mis en culture en présence ou non de FGF-4 soluble sont réalisées afin d'analyser les conséquences d'une sur-activation de la voie FGF sur l'expression de la N-cadhérine, Sox-2, la cadhérine-6B ainsi que HNK-1. FGF-4 induit d'une part l'expression de la N-cadhérine et de Sox-2 par l'ensemble des cellules du tube neural incluant les CCN et réprime d'autre part l'expression de la cadhérine-6B et HNK-1. Les FGF jouent ainsi sur la détermination neurale canonique. *ne* : neuroépithélium ; *nc* : cellules de la crête neurale

## VI. Conclusion

Afin de comprendre précisément la cinétique et les conséquences des transitions entre différentes cadhérines sur la dissémination des cellules de la Crête, nous avons réalisé une analyse spatio-temporelle approfondie des profils d'expression des cadhérines -E, -N et -6B au cours de l'intégralité du processus de formation des CCN, depuis la phase de spécification des progéniteurs de ces cellules jusqu'à leur migration. En parallèle, nous avons également étudié le profil d'expression de leurs régulateurs transcriptionnels Snail-2, ZEB-2 et Sox-2 ainsi que celui de marqueurs des lignages cellulaires présents (ectoderme, tube neural et CCN). Nos résultats montrent ainsi qu'il se met en place un véritable répertoire de cadhérines spécifiques des différents tissus lors de la spécification des cellules de la Crête : les cellules de l'ectoderme expriment la E-cadhérine, les cellules de la crête expriment quant à elles la cadhérine-6B et les cellules neurales canoniques expriment la N-cadhérine. Contrairement au modèle communément admis, les cellules de la Crête des régions du tube neural se formant selon un mode primaire et intermédiaire (des régions céphaliques jusqu'à la région des futurs vertèbres lombo-sacrées) effectuent uniquement une transition progressive cadhérine-E/-6B et n'expriment jamais la N-cadhérine. Cette ségrégation cellulaire et tissulaire orchestrée par les cadhérines est le prérequis nécessaire à la spécification des cellules de la Crête et conduit à la transition épithélium-mésenchyme de ces cellules du toit du tube neural. De plus, cette ségrégation cellulaire est mise en place par un jeu subtil de morphogènes, d'une part les BMPs tels que BMP-4 vont déterminer le destin cellulaire Crête dans la région du toit du tube neural en induisant l'expression de la cadhérine-6B et réprimant celle de Sox-2 conduisant *de facto* à une absence d'expression de la N-cadhérine à la surface cellulaire mais également l'expression de nombreux gènes de spécification des CCN ; et d'autre part, les FGF tels que FGF-4 vont déterminer le destin cellulaire neural dans les régions latéro-ventrales du tube neural en induisant l'expression du facteur de transcription Sox-2 conduisant ainsi à celle de la N-cadhérine et réprimant celle de la cadhérine-6B. Il apparaît ainsi que les cellules de la Crête forment une population à part du tube neural ayant des propriétés moléculaires et d'adhérence très différentes du reste des cellules neurales canoniques. L'ensemble de ces arguments nous emmènent à reconsidérer la terminologie neurale de ces cellules, il s'agirait plutôt de Cellules de la Crête Ectodermique comme le suggéraient Thomas M. Jessel et James A. Weston !



**Figure 43** : Schéma représentant la cinétique des transitions de cadhérines et les régulateurs moléculaires impliqués lors de la spécification et la délamination des cellules de la Crête du tronc antérieur d'embryons d'oiseau

### Partie 3

#### *Une neurulation antérieure en 2D,*

#### *Une neurulation postérieure en 3D,*

#### *Une neurulation intermédiaire en 4D !*

Le tube neural, organe précurseur de l'encéphale et de la moelle épinière des vertébrés, se forme par un ensemble de mouvements morphogénétiques complexes résumés par le terme Neurulation. Il a été observé deux modes majeurs de neurulation lors du développement des amniotes, la neurulation primaire et la neurulation secondaire, qui ont lieu respectivement dans la région antérieure et postérieure de l'embryon (Colas and Schoenwolf, 2001; Copp et al., 2003; Le Douarin et al., 1998). La neurulation primaire conduit à la formation d'un tube neural suite à l'enroulement d'une plaque neurale préexistante (Colas and Schoenwolf, 2001; Copp et al., 2003; Le Douarin et al., 1998). De plus, les mouvements de la neurulation primaire entraînent la formation d'un neuropore antérieur et postérieur qui se situent respectivement ventralement au télencéphale (Puelles et al., 1987) et au niveau de la 27<sup>ème</sup> paire de somites (Catala et al., 1995) chez l'embryon d'oiseau. La 27<sup>ème</sup> paire de somites participe à l'élaboration de la dernière vertèbre thoracique et de la première vertèbre lombaire définissant ainsi la région de transition entre la moelle épinière troncale et lombo-sacrée. Le tube neural de la région caudale au neuropore postérieur se forme de manière totalement différente de la neurulation primaire, c'est la neurulation secondaire (Catala et al., 1995; Holmdahl, 1938; Pasteels, 1937; Schoenwolf, 1984). Ce second mode de neurulation implique la condensation de cellules mésenchymateuses conduisant à la formation d'une structure tubulaire appelé cordon médullaire. Ces cellules vont ensuite effectuer une transition mésenchyme-épithéliale pour former finalement le tube neural postérieur par un phénomène de cavitation (Catala et al., 1995; Griffith et al., 1992; Schoenwolf, 1979; Schoenwolf and Delongo, 1980). Les Anomalies de fermeture du Tube Neural (ATN ou *Neural Tube Defects* - NTD) sont une des malformations congénitales du nouveau-né les plus communément observées chez l'Homme car elles concernent environ 1 à 2/1000 naissances et sont les conséquences directes de défauts de formation du système nerveux central (Detrait et al., 2005; Greene and Copp, 2009). De nombreuses ATN chez l'Homme sont associées à des



défauts spécifiques de « cavitation » dans la région postérieure du tube neural (Donovan and Pedersen, 2005; Park et al., 1992; Saitsu and Shiota, 2008; Saitsu et al., 2004; Seller, 1990). Des cribles génétiques réalisés chez des fœtus atteints d'ATN ont permis de mettre en évidence un rôle important des molécules de la polarité planaire (PCP) telles que la protéine Vangl1 (Kibar et al., 2009; Kibar et al., 2007), Vangl2 (Doudney et al., 2005; Kibar et al., 2011; Lei et al., 2010) ou Prickle (Robinson et al., 2012) lors de la neurulation humaine. Malgré de nombreuses études génétiques réalisées chez le poisson téléostéen (Jessen et al., 2002) ou chez la souris (Copp et al., 1994; Greene and Copp, 2009; Robinson et al., 2012; Simons and Mlodzik, 2008; Ybot-Gonzalez et al., 2007) aucune connaissance de la fonction précise de ces molécules lors de la neurulation n'existe. En effet, l'idée communément admise réduit ces protéines de la polarité planaire simplement à la régulation de l'extension et de la convergence de l'ectoderme de surface ou des cellules de la couche externe de la quille neurale du poisson-zèbre. De plus, nous ne savons pas comment se fait la transition entre tube neural issu d'une neurulation primaire et secondaire. Comment se met en place un canal de l'épendyme continu selon l'axe antéro-postérieur, nécessaire à l'écoulement du liquide cérébro-spinal dont l'homéostasie de la pression joue directement sur le fonctionnement neurologique ? Nos résultats ont mis en évidence un nouveau mode de neurulation chez l'oiseau, **la neurulation intermédiaire, qui a lieu entre la 20<sup>ème</sup> et la 27<sup>ème</sup> paire de somites correspondant ainsi aux futures vertèbres thoraciques** et non à une région anatomique très restreinte de seulement 200 µm comme décrit par les études de Criley (Criley, 1969). La neurulation intermédiaire comporte certaines propriétés communes aux deux modes de neurulation classiques : **la présence de bourrelets neuraux dans la région dorsale du futur tube neural comme observés lors de la neurulation primaire et un phénomène de transition mésenchyme-épithéliale de cellules neurales mésenchymateuses décrit lors de la neurulation secondaire. Cependant, le neurocoele du tube neural issu de la neurulation intermédiaire ne se forme pas par cavitation mais par un mécanisme d'accrétion et d'épithélialisation de cellules neurales mésenchymateuses selon l'axe dorso-ventral.** De plus, les précurseurs des cellules du tube neural intermédiaire et secondaire, tous produits lors de la formation de la plaque neurale (Brown and Storey, 2000; Catala, 2002; Catala et al., 1995) (Catala et al., 1996) et localisés caudalement au Nœud de Hensen, effectuent tout d'abord une transition épithélium-mésenchymateuse puis migrent de manière dirigée vers la région postérieure de l'embryon. Cette migration dirigée de cellules neurales mésenchymateuses nécessite à la fois une ségrégation de ces cellules mésodermiques avoisinantes orchestrée par un répertoire spécifique de molécules d'adhérence, cadhérine-6B

et claudin-1 mais également une organisation très précise de la matrice extra-cellulaire. Nos résultats mettent ainsi en évidence un rôle nécessaire et requis de la molécule de la polarité planaire, Prickle, exprimée précocement par les précurseurs du tube neural de la région postérieure de l'embryon, dans le dépôt polarisé de fibrilles de fibronectine. **Nous avons ainsi non seulement observé et décrypté un mode original de formation du système nerveux central chez l'oiseau et par analogie chez l'Homme mais également définit précisément un des rôles et la fonction, lors de la neurulation, de la protéine de la polarité planaire, Prickle, dont les mutations génétiques conduisent à des Anomalies de Fermeture du Tube neural chez l'Homme.**

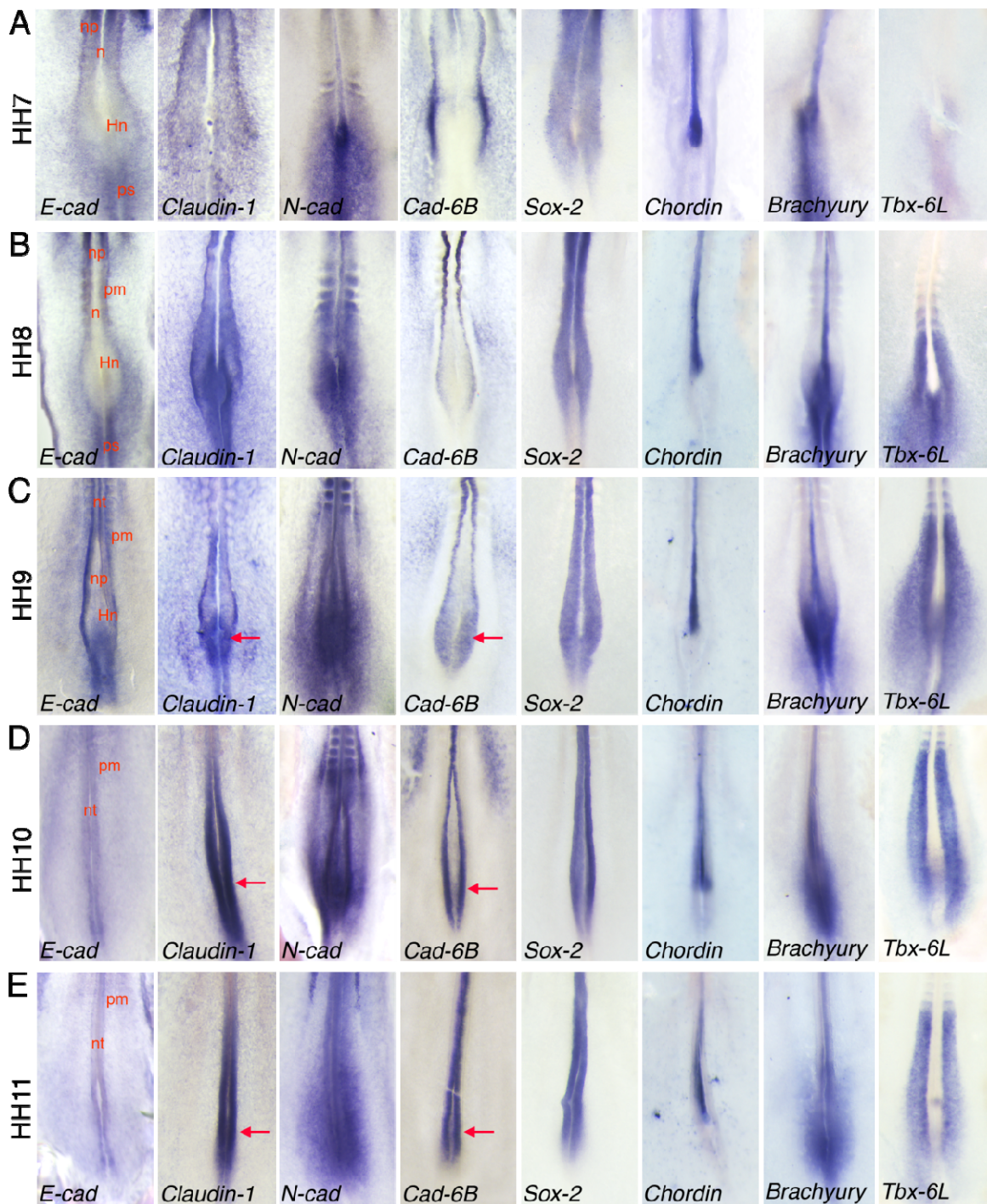
*I. La formation du système nerveux central de la région troncale et postérieure de l'embryon d'oiseau met en jeu une cinétique précise d'expression de gènes spécifiques*

La mise en place du système nerveux central se fait selon des modes bien différents selon l'axe antéro-postérieur de l'embryon d'oiseau suggérant ainsi un contrôle moléculaire bien distinct de chaque mécanisme morphogénétique (Colas and Schoenwolf, 2001). Alors que les mécanismes cellulaires et moléculaires ayant lieu lors de la neurulation primaire de vertébrés ont été très largement étudiés depuis de nombreuses décennies (Colas and Schoenwolf, 2001; Copp et al., 2003; Dady et al., 2012; Greene and Copp, 2009; Harrington et al., 2009; Le Douarin et al., 1998), ceux mis en jeu lors de la neurulation de la région postérieure de l'embryon sont très peu connus. Afin de comprendre et de définir quels sont les acteurs moléculaires impliqués lors de la formation du système nerveux central moyen et postérieur, nous avons réalisé une étude très précise de l'expression de molécules d'adhérence : cadhérine -E,-N et -6B et une molécule des jonctions serrées, claudin-1 (Furuse et al., 1998; Hatta et al., 1987; Nakagawa and Takeichi, 1995; Nakagawa and Takeichi, 1998; Thiery et al., 1984), de leurs régulateurs, pour la plupart impliqués dans les mécanismes de transition épithélium-mésenchyme (TEM): Snail-1/-2, ZEB-2, Twist-1 et Sox-2 (del Barrio and Nieto, 2002; Matsumata et al., 2005; Nieto et al., 1994; Peinado et al., 2007; Taneyhill et al., 2007; Vandewalle et al., 2009), de facteurs de transcription exprimés spécifiquement par les tissus embryonnaires : Sox-2 pour le tissu neural (Linker and Stern, 2004; Uchikawa et al., 2003; Uchikawa et al., 2011), Brachyury et Tbx-6L pour le mésoderme para-axial (Chapman et al., 1996; Takemoto et al., 2011; Wilkinson et al., 1990) et chordin pour le mésoderme axial (Sasai et al., 1994; Streit et al., 1998), de molécules de la matrice extra-cellulaire ainsi

que des régulateurs : Fibronectine (Duband and Thiery, 1982; Linder et al., 1978; Wartiovaara et al., 1978), Net-1, neuroepithelial-transforming-protein-1, activateur de Rho-A (Chan et al., 1996; Nakaya et al., 2008).

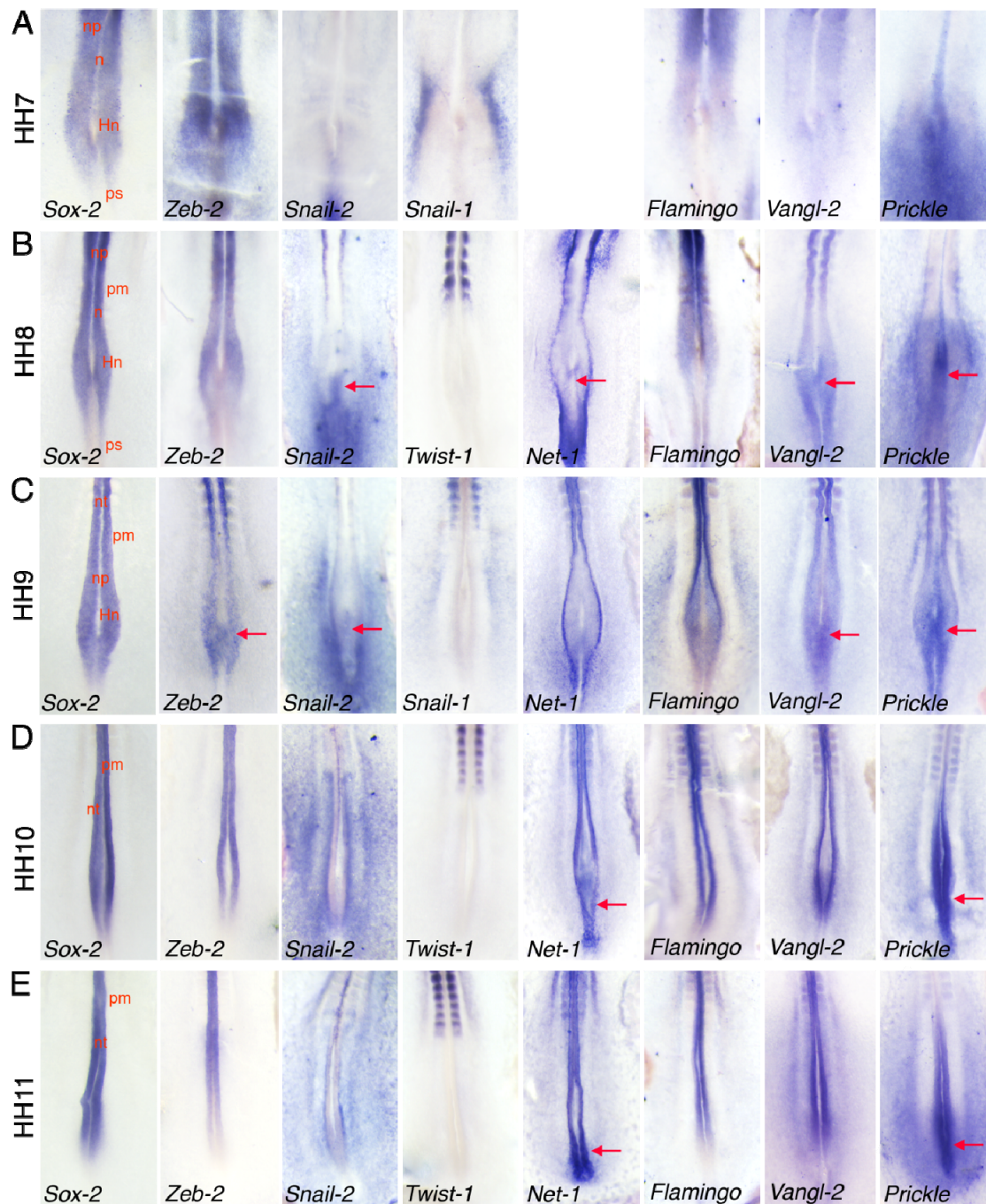
Tout d'abord, avant de décrire précisément ces profils d'expression, la position du nœud de Hensen, centre organisateur de l'embryon d'oiseau, va être le point de repère indispensable à cette étude. Nous comparerons toujours les régions antérieure et postérieure au centre organisateur d'oiseau, équivalent du centre organisateur de Spemann décrit chez l'amphibien (Spemann and Mangold, 1924; Spemann, 1938). En effet, cette structure transitoire va engendrer la notochorde exprimant la chordin, molécule inhibitrice de la voie BMP, impliqué classiquement dans l'induction neurale et le futur plancher du tube neural (Fig. 44) (Catala et al., 1996 ; De Robertis and Kuroda, 2004; Sasai et al., 1994; Streit et al., 1998 ; Wilson and Edlund, 2001 ). L'expression du facteur de transcription Sox-2 exprimé spécifiquement par l'ensemble des précurseurs neuraux est très informative des modifications morphologiques de la plaque neurale (Fig. 44, Fig. 45 et Fig. 58). Dans la région antérieure au Nœud de Hensen, siège de la neurulation primaire, les cellules exprimant Sox-2 forment une plaque neurale continue et homogène dès les phases précoces du processus morphogénétique (Fig. 44A ; Fig. 45A ; Fig. 47A et B, Fig. 48A et B). Au stade du développement HH8 (5/6somites) apparaît une structure transitoire particulière dans la région postérieure de l'embryon, le *sinus rhomboïdalis*, comportant l'ensemble des précurseurs de la future moelle épinière thoracique et lombo-sacrée (Fig. 44B – 45B) (Catala et al., 1996; Le Douarin et al., 1998), et qui va subir de nombreuses modifications structurelles. En effet, alors que sa taille est maximale au stade HH8 (5/6 somites), le sinus rhomboïdal ne va pas cesser de diminuer en taille au cours du développement embryonnaire jusqu'à former une structure tubulaire continue (Fig. 44 ; Fig. 45 et Fig. 46 – 49). Il apparaît ainsi que le sinus rhomboïdal est la structure indispensable à une transition entre tube neural primaire et secondaire. Postérieurement au Nœud de Hensen, la plaque neurale se scinde en deux formant une véritable queue de pie (Fig. 44B ; Fig. 45B et Fig. 46C) avec dans la région médiane, la ligne primitive observable par l'expression des facteurs de transcription Brachyury et Tbx-6L (Fig. 44).

*A. Le profil d'expression du facteur de transcription Snail-2 laisse supposer que les précurseurs neuraux effectuent une transition épithélium-mésenchyme dans une fenêtre temporelle très étroite au cours de la neurogenèse précoce*



**Figure 44 : Profil d'expression des molécules d'adhérence et de gènes exprimés spécifiquement par les tissus nerveux, mésodermiques axiaux et paraxiaux cours de la neurulation de la région troncale et postérieure de l'embryon**

Hybridation in situ de la région du sinus rhomboïdal d'embryons d'oiseau du stade HH7 (1 somite) au stade HH11 (14 somites) montrant l'expression des molécules d'adhérence (Cadhérine-E, -N et -6B et la claudin-1) et des facteurs de transcription Sox-2 et Chordin exprimés spécifiquement et respectivement par les tissus nerveux et mésodermiques axiaux ainsi que Brachyury et Tbx-6L, exprimés respectivement par les cellules mésodermiques et mésodermiques paraxiales au cours de la formation du système nerveux central de la région troncale et postérieure.



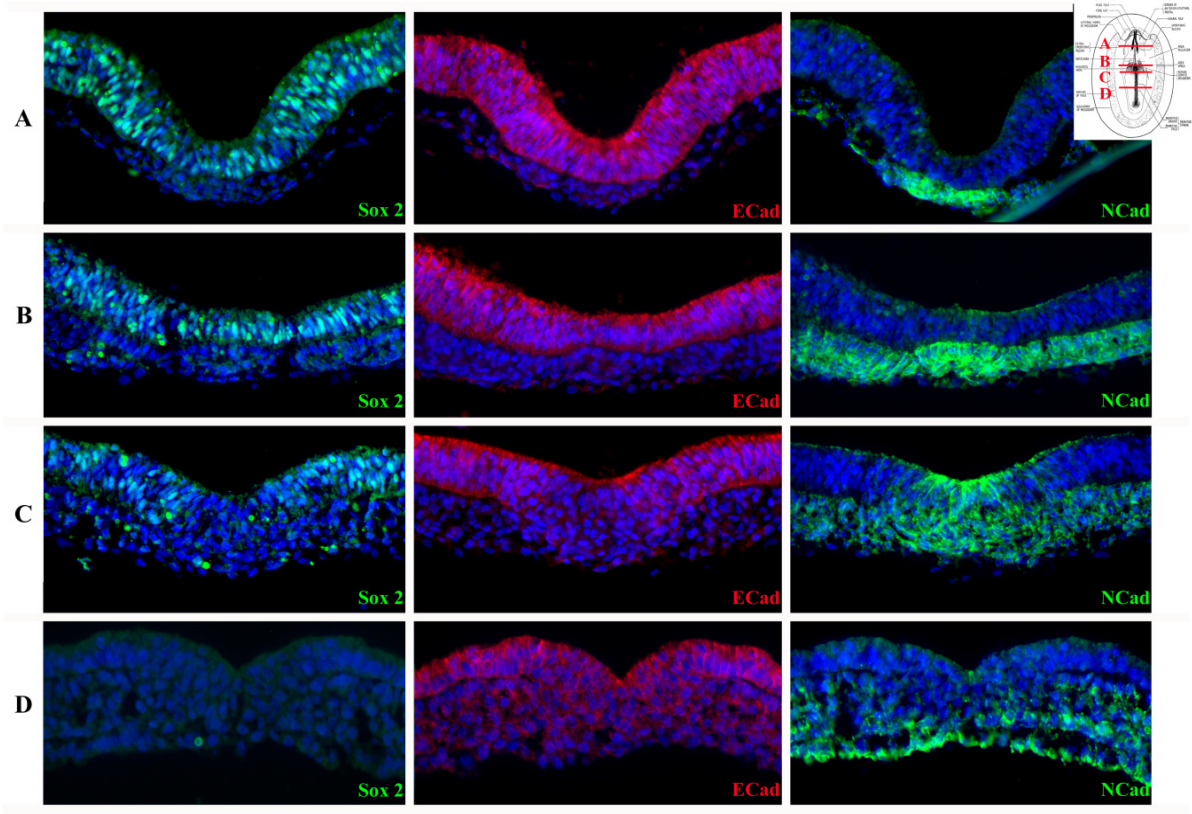
**Figure 45 :** Profil d'expression des régulateurs de la transition épithélium-mésenchyme et des molécules de la polarité planaire au cours de la neurulation de la région troncale et postérieure de l'embryon d'oiseau

Hybridation in situ de la région du sinus rhomboïdal d'embryons d'oiseau du stade HH7 (1 somite) au stade HH11 (14 somites) montrant l'expression des principaux acteurs de la TEM (Snail-1, Snail-2, Twist-1 et ZEB-2 ainsi que Net-1), de celles des molécules de la polarité planaire (Flamingo, Prickle et Vangl-2) et du facteur de transcription Sox-2 exprimé spécifiquement par les cellules neurales au cours de la formation du système nerveux central de la région troncale et postérieure.

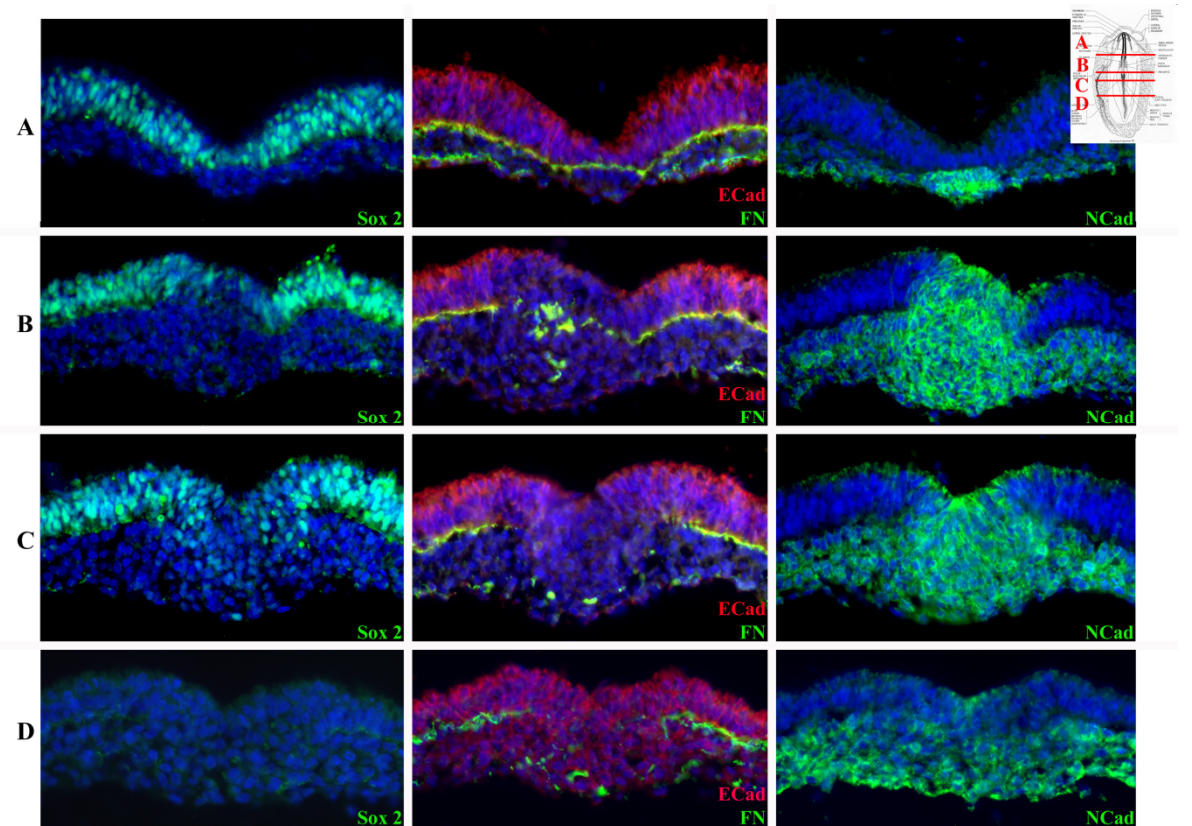
L'expression des acteurs de la transition épithélium-mésenchyme est très dynamique au cours de la neurogenèse précoce de la région moyenne et postérieure de l'embryon d'oiseau. Tandis que les facteurs de transcription Snail-1 et Twist-1 ne semblent pas impliqués dans ce processus (Fig. 45), les profils d'expression des facteurs Snail-2 et ZEB-2 suggèrent des rôles bien définis de chacune de ces molécules lors du processus morphogénétique. L'acteur clef de cette TEM des précurseurs neuraux semble être le facteur de transcription Snail-2 (Fig. 45B et Fig. 58). En effet, au stade HH7, le facteur Snail-2 n'est uniquement exprimé qu'au niveau de la ligne primitive, située très postérieurement au Nœud de Hensen, suggérant ainsi un rôle uniquement dans la TEM des précurseurs mésodermiques lors de la gastrulation (Acloque et al., 2011). Cependant, au stade HH8, une expression forte de Snail-2 par les cellules situées juste caudalement au Nœud de Hensen est observée (Fig. 45B et Fig. 58A) puis celle-ci diminue fortement dans cette région caudale au stade HH10 (Fig. 45C et Fig. 58A). Cette expression forte de snail-2, celle de la E-cadhérine à la surface des précurseurs de cette région anatomique (Fig. 47), l'absence d'une lame basale (Fig. 47C), l'absence d'expression de Net-1 (Fig. 45B et Fig. 58A), acteur moléculaire important permettant la TEM en perturbant l'organisation de la lame basale (Nakaya et al., 2008) et la présence de cellules neurales mésenchymateuses exprimant Sox-2 (Fig. 47C) suggèrent fortement que les précurseurs neuraux de la région postérieure du Nœud de Hensen effectuent une TEM entre le stade HH8 (5 – 6 somites) et HH10 (9 – 10 somites).

*B. Paradoxalement, l'expression du facteur de transcription ZEB-2 coïncide plutôt avec l'arrêt supposé de la TEM des précurseurs neuraux postérieurs*

L'expression du facteur de transcription ZEB-2 suit globalement celle de Sox-2 au cours de la neurogenèse suggérant un rôle canonique de répresseur de la E-cadhérine (Peinado et al., 2007; Vandewalle et al., 2009). Cependant, dans la région caudale et médiane au Nœud de Hensen, le profil d'expression de ZEB-2 est très dynamique. En effet, jusqu'au stade HH8, le facteur de transcription ZEB-2 est faiblement voire non exprimé par les cellules de cette région anatomique (Fig. 45 A – B) tandis qu'au stade HH9 (8 – 9 somites), ZEB-2 est soudainement fortement exprimé par les cellules de cette région caudale (Fig. 45C). De plus, aucune expression de Snail-2 n'est observée dans cette région à ce stade du développement (Fig. 45C et Fig. 58B). L'expression forte de ZEB-2 en synergie avec celle de Net-1 (Fig. 45C-D et Fig. 58B-C) par les cellules juste caudales au Nœud de Hensen suggèrent ainsi très fortement que ce facteur de transcription et Net-1 vont réprimer la TEM des précurseurs neuraux dès la fin du stade HH9 (9 somites). Le rôle du facteur de transcription ZEB-2 en tant



**Figure 46** : Profil d'expression de Sox-2 et des cadhérine-E et -N au stade HH7 (1 somite)



**Figure 47** : Profil d'expression de Sox-2, de la FN et des cadhérine-E et -N au stade HH8 (5 somites)

qu'inhibiteur de la TEM semble de prime abord paradoxal. Cependant les travaux de Sheng G et collaborateurs ont montré un rôle important de Sip-1 (l'autre nom de ZEB-2) dans l'induction neurale chez l'oiseau. Dans ce contexte d'inducteur neural, ZEB-2/Sip-1 réprime la délamination des cellules en inhibant l'expression de facteurs de transcription Brachyury et Tbx-6L et induire l'expression de Sox-2 (Fig. 45C) (Sheng et al., 2003).

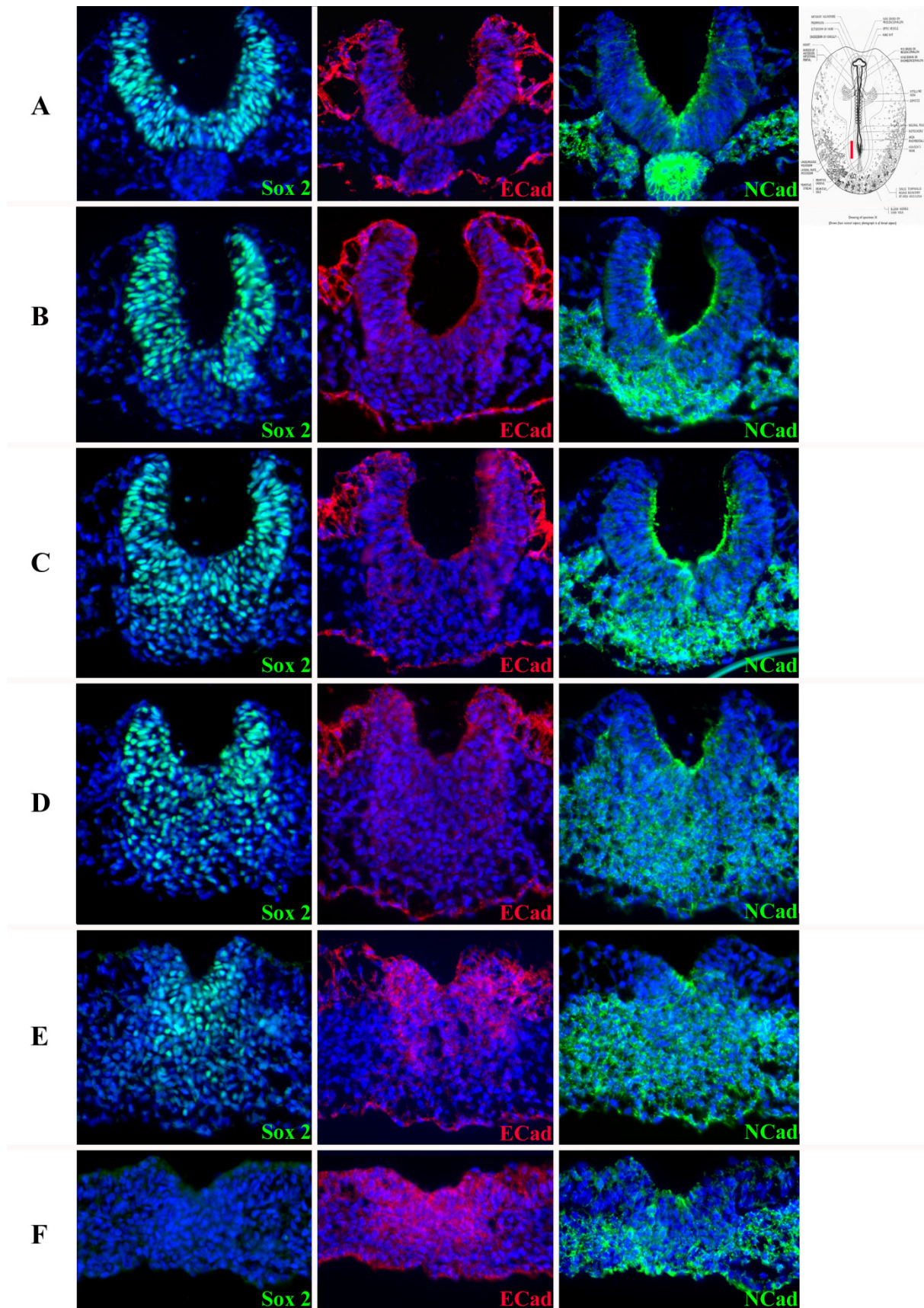
*C. L'expression d'un répertoire spécifique de molécules d'adhérence va ségréger les cellules neurales mésenchymateuses des cellules mésodermiques*

L'expression de la Claudin-1, protéine composant les jonctions serrées, suit celle de la E-cadhérine lors des phases précoces de la neurogenèse (Fig. 44A–C). Cependant, contrairement aux observations décrites lors de la neurulation (Aaku-Saraste et al., 1996), cette protéine est ensuite très fortement exprimée par l'ensemble des cellules neurales de la région postérieure et médiane de l'embryon au stade HH9 (9 somites) (Fig. 44C – E, 58B – D et Fig. 50). De même, la cadhérine-6B est uniquement exprimée par les cellules des bourrelets neuraux ou précurseurs des cellules de la Crête Neurale très précocement lors du développement embryonnaire (Fig.44A – B et Fig.58A) (Nakagawa and Takeichi, 1995; Nakagawa and Takeichi, 1998) puis cette molécule d'adhérence commence à être également exprimée par les cellules neurales postérieures au Nœud de Hensen à partir du stade HH9 (Fig.44C – D et Fig.58B – D). Au stade HH9 (9 somites), l'ensemble des cellules postérieures au Nœud de Hensen, que ce soit les cellules neurales mésenchymateuses exprimant le facteur de transcription Sox-2 ou mésodermiques exprimant Tbx-6L, expriment la N-cadhérine (Fig. 44, Fig. 48, Fig. 49 et Fig. 50) (Dady et al., 2012). Nos résultats suggèrent ainsi qu'après avoir effectué une TEM, les cellules neurales mésenchymateuses migrent postérieurement en exprimant non seulement la N-cadhérine mais également la cadhérine-6B et la claudin-1. L'expression de ce répertoire de molécules d'adhérence spécifique aura pour conséquence non seulement de ségréger les cellules neurales mésenchymateuses des cellules mésodermiques avoisinantes mais semble également nécessaire à la Transition Mésenchyme-Epithéliale conduisant à la formation du tube neural postérieur (Fig. 50).

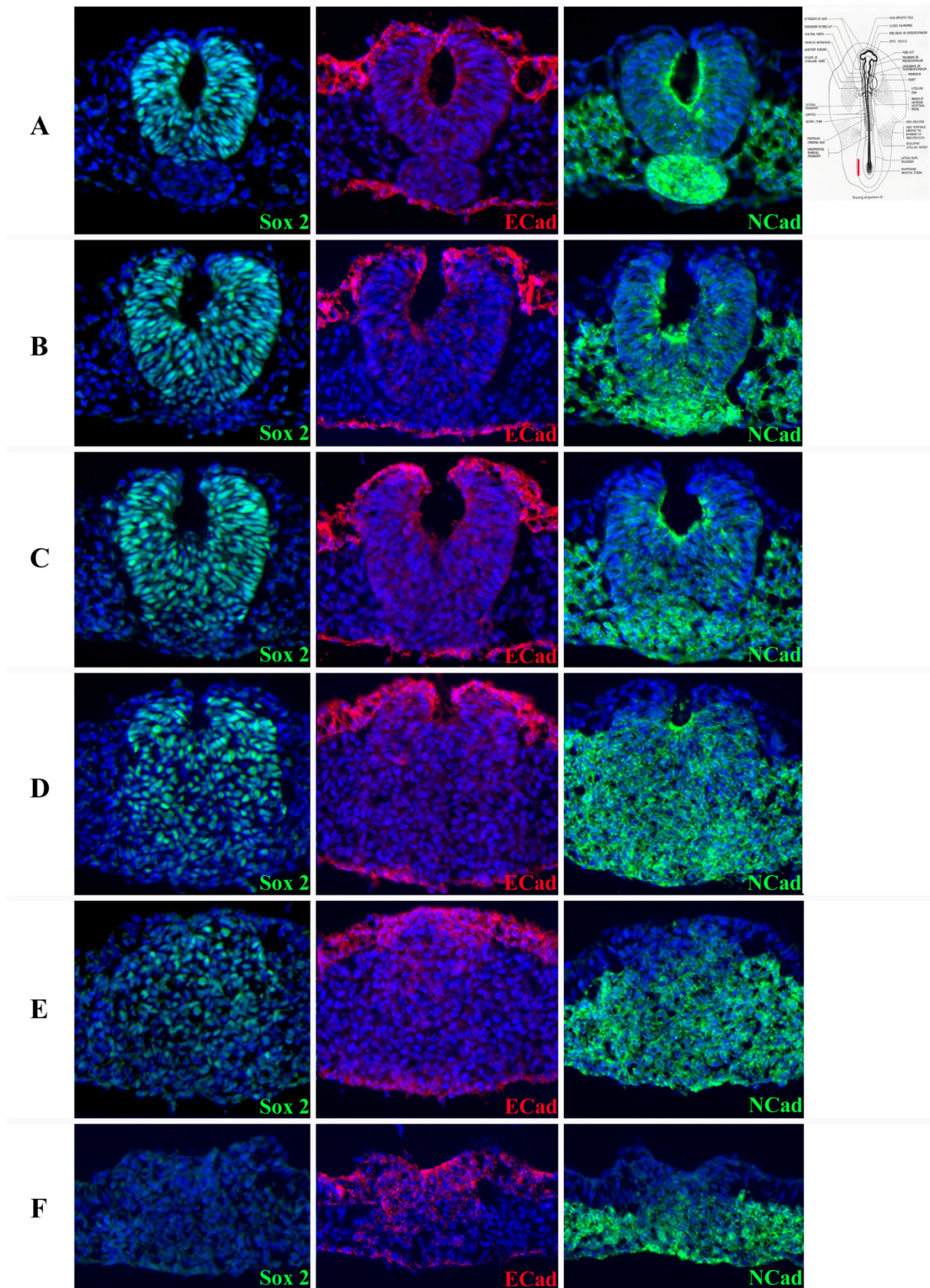
*D. La ré-épithélialisation des cellules neurales mésenchymateuses dans la région postérieure au Nœud de Hensen définit un nouveau mode de formation du système nerveux central : c'est la neurulation intermédiaire*

Ces cellules neurales mésenchymateuses exprimant les cadhérine –N,- 6B et la claudin-1 semblent ainsi migrer postérieurement à partir du stade HH9 (9 somites) (Fig. 48 et Fig. 49),



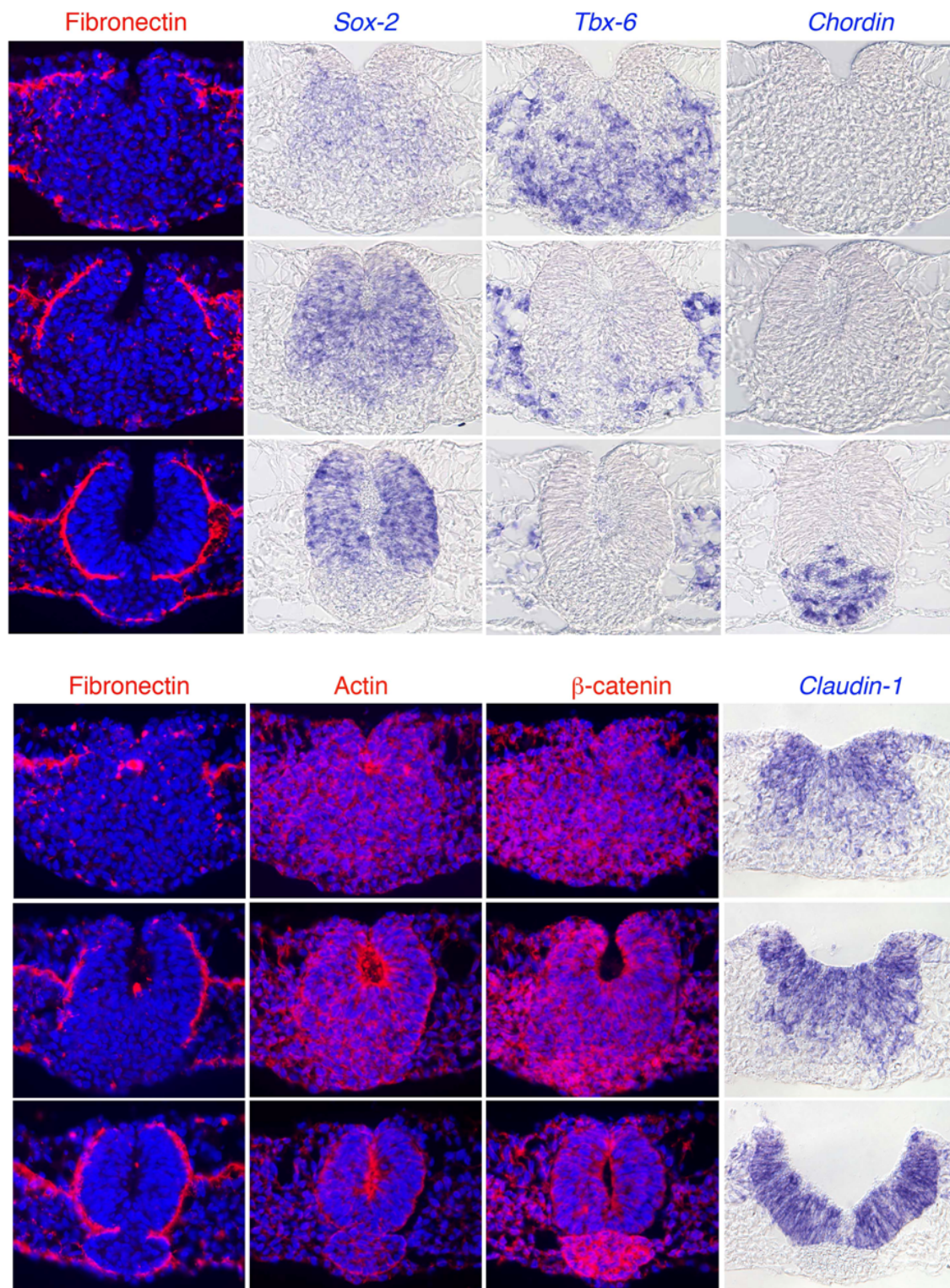


**Figure 48** : Profil d'expression de Sox-2 et des cadhérine-E et -N dans la région postérieure d'embryon d'oiseau au stade HH 9 (9 somites)



**Figure 49** : Profil d'expression de Sox-2 et des cadhérine -E et -N dans la région postérieure d'embryon d'oiseau au stade HH 12 (15 somites)

vont s'épithélialiser (Fig. 48B – D ; Fig. 49B – D et Fig. 50) et former une gouttière neurale dont les bourrelets neuraux n'ont pas encore fusionné (Fig. 48A – B et Fig. 49A – C) contrairement à la neurulation secondaire caractérisée par un recouvrement complet du tube neural par l'ectoderme de surface au cours de la formation du tube neural (Catala et al., 1995; Schoenwolf, 1979; Schoenwolf and Delongo, 1980; Yang et al., 2003). Les cellules neurales mésenchymateuses exprimant Sox-2 se polarisent progressivement au cours de leur TME, présentant un pôle apical exprimant les cadhérine -N, -6B et la claudin-1 vers le neurocoele et un coté basal reposant sur une lame basale (Fig. 48 – 50) produite progressivement selon l'axe dorso-ventral afin de rigidifier la structure tubulaire et ségréger physiquement le tissu neural du mésoderme avoisinant (Fig. 50). Cette ré-épithélialisation de cellules neurales mésenchymateuses va ainsi former une lumière selon l'axe dorso-ventral. Il n'y a pas de phénomène de cavitation. Enfin, le Nœud de Hensen, en régressant, va former le plancher du tube neural intermédiaire et la notochorde sous-jacente (Fig. 48 – 50) (Catala et al., 1996). Ce phénomène de TME de cellules neurales mésenchymateuses débuté au cours de la neurulation intermédiaire se poursuit ensuite postérieurement et continue jusqu'à la formation complète du système nerveux central de la région postérieure de l'embryon (Fig. 49). En effet, après fermeture du neuropore postérieur, au stade HH11-12 (14 à 17 somites), les précurseurs neuraux mésenchymateux qui ont migré postérieurement vont former avec les cellules mésodermiques le bourgeon caudal. L'ectoderme de surface recouvre ensuite entièrement cette structure et le phénomène d'accrétion cellulaire suivi d'une cavitation n'est en fait que la suite de mécanismes déjà initiés lors de la neurulation intermédiaire (Catala et al., 1995; Shimokita and Takahashi, 2011). L'ensemble de ces données montrent ainsi un nouveau mode de neurulation chez l'oiseau qui se distingue de la neurulation primaire antérieure et de la neurulation secondaire très postérieure. Ce mode de neurulation original semble nécessiter une TEM, une ségrégation tissulaire et cellulaire, une migration dirigée de cellules neurales mésenchymateuses vers le pôle postérieur de l'embryon suggérant une régulation très stricte de la matrice extra-cellulaire sous-jacente puis un phénomène de ré-épithélialisation de ces cellules neurales mésenchymateuses selon l'axe dorso-ventral.

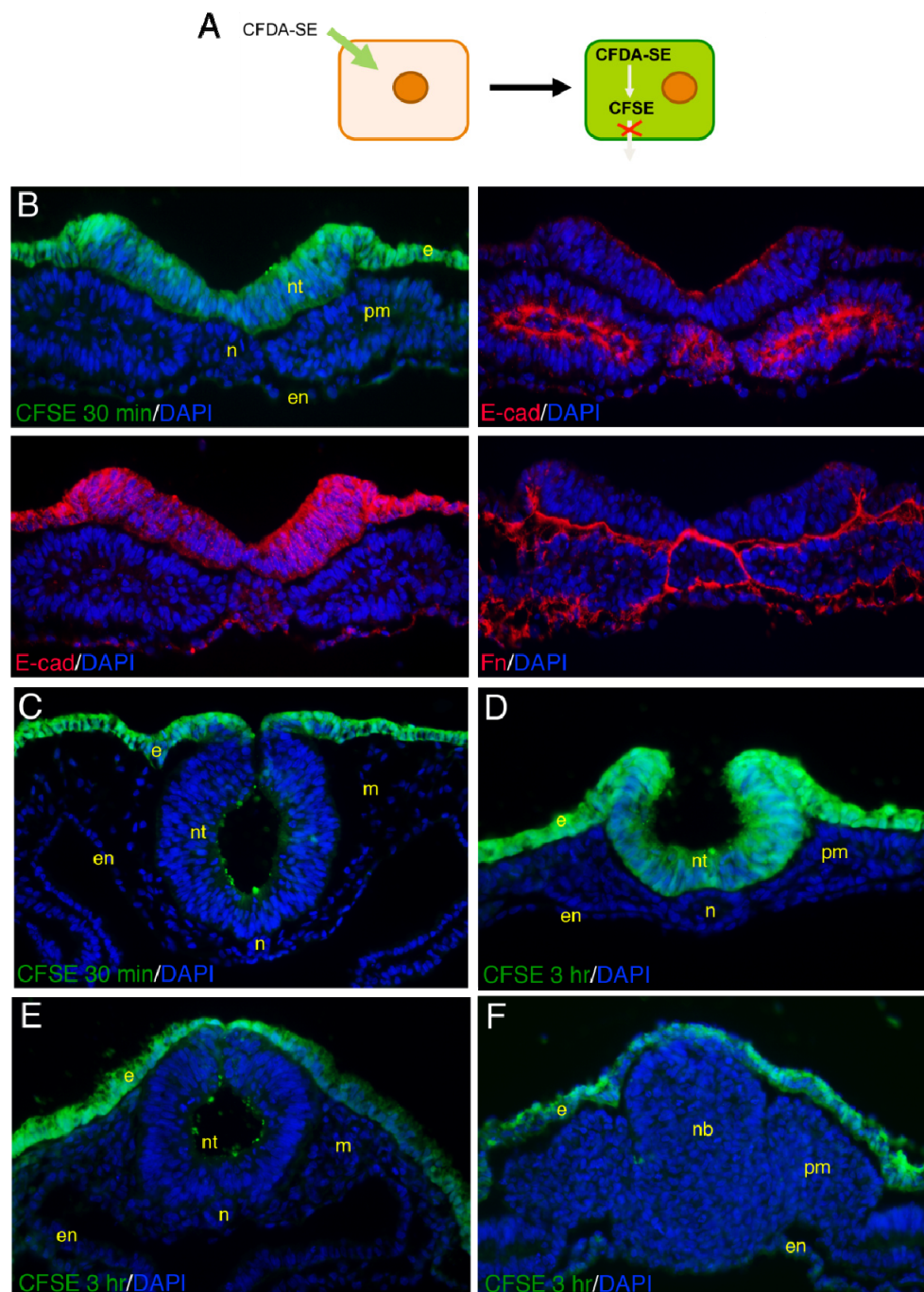


**Figure 50** : Profil d'expression des marqueurs neuraux, mésodermiques paraxiaux et axiaux ainsi que celui de marqueurs de la polarité cellulaire

Immunohistochimie sur coupes montrant l'expression de la fibronectine, de  $\beta$ -caténine et l'actine afin d'analyser la réorganisation du cytosquelette ainsi que les changements dans la polarité des cellules. Hybridation in situ sur coupes montrant les différents lignages cellulaires (Sox-2 pour le tissu neural ; Chordin pour la notochorde et Tbx-6L pour le mésoderme) et l'expression de la claudin-1.

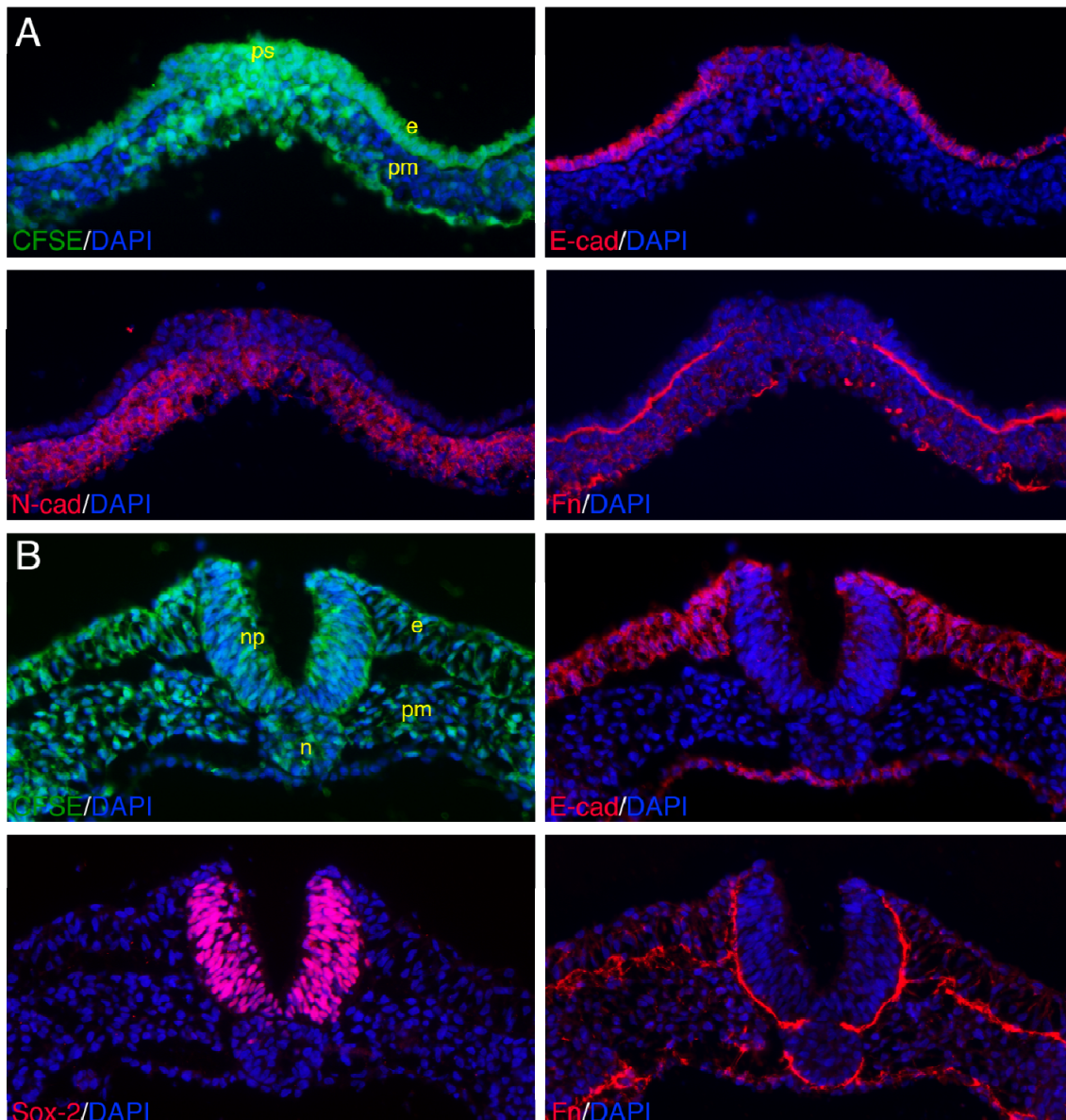
## ***II. La formation du système nerveux troncal et postérieur met en jeu un phénomène de transition épithélium-mésenchyme des précurseurs neuraux de la région postérieure au Noeud de Hensen uniquement dans une fenêtre temporelle très précise***

Afin de définir et comprendre précisément les mouvements cellulaires mis en jeu lors de la formation du système nerveux central de la région troncale et postérieure de l'embryon d'oiseau, nous avons réalisé des expériences de marquage des cellules de surface d'embryons d'oiseau à différents stades du développement (du stade HH4 au stade HH15) à l'aide d'un marqueur fluorescent non lipophile, le 5- and 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Fig. 51A) puis nous avons analysé à différents temps le destin de ces cellules marquées. L'utilisation d'une telle technologie non invasive (Fig. 51) permet de suivre aisément les mouvements morphogénétiques complexes impliqués lors de la neurulation sans craindre de créer des biais liés aux techniques (Garton and Schoenwolf, 1996). L'injection de ce marqueur fluorescent ne modifie ainsi en rien le destin des cellules marquées ni la morphologie de l'embryon (Fig. 51B et Fig. 52). De plus, l'intérêt majeur du CFSE est la rapidité d'intégration et ainsi de détection du marqueur fluorescent, nous pouvons en effet l'observer à partir de 30 minutes d'exposition (Fig. 51C ; Fig. 51D et Fig.52). Cette propriété est essentielle dans l'analyse de mouvements morphogénétiques se réalisant selon une cinétique très (trop) rapide. En injectant le CFSE dans la région antérieure d'un embryon d'oiseau au stade HH8 (5 somites) et en le ré-incubant 30 min, nous pouvons observer que seul l'ectoderme de surface et la plaque neurale sont spécifiquement marqués, sans aucune contamination des tissus mésodermiques et endodermiques sous-jacents (Fig. 51E). De plus, ce marqueur fluorescent n'est pas cytotoxique au cours du temps, en injectant le CFSE dans la région antérieure d'un embryon d'oiseau au stade HH10 (10 somites) ou dans la région postérieure d'un embryon au stade HH14 (20 somites) et en les ré-incubant 3H (pour être plus précis 1H d'exposition au CFSE puis 2H d'incubation sans le marqueur), nous pouvons observer un marquage uniquement de l'ectoderme de surface sans aucune nécrose ni contaminations des tissus sous-jacents indiquant aucun effet sur la perméabilité tissulaire (Fig. 51E et F). De plus, en injectant le CFSE sur des embryons au stade HH4 (stade longueur maximale de la ligne primitive) pendant 1H, en prélever certains puis en ré-incubant les autres pendant 24H (sans exposition au marqueur fluorescent), nous pouvons retracer l'histoire des cellules marquées (Fig. 52) : nous pouvons ainsi observer et analyser la transition épithélium-mésenchyme des cellules de l'ectoderme lors de la gastrulation ( $t=1H$ ) (Fig. 52A) et suivre le



**Figure 51** : *Le CFSE est un marqueur cellulaire fluorescent non cytotoxique dont l'intégration est rapide*

Une incision est effectuée dans l'enveloppe vitelline puis 10  $\mu$ l de CFSE sont injectés sur des embryons d'oiseau en culture à différents stades du développement puis prélevés à différents temps afin d'être analysés. Il apparaît que l'intégration du marqueur fluorescent est très rapide car un marquage est observable dès 30 min. d'exposition. De plus, ce marqueur fluorescent n'est pas cytotoxique car il ne modifie pas les profils d'expression des cellules du tube neural.



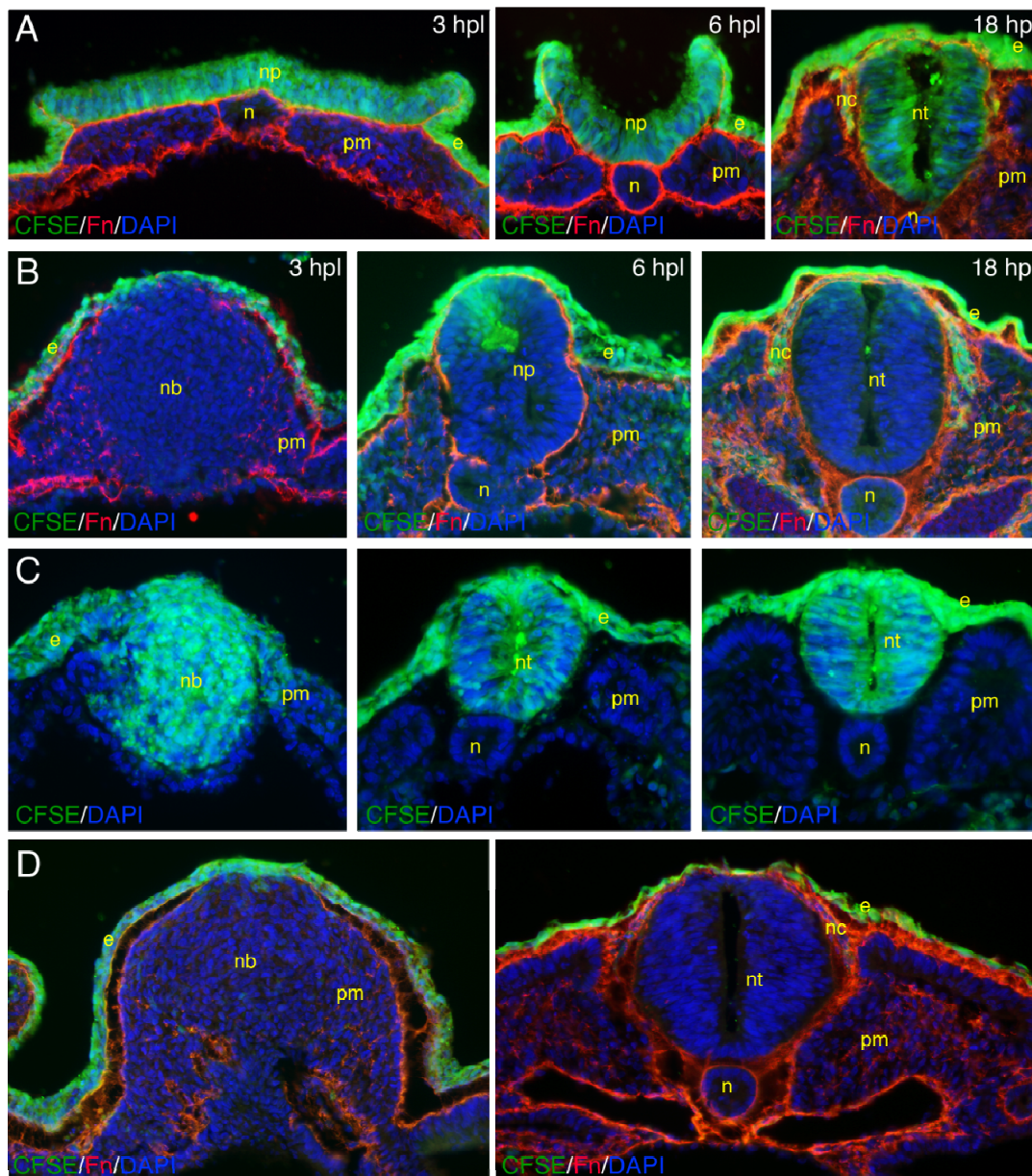
**Figure 52** : *Le CFSE est un marqueur cellulaire fluorescent non cytotoxique dont la stabilité permet des analyses à long terme et ainsi de retracer l'histoire des cellules marquées*

Une incision est effectuée dans l'enveloppe vitelline puis 10  $\mu$ l de CFSE sont injectés sur des embryons d'oiseau en culture au stade HH4 du développement embryonnaire puis prélevés d'une part au bout de 1H d'exposition afin d'analyser le comportement des cellules marquées à court terme et d'autre part des embryons opérés sont prélevés après 1H d'exposition au CFSE+23 d'incubation afin d'observer le devenir des cellules marquées. (A) : La TEM des cellules de l'ectoderme lors de la gastrulation est ainsi observée à court terme ; (B) : 24H après l'injection de CFSE l'ensemble des cellules de l'embryon est marquées indiquant ainsi que l'ensemble des progéniteurs des tissus ectodermique, neural et mésodermique étaient en surface au stade HH4. Le CFSE permet ainsi de retracer à long terme l'histoire des cellules de surface marquées à différents stades du développement embryonnaire (n=3).

destin de ces cellules 24H après : toutes les cellules de l'embryon sont marquées indiquant ainsi que l'ensemble des précurseurs des différents tissus sont en surface au stade HH4 (et surtout que le marqueur fluorescent est stable suffisamment longtemps pour des études jusqu'à 24H !) (Fig. 52B) (Stern, 2004). Ainsi l'utilisation du CFSE, une technologie non invasive, dont l'intégration et l'observation est rapide, est un outil pertinent et indispensable au traçage du mouvement de cellules spécifiquement et ponctuellement marquées. Nous avons donc un outil qui nous permet d'analyser très précisément la cinétique des événements au cours de la neurogenèse précoce et ainsi de retracer dans son intégralité l'histoire cellulaire au cours de la formation du système nerveux central (il suffit juste de moduler le curseur du temps comme dans le film « Retour vers le futur »).

Lorsque le marquage cellulaire fluorescent est réalisé dans la région antérieure au Nœud de Hensen d'embryons au stade HH8 (5 à 8 somites), seules les cellules de la plaque neurale et de l'ectoderme de surface reposant sur une lame basale continue sont marquées 3H après l'injection (1H d'exposition au CFSE puis 2H de ré-incubation) puis cette plaque neurale composée de cellules fluorescentes se soulève (6H post-Injection- 6 HpI) et va enfin former un tube neural dont l'intégralité des cellules (dont les Cellules de la Crête neurale) sont marquées 18 HpI (Fig. 53A) : c'est la neurulation primaire (Colas and Schoenwolf, 2001). De même, si nous injectons le CFSE à la surface d'embryons au stade HH14 (20 somites), seules les cellules de l'ectoderme de surface sont marquées dans la région du bourgeon caudal 3 HpI, puis au cours de la formation du tube neural par un phénomène de cavitation, seules les cellules de la région dorsale, les cellules de la Crête neurale, expriment le marqueur fluorescent (Fig. 53B) : c'est la neurulation secondaire (Catala, 2002; Catala et al., 1995; Holmdahl, 1938; Pasteels, 1937; Schoenwolf, 1984). De manière assez surprenante, l'observation de cellules de la crête neurale fluorescentes lorsqu'une injection de CFSE est réalisée à ce stade suggère que ces cellules ont été à la surface au cours de la formation du tube neural secondaire puis incorporées au tissu neural par un mécanisme inconnu (Fig. 53B). Cependant, lorsque le CFSE est injecté au stade HH11 (12 somites), les cellules de la Crête neurale ne sont pas marquées dans la région antérieure de l'embryon suggérant que ces cellules ont été déjà intégrées au tube neural lors de l'injection et donc non accessibles au marqueur fluorescent (Fig. 53D). Le mouvement des cellules de surface marquées de la région postérieure d'embryons au stade HH8 (5 à 8 somites) est tout aussi surprenant (Fig. 53C, Fig. 54 et Fig. 55). En effet, lorsque le CFSE est injecté au niveau des

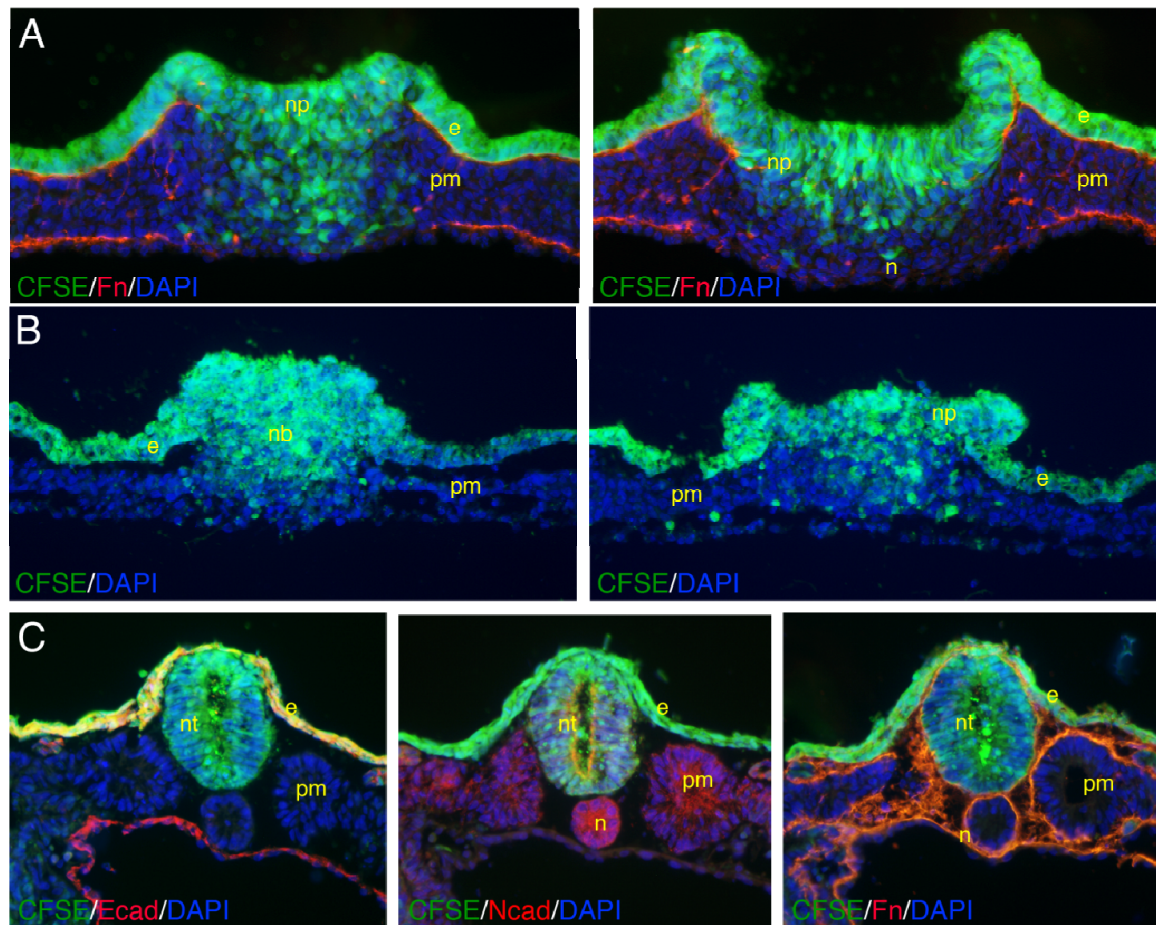




**Figure 53** : *Le marquage au CFSE des cellules de surface d'embryons à différents stades de développement embryonnaire permettent d'analyser les mouvements morphogénétiques liés aux différents modes de neurulation*

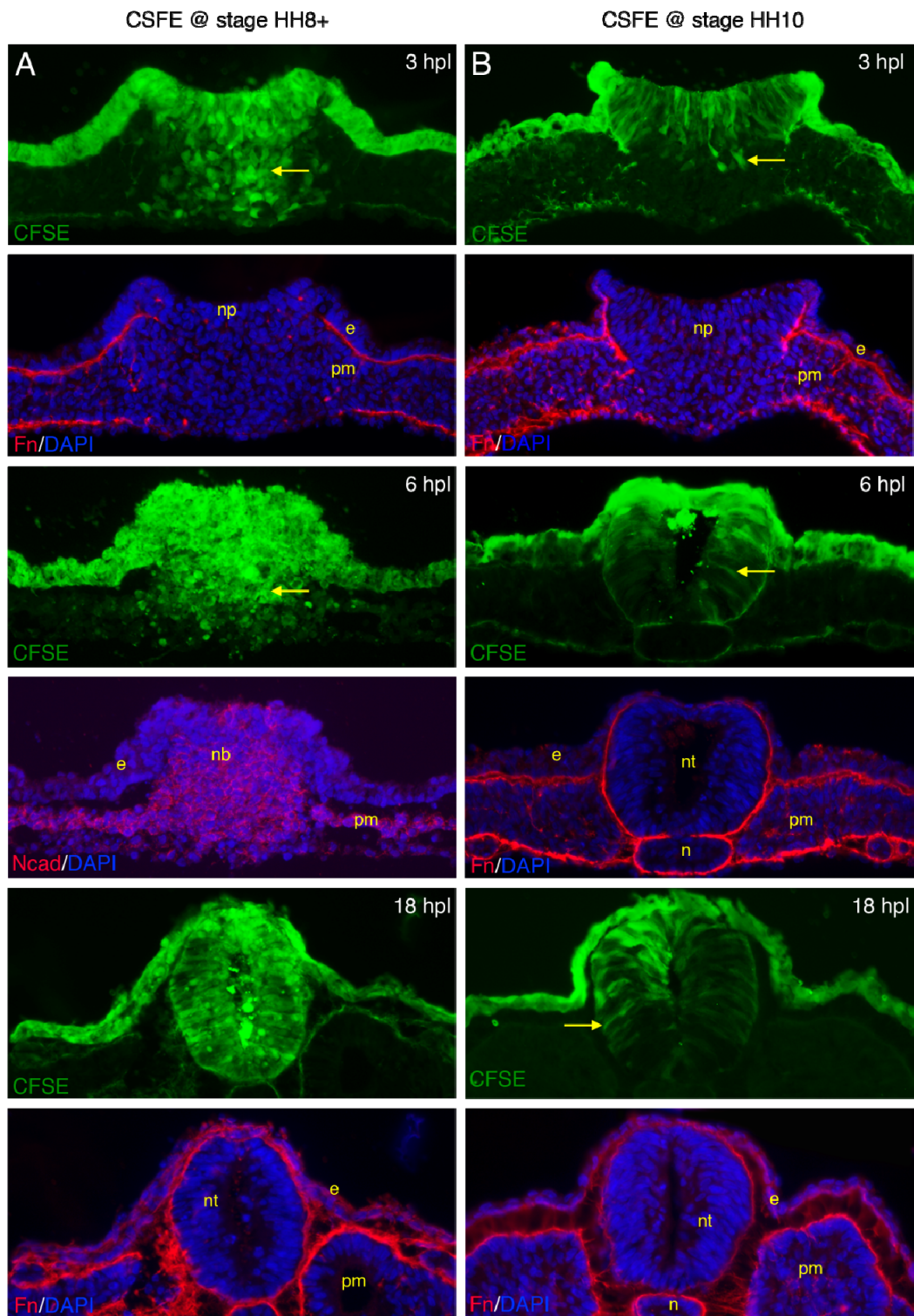
(A) : L'injection du CFSE dans la région antérieure d'embryons d'oiseau au stade HH8 permet d'observer les mouvements morphogénétiques liés à la neurulation primaire (n=8); (B) : L'injection du marqueur fluorescent à la surface d'embryons au stade (HH14) conduit uniquement au marquage des cellules de l'ectoderme de surface lors des mouvements morphogénétiques liés à la neurulation secondaire. De manière étonnante, seules les cellules de la Crête Neurales sont marquées (n=5); (C) : 24H (1H d'exposition au CFSE+23H d'incubation) après l'injection du marqueur fluorescent à la surface des cellules situées dans la région du sinus rhomboïdal d'embryons d'oiseau au stade HH8, l'ensemble des cellules du tube neural de la région thoraco-lombo-sacrée jusqu'au bourgeon caudal est marquée (n=6); (D) : Lorsque le CFSE est injecté à la surface d'embryons au stade HH11, aucune cellule neurale marquée ne sont observées au niveau du bourgeon caudal indiquant que les précurseurs neuraux du tube neural postérieur étaient déjà internalisés au moment de l'injection (n=11).

cellules de surface du sinus rhomboïdal d'embryons au stade HH8 puis ré-incubés 24H (Exposition d'1H au CFSE puis incubation de 23H), l'ensemble des cellules du tube neural de la région troncale et postérieure jusqu'au niveau du bourgeon caudal sont fluorescentes, démontrant ainsi que l'ensemble des précurseurs neuraux de la région troncale et postérieure se situent à la surface de cette région anatomique provisoire qu'est le sinus rhomboïdal (Fig. 53C et Fig. 54C) (Catala, 2002; Catala et al., 1996). De plus, nous n'avons jamais observé de cellules mésodermiques marquées au CFSE démontrant ainsi que seuls les progéniteurs neuraux sont présents en surface dans cette région du sinus rhomboïdal caudale et médiane au Nœud de Hensen au stade HH8 (5 – 6 somites) (Fig. 53C). Les progéniteurs mésodermiques ayant probablement effectué leur TEM bien avant ce stade du développement embryonnaire. Il apparaît ainsi que ces progéniteurs neuraux de la région du sinus rhomboïdal localisées caudalement au Nœud de Hensen au stade HH8 (5-8 somites) effectuent une transition épithélium-mésenchyme (Fig. 54A et Fig. 55A), vont migrer postérieurement (Fig. 54B et Fig. 55A) puis se ré-épithélialiser selon l'axe dorso-ventral (Fig. 54C et Fig. 55A). Lorsque l'injection de CFSE a lieu dans cette région postérieure d'embryons au stade HH10 (10 somites), très peu de cellules neurales marquées effectuant une TEM sont observées (Fig. 55B) puis un tube neural constitué à la fois de cellules marquées au CFSE et non marquées se forme 18H après l'injection (Fig. 55B). Cette expression poivre et sel démontre ainsi que dans cette région troncale de l'embryon, le tube neural est constitué de cellules neurales ayant plusieurs origines spatiales. En effet, les cellules neurales non marquées ont effectué leur TEM avant l'injection du marqueur fluorescent, c'est-à-dire au stade HH10, ont migré postérieurement puis se sont réassociées avec des cellules neurales superficielles ayant été en contact avec le CFSE. Cependant, deux phénomènes peuvent expliquer le marquage fluorescent de certaines cellules de ce tube neural intermédiaire (Fig. 55B). Tout d'abord, le marquage de ces cellules indique qu'elles ont été en surface et donc au contact du marqueur fluorescent lors de l'injection au stade HH10, certaines cellules vont donc ensuite rester au niveau dorsal du tube neural (Fig. 55B - 6HpI), ce sont les cellules les plus fortement marquées, et d'autres cellules neurales marquées au CFSE ont effectué une TEM puis migrer postérieurement afin de se ré-épithélialiser ventralement au tube neural intermédiaire (Fig. 55B – 18HpI), ce sont les cellules plus faiblement marquées au CFSE situées dans la moitié ventrale du tube neural. Enfin, lorsque l'injection du marqueur est réalisé dans la région postérieure d'embryons au stade HH11 (12 somites), aucune cellule fluorescente marquée au CFSE n'est observée dans la région du bourgeon caudal 24 HpI (Fig. 53D). En effet seules les



**Figure 54** : *L'ensemble des progéniteurs neuraux du système nerveux central de la région troncale moyenne et postérieure sont déjà présents dans la région du sinus rhomboïdal caudale et médiane au Nœud de Hensen d'embryons au stade HH8*

Une incision est effectuée dans l'enveloppe vitelline puis 10  $\mu$ l de CFSE sont injectés à la surface des cellules de la région du sinus rhomboïdal caudale et médiane au Nœud de Hensen d'embryons d'oiseau en culture au stade HH8 du développement embryonnaire puis prélevés : (A) : au bout d'1 Heure, observation de la TEM des cellules neurales (n=8); (B) : au bout de 6 heures, observation de cellules neurales marquées au niveau du bourgeon caudal indiquant que les cellules neurales de cette région anatomique ont migré postérieurement après avoir effectuées une TEM (n=4); (C) : 24H après l'injection de CFSE l'ensemble des cellules neurales du tube neural de la région thoraco-lombo-sacrée est marquée (n=6).



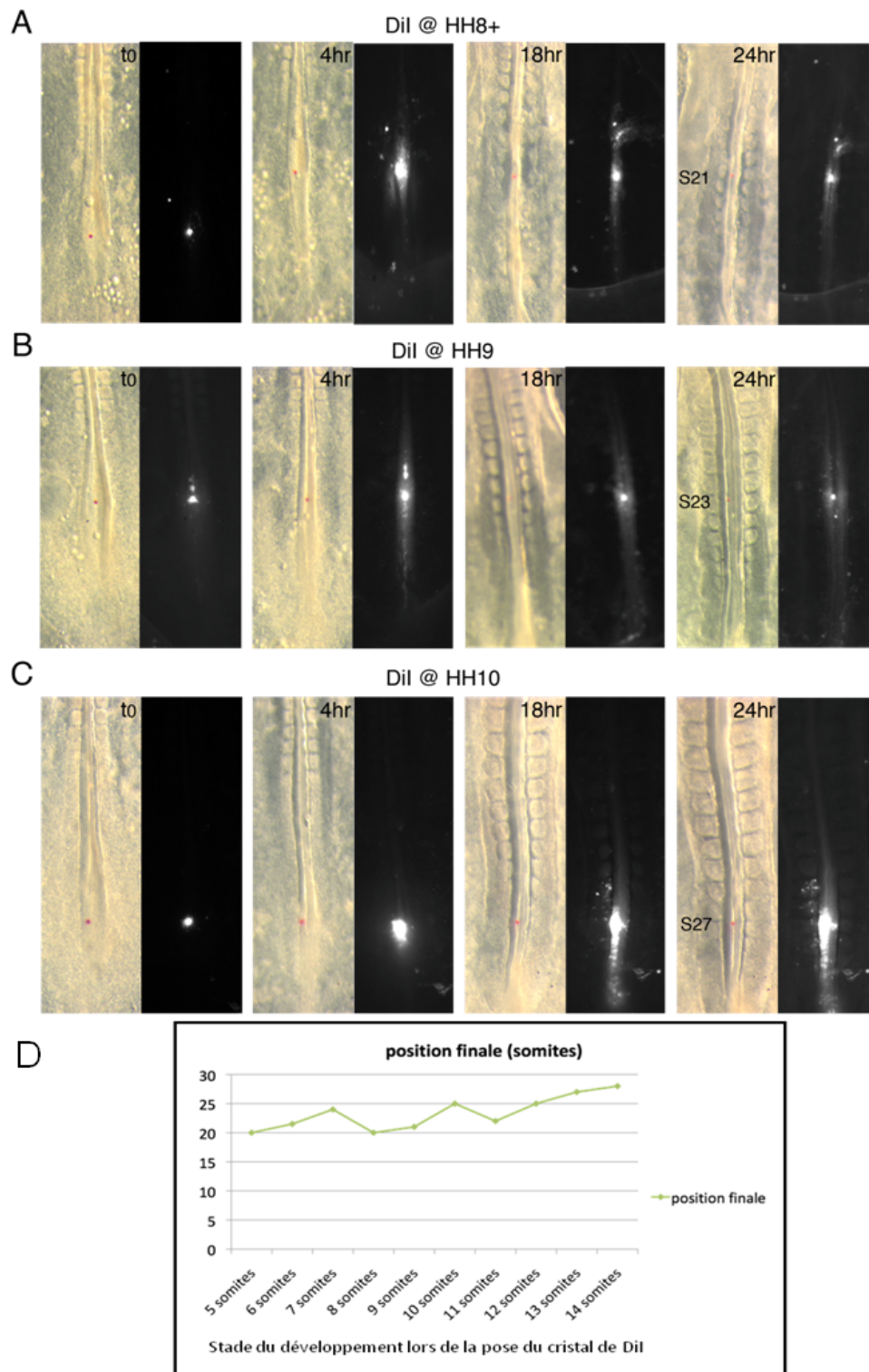
**Figure 55** : *La Transition Epithélium-Mésenchyme des précurseurs neuraux du tube neural troncal et postérieur a lieu entre les stades HH8 et HH10*

Injection de 10  $\mu$ l de CFSE à la surface des cellules de la région du sinus rhomboïdal caudale et médiane au Nœud de Hensen d'embryons d'oiseau en culture au stade HH8 (A) et HH10 (B) du développement embryonnaire puis prélevés et observés après 3H, 6H puis 18H d'exposition au marqueur fluorescent puis d'incubation.

cellules de l'ectoderme de surface sont fluorescentes dans cette région anatomique de l'embryon. Cette expérience montre ainsi que les précurseurs neuraux de la région postérieure n'ont pas été en contact avec le marqueur fluorescent indiquant *de facto* que ces cellules ont déjà été internalisées lors de l'injection au stade HH11 (12 somites). L'ensemble de ces données vont dans le sens tout d'abord que la totalité des progéniteurs neuraux de l'ensemble de l'axe antéro-postérieur de l'embryon d'oiseau est déjà produit dès l'induction de la plaque neurale (Brown and Storey, 2000), puis que la couche cellulaire superficielle de la région du sinus rhomboïdal postérieure et médiane au nœud de Hensen n'est constituée uniquement que de progéniteurs neuraux. Les précurseurs du système nerveux central de la région troncale et postérieure, localisés dans cette région anatomique, effectuent ensuite une transition épithélium-mésenchyme dans une fenêtre temporelle très étroite, uniquement entre les stades HH8 (5 – 8 somites) et HH10 (9 – 10 somites), renforçant ainsi l'étude des profils d'expression (Fig. 44 – 50) puis ces cellules neurales mésenchymateuses migrent postérieurement et effectuent finalement une transition mésenchyme-épithéliale afin de former non seulement le tube neural intermédiaire mais également le tube neural secondaire.

### ***III. La neurulation intermédiaire conduit à la formation de la moelle épinière de la région des vertèbres thoraciques***

Il est décrit classiquement deux modes de formation du système nerveux central lors de la neurogenèse précoce d'oiseau : la neurulation primaire s'achevant avec la fermeture du neuropore antérieur (Puelles et al., 1987) et du neuropore postérieur au niveau de la 27<sup>ème</sup> paire de somites (Catala et al., 1995) correspondant à la région céphalo-cervico-thoracique puis caudalement au neuropore postérieur la neurulation secondaire dans la région lombosacrée (Colas and Schoenwolf, 2001; Le Douarin et al., 1998). Cependant, nous avons décrit une nouvelle forme de neurulation faisant la transition entre ces deux modes déjà décrits. Ce mode de neurulation original a lieu postérieurement au Nœud de Hensen bien avant la fermeture du neuropore postérieur ayant lieu au stade HH12 (14 – 17 somites). Bruce B. Criley avait observé une zone de transition de seulement 200 µm de longueur entre neurulation primaire et secondaire chez l'oiseau mais cette observation n'a été faite uniquement qu'au stade HH15 (25 somites) du développement embryonnaire, c'est-à-dire au cours de la neurulation secondaire et plutôt largement après la fermeture du neuropore



**Figure 56 :** Une cartographie réalisée par dépôt de microcristaux de DiI dans la région du sinus rhomboïdal caudale au Nœud de Hensen indique que la neurulation intermédiaire concerne la moelle spinale de la région thoracique

Un microcristal de DiI est déposé caudalement au Nœud de Hensen à différents stades du développement embryonnaires d’oiseau (du stade HH8 à HH12) puis les embryons sont observés à différents temps jusqu’24H (A- C) ; (D) : tableau récapitulant les positions finales des microcristaux montrant que la neurulation intermédiaire a lieu entre les 20<sup>ème</sup> et 27<sup>ème</sup> paire de somites, la région des vertèbres thoraciques. (Pour chaque point, n = 4 en moyenne).

postérieur (Criley, 1969). Cependant nos travaux montrent que la transition entre neurulation primaire et secondaire est très progressive au cours du développement embryonnaire et conclure sur l'observation d'embryons à un unique stade du développement semble limitée. Nous avons ainsi voulu réaliser une cartographie précise de la région anatomique concernée par la neurulation intermédiaire, véritable transition entre neurulation primaire et secondaire. Pour cela un cristal de le 1,1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate ou DiI est déposé dans une zone du sinus rhomboïdal juste caudale au Nœud de Hensen entre les stades HH8 (5 somites) et HH12 (14 – 15 somites), ces embryons sont ensuite ré-incubés puis observés à différents temps (Fig. 56). Le cristal de DiI se situe ainsi au niveau de la 21<sup>ème</sup> paire de somites 24H après avoir été déposé postérieurement au Nœud de Hensen au stade HH8+ (6 somites) (Fig. 56A) puis au niveau de la 23<sup>ème</sup> paire de somites 24H après dépôt du cristal de DiI dans la même région anatomique d'embryons au stade HH9 (9 somites) (Fig. 56B) et enfin le cristal de DiI se retrouve finalement au niveau de la 27<sup>ème</sup> paire de somites 24H après avoir été déposé au stade HH12 (14 somites) (Fig. 56D). De manière intéressante, le cristal de DiI se situe également au niveau de la 27<sup>ème</sup> paire de somites 24H après avoir été déposé dans la région la plus caudale du sinus rhomboïdal d'embryon au stade HH10 (11 somites) (Fig. 56C). L'ensemble de ces résultats indique ainsi que le tube neural issu de la neurulation intermédiaire se situe entre la 20<sup>ème</sup> paire de somites participant à la formation de la dernière vertèbre cervicale et la première vertèbre thoracique et la 27<sup>ème</sup> paire de somites qui participe à la formation de la dernière vertèbre thoracique et la première vertèbre lombaire. La formation du système nerveux central au cours de la neurulation intermédiaire a lieu ainsi au niveau de la région thoracique.

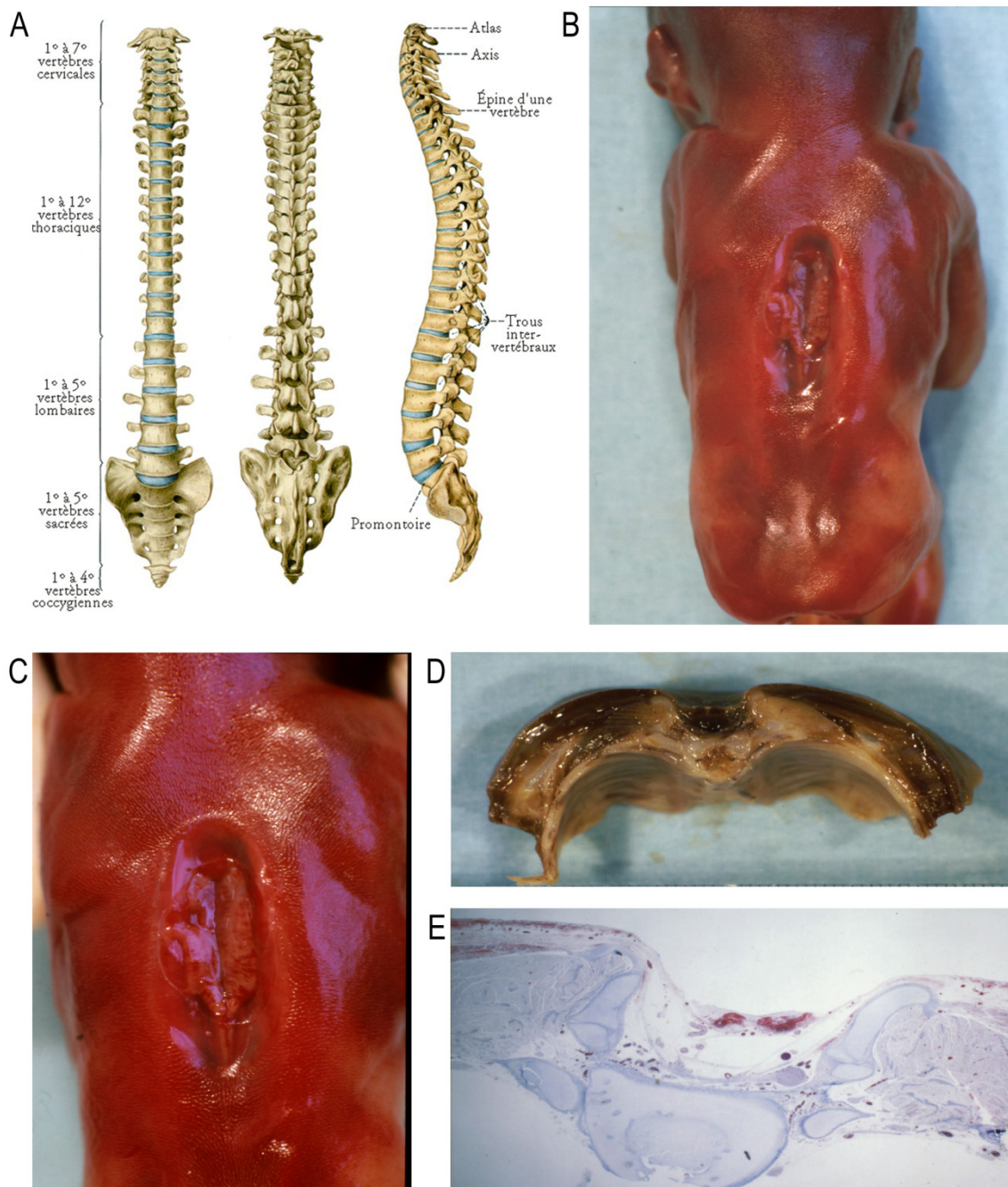
#### ***IV. Des anomalies de fermeture du tube neural (ATN) de la région thoracique conduisent à des formes sévères de Spina Bifida chez l'Homme***

Les anomalies de fermeture du tube neural (ATN), spécifiques des vertébrés supérieurs, sont des malformations congénitales. Ces ATN sont le plus souvent des conséquences de défauts d'apposition et de fusion des bourrelets neuraux au cours de la neurulation primaire et peuvent entraîner des pathologies très graves allant de la paraplégie à la mort du fœtus. Ces ATN apparaissent à différents niveaux de l'axe Antéro-Postérieur (Greene and Copp, 2009). Les ATN spinales sont issues du défaut de fermeture du neuropore postérieur et les formes les plus sévères conduisent à une *spina bifida* caractérisée par une plaque neurale caudale ouverte (*spina bifida aperta*) (Fig. 57B – C) (Greene and Copp, 2009). Le terme *spina bifida* se réfère avant tout à un défaut de fermeture des arcs vertébraux qui

accompagnent systématiquement les lésions de la moelle épinière (Fig. 57D – E). En effet, au cours du développement embryonnaire, les arcs vertébraux se forment à partir du sclérotome issu du mésoderme paraxial. Ces cellules mésodermiques vont migrer, entourer le tube neural et se différencier afin de former le rachis. Ainsi lorsque la plaque neurale spinale est ouverte, les cellules du sclérotome ne peuvent pas entourer le tube neural et il en résulte par conséquent une altération de la formation du rachis laissant la région centrale ouverte (Fig. 57B – E). L'étendue du handicap permanent dépend de la localisation de l'anomalie sur la colonne vertébrale (Fig. 57A). Lors de lésions hautes le risque de paralysie des membres inférieurs est plus important que lors de lésions basses où les problèmes les plus fréquents sont l'absence de contrôle des sphincters de la vessie et du rectum. A ces séquelles peuvent s'ajouter les complications d'une hydrocéphalie causée par un défaut de circulation du liquide cérébro-spinal (LCS) (Anomalies de Chiari de type II) (Wyszynski, 2005). Des nouveaux-nés atteints de *spina bifida* sont opérés après la naissance pour prévenir une aggravation des dégâts du système nerveux.

La localisation anatomique de l'anomalie de fermeture du tube neural, *spina bifida* au niveau thoracique, de ce fœtus humain (Fœtus humain de 18 semaines, No : P020048; images données gentiment par Martin Catala) suggère qu'il s'agit de défauts de formation du système nerveux central par neurulation intermédiaire (Fig. 57B – E). En effet, le système nerveux de la région céphalo-cervicale formé par neurulation primaire se développe normalement (Fig. 57B et Fig. 57C). Dans la région thoracique, la plaque neurale est totalement ouverte (Fig. 57B – C) et est en continuité avec l'épiderme car l'arc vertébral ne recouvre pas le système nerveux central (Fig. 57D – E). Caudalement, la moelle épinière de la région lombo-sacrée formée par neurulation secondaire ne présente pas de défauts morphologiques (Fig. 57B – C). Comprendre les mécanismes moléculaires orchestrant les mouvements morphogénétiques spécifiques observés lors de la neurulation intermédiaire permet ainsi de mieux définir et comprendre l'étiologie de ces pathologies humaines affectant 1 à 2/1000 nouveau-nés viables. La signalisation transduite par les molécules de la polarité planaire, nécessaire aux mouvements cellulaires polarisés observés lors des mécanismes d'extension et de convergence des cellules de l'ectoderme par exemple, jouent de nombreux rôles lors de la fermeture du tube neural. De plus, la perturbation de cette voie de signalisation est liée à certaines ATN mais le rôle exact de ces molécules de la polarité planaire lors de la neurulation demeure encore peu connu.





**Figure 57 : Les Anomalies de fermeture du Tube Neural de la région des vertèbres Thoraciques conduisent à une forme très sévère de Spina Bifida chez l'Homme**

(A) : Le rachis humain est constitué de 33 vertèbres : sept vertèbres cervicales, douze thoraciques, cinq lombaires, cinq sacrées et quatre coccygiennes (Larousse médical) ; (B) et (C) : Fœtus humain de 18 semaines de gestation (N° P020048) présentant un *spina bifida* sévère présentant un tube neural ouvert uniquement au niveau de la région des vertèbres thoraciques, le système nerveux central de la région céphalo-cervical et lombo-sacrée semble subir aucunes anomalies morphologiques ; (D) : Coupe transversale de la région thoracique présentant l'absence de formation des arcs vertébraux et une plaque neurale ouvert; (E) : Coupe histologique et coloration au trichrome en bleu nous montrant une plaque neurale en continuité avec l'épiderme de surface situé au-dessus du corps vertébral de la vertèbre thoracique ne comportant plus d'arcs. (images provenant de Martin Catala).

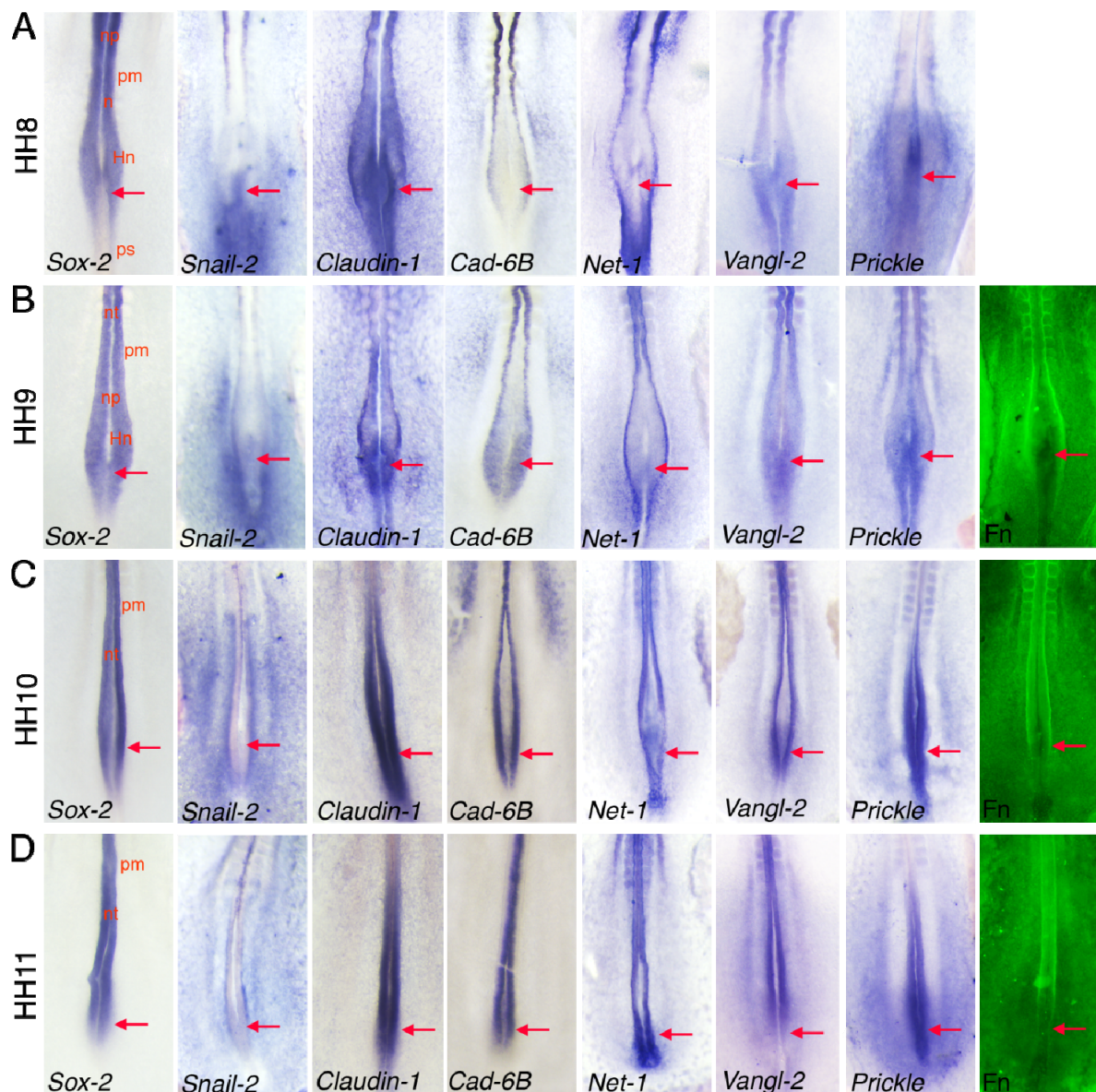
***V. Les molécules de la polarité planaire semblent être des acteurs majeurs non seulement de la neurulation intermédiaire mais également de la neurulation secondaire***

De nombreuses études génétiques chez l'Homme et la souris ont permis de mettre en évidence un rôle critique des molécules de la polarité planaire dans la formation des Anomalies de fermeture du tube neural (Copp et al., 2003) (Wu et al., 2011) (Robinson et al., 2012). En effet, de nombreuses lignées de souris mutées pour les gènes de la polarité planaire reproduisant l'ensemble de ces pathologies du système nerveux central sont utilisées comme modèle d'étude : les souris *looptail* (un isoforme du gène *Vangl2*) (Wang and Nathans, 2007) (Kibar et al., 2011) (Torban et al., 2004) (Torban et al., 2008) ou mutées pour le gène *Celsr1* (*Flamingo*) et *Scrib* (Robinson et al., 2012). Cependant, les phénotypes associés à ces mutations varient selon les patients suggérant des causes multifactorielles. Malgré cette véritable classification de mutations génétiques, il apparaît ainsi que le rôle précis et la fonction de ces gènes dans les mécanismes morphogénétiques mis en jeu lors de la neurulation sont très mal connus. Classiquement, les protéines de la polarité planaire sont associées aux mouvements d'extension et de convergence de l'ectoderme de surface lors du soulèvement et la fusion de la plaque neurale chez l'amphibien (Wallingford and Harland, 2002) et la souris (Ybot-Gonzalez et al., 2007) lors de mécanismes morphogénétiques décrits au cours de la neurulation primaire. Afin de mieux appréhender le rôle de ces molécules de la polarité planaire lors de la neurulation intermédiaire et secondaire, nous avons réalisé une étude très précise des profils d'expression de trois molécules de la polarité planaire les plus décrits lors d'Anomalies de fermeture du Tube Neural humain (Robinson et al., 2012) au cours de la formation du système nerveux central de la région troncale et postérieure : *Flamingo* (Formstone and Mason, 2005), *Prickle* (Cooper et al., 2008) et *Vangl-2* (Torban et al., 2004) (Torban et al., 2008) (Ybot-Gonzalez et al., 2007) (Fig. 45 et Fig. 58).

***A. Les profils d'expression de Flamingo, Vangl-2 et Prickle semblent complémentaires au cours de la neurulation de la région troncale et postérieure de l'embryon d'oiseau***

La molécule de la polarité planaire, *Flamingo*, n'est exprimée que dans le système nerveux de la région antérieure au Nœud de Hensen au cours du développement embryonnaire

(Fig. 45) suggérant que cette molécule n'est pas nécessaire à la neurulation intermédiaire et secondaire. En effet, l'absence d'expression de Flamingo dans la région postérieure du Nœud de Hensen au stade HH8 suggère que cette molécule n'est pas impliquée dans la transition épithélium-mésenchyme des précurseurs neuraux du tube neural intermédiaire et secondaire (Fig. 45). Cependant, l'expression de Flamingo devient forte au niveau des bourrelets neuraux et de l'ensemble des cellules du tube neural néo-formé antérieur suggérant un rôle important dans le maintien de cette structure tubulaire (Fig. 45) (Formstone and Mason, 2005). L'expression de Vangl-2 est très dynamique au cours de la formation du tube neural intermédiaire et secondaire. Cette molécule de la polarité planaire est exprimée par l'ensemble des progéniteurs neuraux du sinus rhomboïdal (Fig. 45 et Fig. 58). L'expression de Vangl-2 augmente ensuite dans la région juste caudale au Nœud de Hensen au stade HH8 suggérant un rôle important de cette molécule lors de la TEM des progéniteurs neuraux, probablement dans la ségrégation cellulaire, puis Vangl-2 devient fortement exprimée au niveau des bourrelets neuraux, indiquant un probable rôle à la fois lors du phénomène de ré-épithélialisation puisque cette molécule reste exprimée par les progéniteurs neuraux après leur délamination au stade HH9 et également dans le maintien de la structure tubulaire du système nerveux central néo-structuré plus tardivement (Fig. 45 et Fig. 58). Enfin, la molécule de la polarité planaire Prickle est exprimée uniquement et fortement par les cellules de la région postérieure du Nœud de Hensen dès le stade HH8 et pendant l'ensemble des événements de la neurulation intermédiaire et secondaire (Fig. 45 et Fig. 58) (Cooper et al., 2008). Cette expression forte de Prickle par les progéniteurs neuraux situés dans la région du sinus rhomboïdal postérieure au Nœud de Hensen dès la phase de TEM au stade HH8 puis par les cellules du tube neural postérieur suggérant ainsi un rôle important de cette molécule dans la migration dirigée puis la ré-épithélialisation de ces cellules neurales mésenchymateuses (Fig. 45 et Fig. 58) fait de Prickle un des acteurs requis et nécessaire aux mouvements morphogénétiques liés à la neurulation intermédiaire et secondaire. L'ensemble de ces données semble montrer la mise en place d'une véritable expression colinéaire de ces molécules de la polarité planaire au cours de la neurulation intermédiaire et secondaire : Prickle est exprimé fortement lors de la Transition épithélium-mésenchyme des cellules neurales de la région caudale et médiane au Nœud de Hensen, lors de la migration de ces cellules neurales mésenchymateuses vers le pôle postérieur de l'embryon puis lors de la ré-épithélialisation de ces cellules, Vangl-2 est exprimé plus faiblement par les progéniteurs neuraux lors de la phase de TEM et de migration, enfin Vangl-2, Prickle et surtout Flamingo sont exprimés fortement par les cellules du tube neural néo-formé stabilisant ainsi la structure tubulaire.



**Figure 58** : Profil d'expression des principaux gènes impliqués lors de la neurulation de la région troncale et postérieure de l'embryon d'oiseau

Hybridation in situ de la région du sinus rhomboïdal d'embryons d'oiseau du stade HH8 (5 somites) au stade HH11 (14 somites) montrant l'expression des principaux acteurs impliqués lors de la formation du système nerveux central de la région thoracique et lombo-sacrée : des molécules d'adhérence (cadherine-6B et claudin-1), des acteurs de la TEM (Snail-2 et Net-1) et des molécules de la polarité planaire (Prickle et Vangl-2). L'expression du facteur de transcription Sox-2 nous montre la dynamique et la morphologie du système nerveux central. Immunohistochimie montrant l'expression de la fibronectine au cours de la neurulation intermédiaire et secondaire indiquant une régulation dynamique de la matrice extra-cellulaire au cours des mécanismes de TEM des précurseurs neuraux de la région caudale au Nœud de Hensen et de ré-épithélialisation des cellules neurales mésenchymateuses.

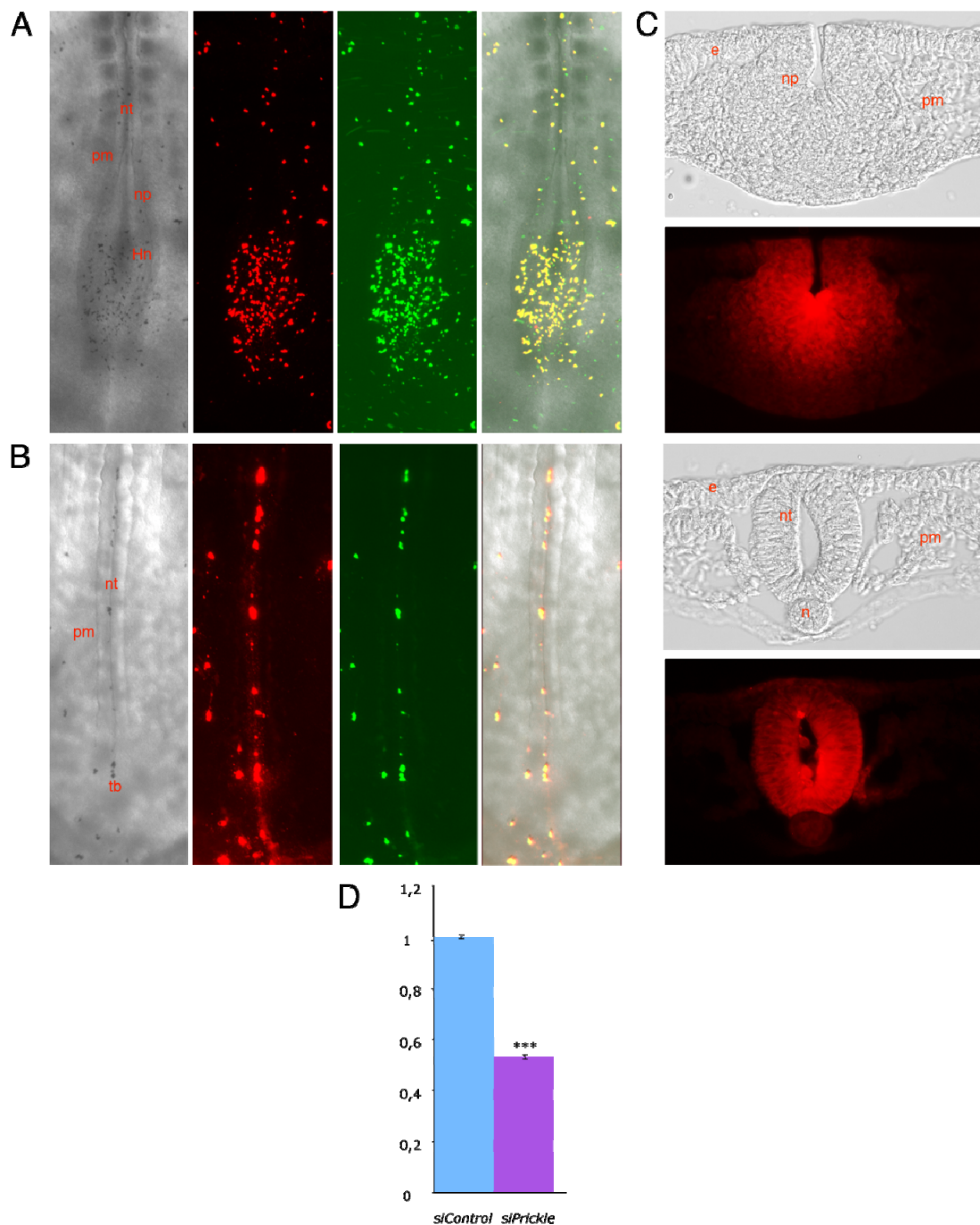
*B. L'expression dynamique de la fibronectine au cours de la neurulation intermédiaire et secondaire suggère une nécessaire régulation de la matrice extra-cellulaire pour la migration dirigée des cellules neurales mésenchymateuses vers la région postérieure de l'embryon*

En général, l'épiblaste forme un feuillet simple de cellules épithéliales reposant sur une matrice extra-cellulaire (MEC) continue. De manière très surprenante, nous avons observé dès le stade HH8 (5 à 8 somites) une zone dépourvue de MEC (observable par l'expression de la fibronectine) dans cette région postérieure et médiane au Nœud de Hensen (Fig. 58). De plus, la distance médio-latérale de cette région sans fibronectine est beaucoup plus grande que celle observée au niveau de la ligne primitive suggérant ainsi que les cellules du sinus rhomboïdal situées dans cette région sont différentes de celles de la région de la ligne primitive plus postérieure (Shimokita and Takahashi, 2011). Il apparaît ainsi que cette zone sans MEC corrélée avec l'absence d'expression de Net-1 (activateur de Rho-A et dont l'absence, nécessaire à la désorganisation des microtubules au niveau basale de la cellule conduisant à celle de la lame basale sous-jacente, permet la TEM) semble être un prérequis à la TEM des précurseurs neuraux au stade HH8 (5 à 8 somites) jusqu'au stade HH10 (10 somites) (Fig. 58) (Nakaya et al., 2008). De plus, plus l'élongation antéro-postérieur de l'embryon se fait, plus l'amplitude de cette zone sans MEC diminue jusqu'à quasiment disparaître lors de la fermeture du neuropore postérieur (Fig. 58) suggérant ainsi un rôle nécessaire de l'expression de la fibronectine pour la migration des cellules neurales mésenchymateuses vers le pôle postérieur de l'embryon. Le profil d'expression de la fibronectine suit également celui de la molécule de la polarité planaire, Prickle, suggérant ainsi des intrications entre les deux molécules (Fig. 58). En effet, l'expression forte de Prickle par les cellules situées caudalement au Nœud de Hensen est corrélée toujours avec la zone dépourvue de fibronectine (Fig. 58). De plus, un véritable gradient caudo-rostral d'expression de cette molécule de la polarité planaire suit la structuration de la matrice extra-cellulaire (Fig. 58). Ces données suggèrent ainsi que Prickle régule la mise en place de la matrice extra-cellulaire lors de la neurulation intermédiaire et secondaire.

## ***VI. La perte de fonction de Prickle conduit à un Spina Bifida du tube neural de la région thoracique, conséquence de défauts dans la migration dirigée et la ré-épithélialisation des cellules neurales mésenchymateuses***

Les travaux de Goto et collaborateurs ont montré un rôle crucial des molécules de la polarité planaire dans les mouvements d'extension et de convergence observés lors de la gastrulation d'amphibien : Xpk, l'orthologue chez l'amphibien de Prickle, est requis au dépôt polarisé de fibrilles de fibronectine nécessaire à la migration des cellules mésodermiques (Goto et al., 2005). Le profil d'expression de la molécule de polarité planaire Prickle dans la région du sinus rhomboïdal caudale au Nœud de Hensen suggère un rôle similaire de cette molécule lors de la migration dirigée vers le pôle postérieur de l'embryon d'oiseau ainsi que lors de la ré-épithélialisation des cellules neurales mésenchymateuses (Fig. 45 et Fig. 58). Afin de comprendre précisément la fonction de Prickle au cours de la neurulation intermédiaire et secondaire, nous avons réalisé des expériences de perturbations d'expression de ce gène par l'utilisation d'une technique non invasive et dont la rapidité d'action correspond à la cinétique des mouvements morphogénétiques observés lors de la neurulation intermédiaire et secondaire : la lipofection de SiRNA ciblant spécifiquement les ARNm codant pour Prickle (Fig. 59) (Escriou et al., 1998) (Bollerot et al., 2006). Les avantages de cette technique sont de permettre une transfection très précise et quasi instantanée des progéniteurs neuraux de la région du sinus rhomboïdal caudale au Nœud de Hensen d'embryons d'oiseau au stade HH8 (5 – 6 somites) dès contact des vecteurs lipidiques marquées à la rhodamine (Fig. 59 A et C), d'observer uniquement les conséquences morphologiques et cellulaires causées par l'extinction d'expression de la protéine d'intérêt sans biais imputés à d'éventuelles lésions de l'embryon faites lors de l'opération (Fig. 59 B et C), de suivre précisément au cours du temps le comportement des cellules transfectées (Fig. 59 C) et surtout d'obtenir un taux d'extinction optimal avec une diminution de 50 % des ARNm codant pour Prickle après lipofection (Fig. 59 D).

La perte d'expression de Prickle par les progéniteurs neuraux de la région caudale au Nœud de Hensen phénocopie complètement le *Spina Bifida* de la moelle spinale d'embryons humains (Fig. 57 ; Fig. 60 et Fig. 61) (Robinson et al., 2012). En effet, la perte de Prickle par

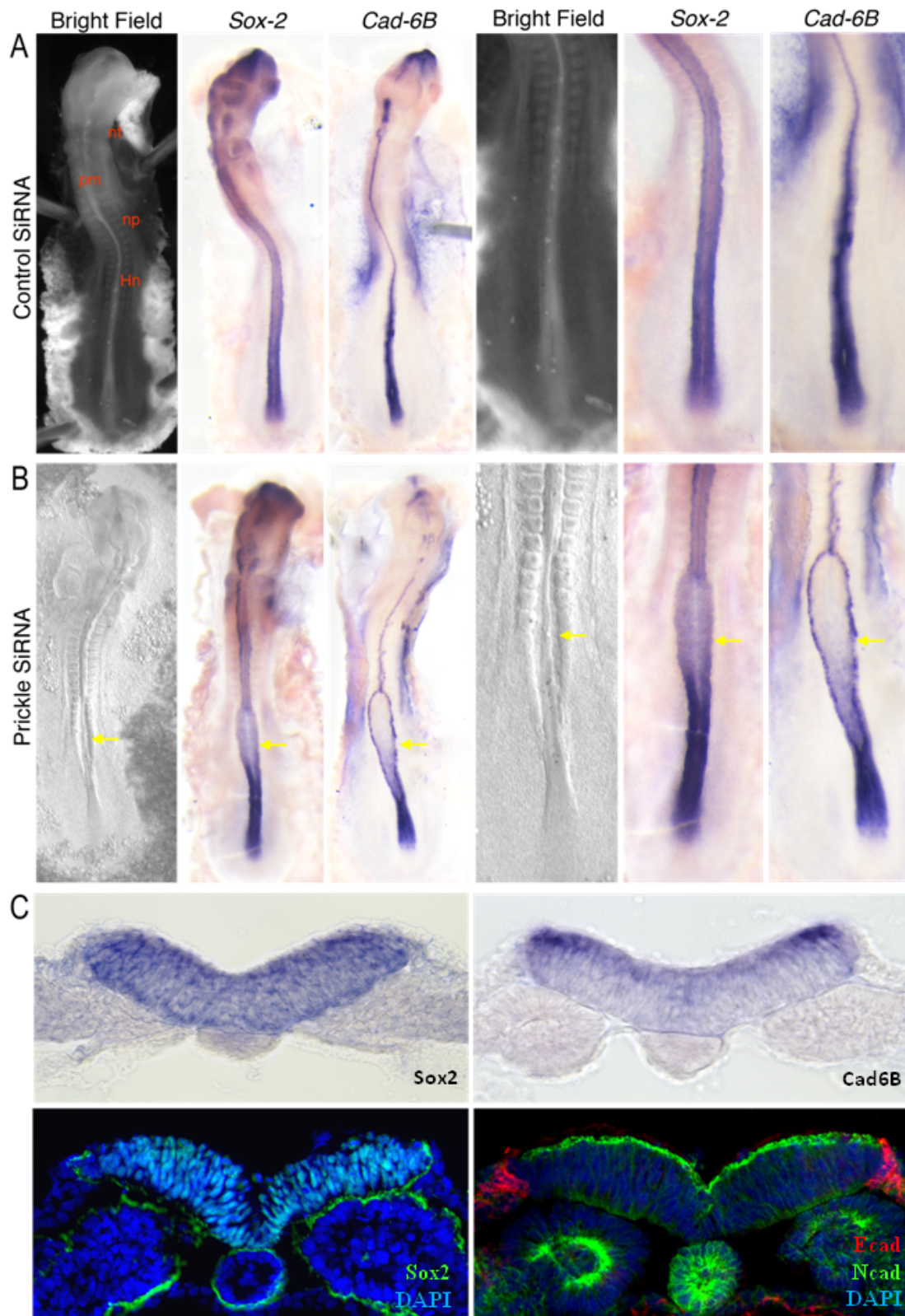


**Figure 59** : La technique de lipofection permet une transgénèse très ciblée et très rapide des cellules de la région du sinus rhomboïdal caudale au Nœud de Hensen sans traumatiser les tissus environnants

Une incision est réalisée dans l'enveloppe vitelline puis 5  $\mu$ l de vecteurs lipidiques marqués à la rhodamine contenant les SiRNA marqués eux-mêmes à la fluorescéine est injectés spécifiquement à la surface des cellules de la région du sinus rhomboïdal caudale et médiane au Nœud de Hensen d'embryons d'oiseau au stade HH8 (A), ces embryons sont ré-incubés puis sont prélevés 20H après (B) ; la région transfectée peut être aisément observée 20H après par l'expression fluorescente membranaire liée à aux lipides couplés à la rhodamine ; (D) : Une diminution de 50% des messagers codant pour Prickle est validée par RT-qPCR indiquant la spécificité des SiRNA utilisés lors de l'étude (n=3).

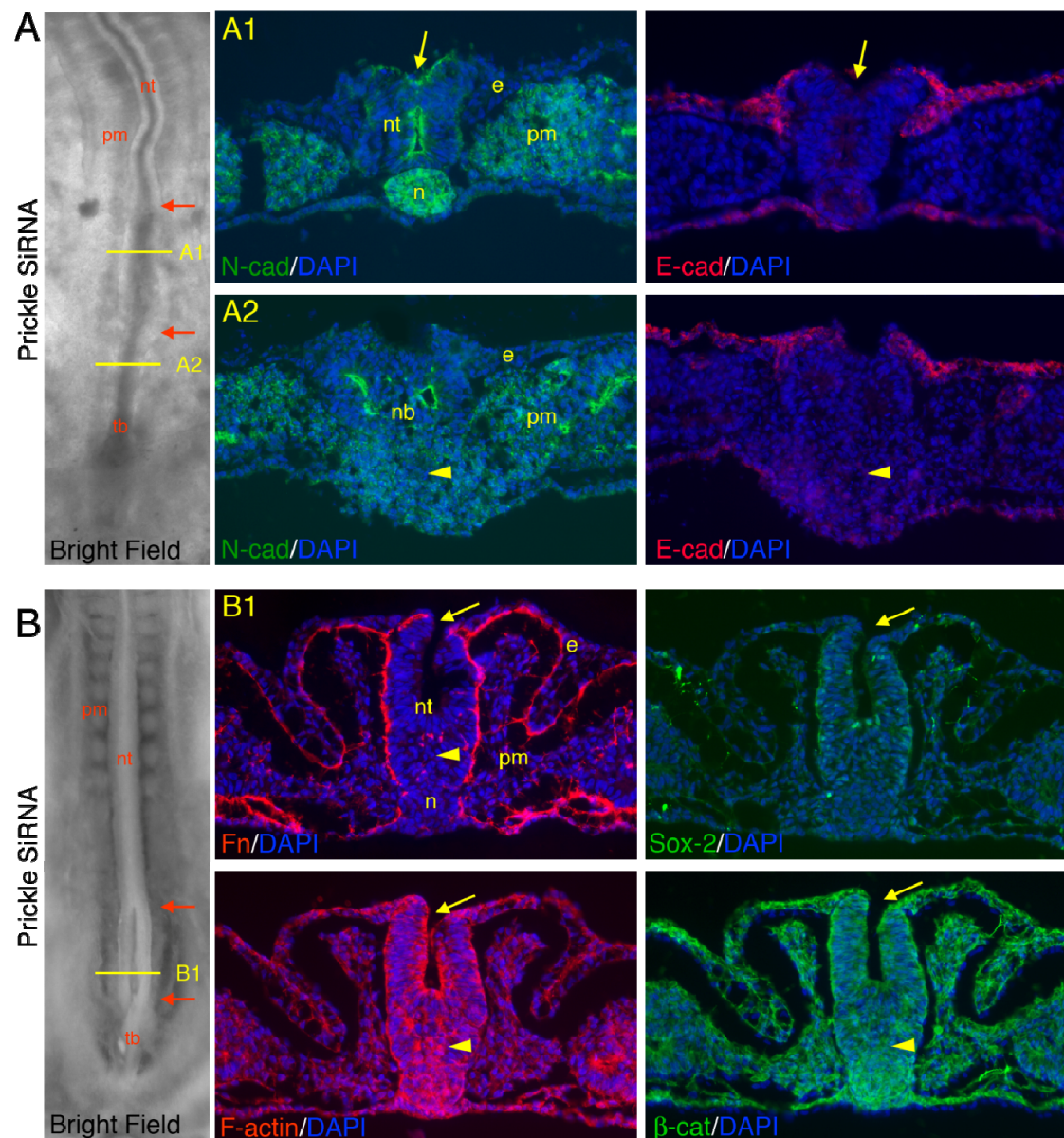
les cellules de cette région anatomique conduit à un tube neural de la région thoracique ouvert (Fig. 60 B et C) sans pour autant modifier le *patterning* de tissu neural (Fig. 60 C et Fig. 61). Cependant, la plaque neurale ouverte semble plus épaisse suggérant des défauts d'extension et de convergence des cellules neurales mais ce défaut morphologique peut également être interprété par les conséquences du retard dans la migration dirigée vers le pôle postérieur des cellules neurales mésenchymateuses et des défauts de ré-épithélialisation de celles-ci (Fig. 60 C). En effet, postérieurement à la région de la plaque neurale ouverte, le tube neural présente des défauts dans sa région ventrale indiquant des anomalies de ré-épithélialisation des cellules neurales mésenchymateuses (Fig. 61 B). De plus, cet amas de cellules neurales ventrales présente des travées de fibronectine indiquant un dépôt aléatoire de fibrilles et donc une altération dans la formation de la lame basale entourant le futur tube neural (Fig. 61 B). Plus postérieurement, le bourgeon caudal est très désorganisé et est constitué de cellules neurales non polarisées (Fig. 61 A2 fig. 62 B1). L'ensemble de ces données indiquent ainsi que la protéine de la polarité planaire, Prickle, est nécessaire tout d'abord au dépôt de fibrilles de fibronectine polarisées par les cellules neurales mésenchymateuses issues de la région caudale au Nœud de Hensen conduisant ainsi à leur migration dirigée vers la région postérieure de l'embryon puis Prickle est nécessaire à la mise en place d'une lame basale après la ré-épithélialisation de ces cellules afin de rigidifier structurellement le tube neural formé par neurulation intermédiaire et secondaire. Certaines Anomalies de fermeture du Tube Neural, telles que les *Spina Bifida* de la moelle spinale de la région thoracique (Fig. 57), seraient donc des conséquences de ces défauts de migration dirigée vers la région postérieure de l'embryon et de ré-épithélialisation de cellules mésenchymateuses neurales dont la régulation est contrôlée par la molécule de la polarité planaire, Prickle. De par ses très nombreuses similarités avec la neurulation humaine, cette étude décrypte pour la première fois le rôle et les fonctions d'une molécule de la polarité planaire, Prickle, dans la formation du système nerveux central et ainsi par analogie dans l'étiologie des Anomalies de fermeture du tube neural spinales décrites chez l'Homme que sont les *spina Bifida*.





**Figure 60** : *La perturbation d'expression de Prickle conduit à des formes sévères de Spina Bifida dans la région thoracique d'embryons d'oiseau*

Des lipofections SiRNA contrôle (A) (n=12) et SiRNA Prickle (B) (n=18) sont réalisées sur les cellules de la région du sinus rhomboïdal caudale et médiane au Nœud de Hensen d'embryons d'oiseau au stade HH8 puis les embryons sont prélevés et analysés 20H après opération.



**Figure 61** : *Prickle* régule la migration dirigée et la ré-épithélialisation des cellules neurales mésenchymateuses

Des lipofections siRNA Prickle (B) (n=18) sont réalisées sur les cellules de la région du sinus rhomboïdal caudale et médiane au Nœud de Hensen d'embryons d'oiseau au stade HH8 puis les embryons sont prélevés et analysés 20H après opération. Des immunohistochimie sur coupes sont réalisées et permettent d'étudier l'expression de la N-cadhérine (A1 et A2), de la E-cadhérine (B1 et B2) dans la région antérieure et postérieure du *spina bifida* ; celle de Sox-2, de la  $\beta$ -caténine, de l'organisation de la matrice extra-cellulaire (fibronectine) et du cytosquelette d'actine (F-actine) (B).

# **DISCUSSION**

## *Les différentes stratégies de formation du système nerveux central chez les vertébrés*

### *I. Chez l'oiseau*

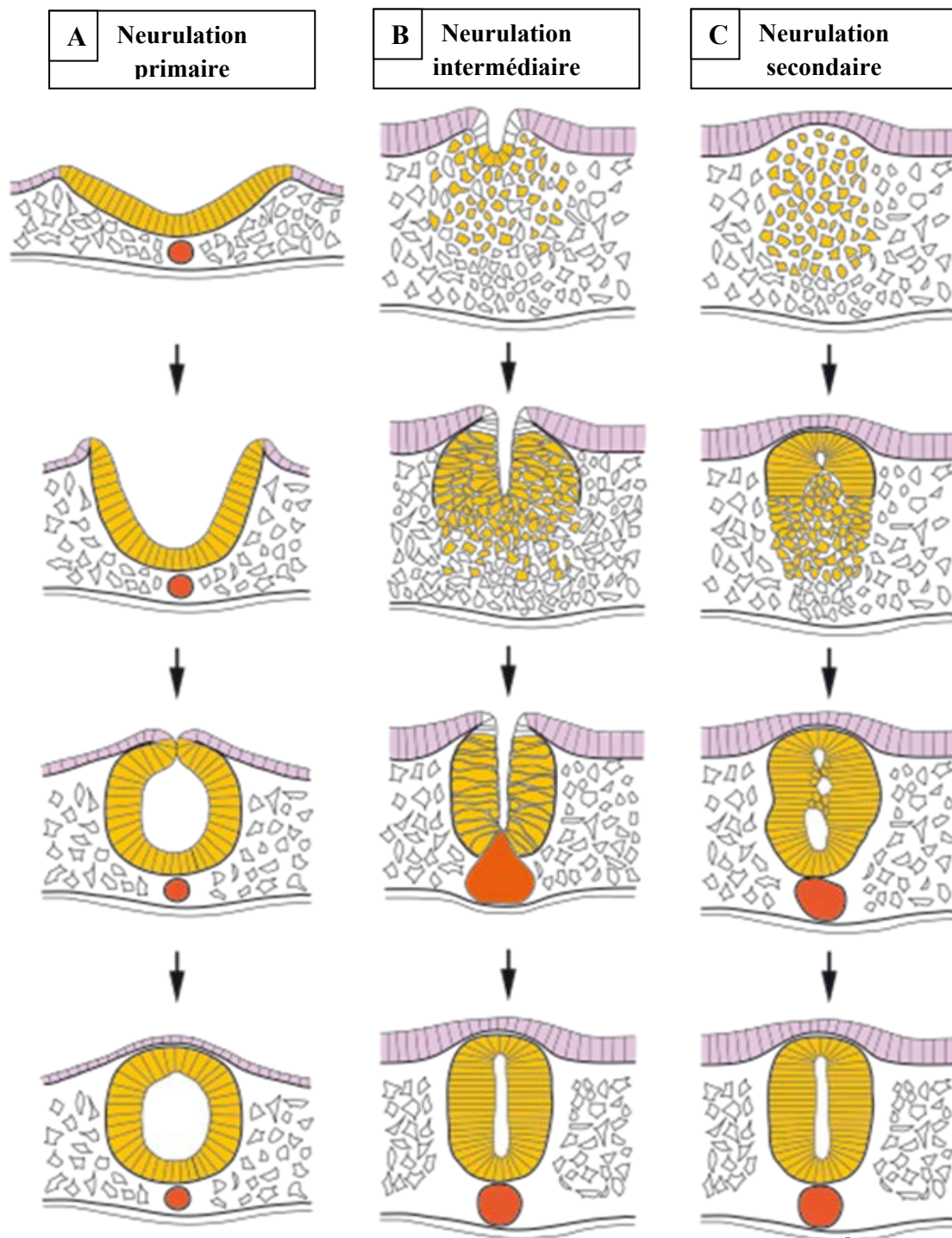
La neurulation peut être définie par l'ensemble des mouvements morphogénétiques conduisant à la formation du tube neural, organe précurseur du système nerveux central. Le tube neural des vertébrés se forme selon deux modes aux caractéristiques moléculaires et cellulaires bien distinctes :

- dans la région antérieure de l'embryon, futures régions encéphaliques et cervicales, a lieu la neurulation dite « primaire » caractérisée par un tube neural formé par l'enroulement d'une plaque neurale et la fusion dorso-médiane des bourrelets neuraux
- dans la région postérieure de l'embryon, future région lombo-sacrée, le tube neural se forme par une neurulation « secondaire » caractérisée par l'accrétion de cellules neurales mésenchymateuses conduisant à un tube dense dans lequel un phénomène de cavitation forme le tube neural (Colas and Schoenwolf, 2001). Contrairement à la neurulation primaire où neuroépithélium et ectoderme non-neural sont en continu, l'ectoderme de surface recouvre totalement le futur tube neural secondaire. Classiquement, lors du développement d'embryon d'oiseau, la neurulation secondaire débute lorsque le neuropore postérieur se ferme, c'est-à-dire au niveau de la paire du 27<sup>ème</sup> somite (Catala et al., 1995).

Nous avons mis en évidence lors de notre étude une zone de transition entre les régions antérieure et postérieure de l'embryon d'oiseau où le tube neural se forme selon un mode original que nous avons appelé « neurulation intermédiaire » (Figure 63). Contrairement à ce qui a été décrit depuis longtemps (depuis la fin des années 60 !?), cette zone de transition est loin d'être anecdotique et ne se limite pas qu'à 200  $\mu\text{m}$  (Criley, 1969) (Schoenwolf and Delongo, 1980) (Catala, 2002). En effet, la formation du tube neural de la future région thoracique de l'oiseau (vertèbres 20 à 27) comporte des caractéristiques à la fois de la neurulation primaire dorsalement avec la présence de bourrelets neuraux connectés à l'ectoderme de surface et d'une petite lumière centrale ainsi que des caractéristiques de la neurulation secondaire ventralement avec des phénomènes d'accrétion de cellules

mésenchymateuses neurales exprimant le facteur de transcription Sox-2 et de ré-épithélialisation de celles-ci (Figure 63). Ce nouveau mode de neurulation (ainsi que la neurulation secondaire) met en jeu des phénomènes moléculaires non décrits avec notamment une Transition Epithélium-Mésenchyme de cellules de la plaque neurale ayant lieu dans une fenêtre temporelle très précise puisqu'elle a lieu entre les stades HH8 (5 à 8 somites) et HH10 (10 somites) du développement embryonnaire, une nécessaire migration dirigée postérieurement de ces cellules mésenchymateuses neurales et un phénomène de ré-épithélialisation.

Ce mécanisme de délamination de cellules neurales a lieu postérieurement au nœud de Hensen dans une région très particulière de l'embryon d'oiseau appelée *sinus rhomboïdalis*. Cette structure anatomique transitoire a fait l'objet de nombreuses investigations depuis des décennies. En effet, cette région comporte l'ensemble des progéniteurs neuraux de l'intégralité du système nerveux thoraco-lombaire et sacrée (Catala et al., 1996; Shimokita and Takahashi, 2011). Les travaux des japonais Shimokita et Takahashi ainsi que notre étude montrent une zone postérieure au nœud de Hensen comportant les progéniteurs du tube neural postérieur mais surtout une région anatomique totalement dépourvue de matrice extracellulaire créant ainsi un environnement propice à une Transition Epithélium-Mésenchyme de ces cellules neurales de surface exprimant encore la E-cadhérine et très faiblement la N-cadhérine (Shimokita and Takahashi, 2011). L'acteur moléculaire probable de cette TEM semble encore être Snail-2/Slug. En effet, ce facteur de transcription présente un profil d'expression très dynamique : il est fortement exprimé spécifiquement par les cellules de cette région postérieure et médiane au nœud de Hensen au stade HH8 puis disparaît rapidement dès le stade HH9 suggérant un rôle dans la TEM des cellules neurales de surface. L'expression forte du facteur de transcription ZEB-2 en même temps que Net-1 (neuroepithelial-transforming-protein-1) par les cellules de cette même région anatomique dès le stade HH9-HH10 laisse supposer un rôle de ces molécules dans l'arrêt de la TEM des cellules neurales du futur système nerveux tronc et postérieur. En effet, l'étude réalisée par Nakaya et ses collaborateurs met en évidence de manière très élégante une nécessaire rupture de la lame basale avant tout mécanisme effectif de TEM lors de la gastrulation d'oiseau. La perte de Net-1 conduit à une répression d'activité de RhoA entraînant ainsi une déstabilisation des microtubules basaux, ce qui aura finalement pour conséquence la désorganisation de la lame basale sous-jacente favorisant ainsi la délamination des progéniteurs mésodermiques (Nakaya et al., 2008).



**Figure 63 : Les différentes stratégies de formation du tube neural d'oiseau**

Schémas des différents modes de neurulation observés chez l'oiseau. A : dans la région encéphalique et futures vertèbres cervicales a lieu la neurulation primaire caractérisée par l'enroulement d'une plaque neurale en continu avec l'ectoderme non neural; B : dans la région thoracique a lieu la neurulation intermédiaire caractérisée par la présence dorsalement de bourrelets neuraux et la formation de la région ventrale du tube neural par condensation de cellules mésenchymateuses neurales; C : dans la région lombo-sacrée a lieu la neurulation secondaire. Ségrégation entre tissu neural et tissu ectodermique. *En violet* : ectoderme de surface ; *en orange* : tissu neural ; *en rouge* : Nœud de Hensen et notochorde.

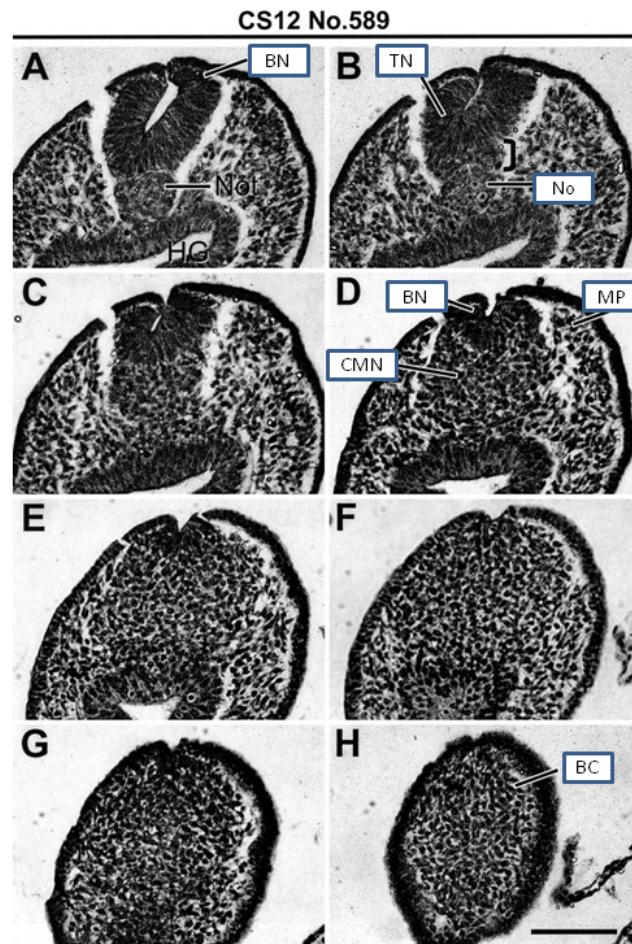
De nombreuses pathologies de fermeture du tube neural telles que les *spina bifida* ont permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans la neurulation humaine (Greene and Copp, 2009). Ainsi, des mutations des gènes codant pour les protéines de la polarité planaire *Fmi*, *Vangl-2* et *Prk* ont été mises en évidence dans ces maladies (Greene and Copp, 2009) (Wu et al., 2011). Cependant, malgré des études sur les mutations du gène *vangl-2* réalisées chez la souris et le poisson-zèbre, nous ne connaissons pas précisément la fonction de ces protéines de la polarité planaire lors des mécanismes de formation du système nerveux central (Kibar et al., 2001) (Murdoch et al., 2001) (Jessen et al., 2002) (Ciruna et al., 2006). Les gènes *Fmi*, *Vangl-2* et *Prk* sont exprimés par les cellules du *sinus rhomboïdal* au stade 5/6 somites (HH8) selon des profils bien particuliers : *Fmi* est exprimé par l'ensemble des cellules de la plaque neurale rostrale au nœud de Hensen ; *Vang-2* est exprimé non seulement par l'ensemble des cellules neurales mais également par les cellules de l'ectoderme de surface non-neural ; *Prk* est très fortement exprimé par les cellules neurales caudales au nœud de Hensen. Au cours de la formation du tube neural « intermédiaire » et « secondaire », une véritable colinéarité d'expression de ces gènes de la polarité planaire est observée suggérant un rôle bien défini de ces molécules dans ces processus morphogénétiques. En effet, la protéine *Fmi* serait impliquée dans la phase de maintien structurel d'un tube neural déjà formé, la protéine *Vangl-2* dans la ségrégation cellulaire et tissulaire entre cellules neurales mésenchymateuses et mésodermiques puis la mise en place de contraintes spatiales favorisant le maintien de cette structure tubulaire et enfin la protéine *Prk* est impliqué dans la phase de migration dirigé postérieurement et de ré-épithélialisation de cellules mésenchymateuses neurales. Les travaux de Goto et al. ont mis en évidence un rôle déterminant de *Prk* (uniquement cette dernière molécule de la polarité planaire) lors de la gastrulation d'amphibien : la protéine *Prk* contrôle le dépôt de fibrilles de fibronectine orientées ou polarisées permettant une migration dirigée des cellules mésodermiques (Goto et al., 2005). **En effet, la perte de cette protéine impliquée dans la polarité planaire entraîne un retard dans la migration des cellules mésenchymateuses neurales ventrales vers la région postérieure de l'embryon sans toutefois altérer la région dorsale du tube neural conduisant ainsi à des formes sévères de *spina bifida* dans la région thoracique.** La protéine *Prk* semble donc être un acteur moléculaire majeur de cette neurulation « intermédiaire » expliquant pourquoi des mutations du gène codant pour cette protéine de la polarité planaire conduit à des pathologies de fermeture du tube neural lors du développement humain !

La phase de ré-épithélialisation des cellules mésenchymateuses neurales met en jeu une combinaison complexe de molécules d'adhérence. Comment distinguer les cellules mésenchymateuses neurales des cellules mésodermiques exprimant toutes la N-cadhérine ! Après délamination des cellules neurales, se met en place une véritable ségrégation cellulaire orchestrée par un répertoire spécifique de molécules d'adhérence : **les cellules mésenchymateuses neurales expriment non-seulement la N-cadhérine mais également la Cadhérine-6B et une molécule des jonctions serrées, la Claudine-1.** L'expression de cette dernière molécule d'adhérence est très dynamique au cours de la formation du tube neural « intermédiaire » et « secondaire ». En effet, elle disparaît rapidement après formation et structuration du tube neural suggérant ainsi un rôle très précoce de la claudine-1 uniquement dans le phénomène de ré-épithélialisation. La protéine Prk jouerait également un rôle important dans ce phénomène en mettant en place la lame basale entourant progressivement le tube neural selon un axe dorso-ventral.

## *II. Chez l'Homme*

Lors du développement humain, les deux modes de neurulation ont été très bien décrits dans la littérature mais la question d'une zone de transition n'a jamais été vraiment étudiée pour des raisons évidentes d'obtention d'embryons... au bon stade de développement (il est effectivement plus facile d'aller chercher des œufs au poulailler !) (O'Rahilly and Muller, 1994) (Nakatsu et al., 2000; O'Rahilly and Muller, 2002; Pytel et al., 2007; Saitsu et al., 2004) (Saitsu and Shiota, 2008). Néanmoins certaines études histologiques sur le développement précoce laissent supposer qu'une neurulation intermédiaire similaire à celle observée chez l'embryon d'oiseau existe aussi chez l'Homme (Figure 64) (Saitsu et al., 2004) (Saitsu and Shiota, 2008). De plus, le développement précoce humain a lieu selon des modalités spatiales similaires au développement d'oiseau suggérant des mouvements morphogénétiques proches voire identiques lors de la formation du système nerveux central. **En effet, lors des phases précoces du développement, les embryons humains et aviaires sont plans.** La formation du tube neural nécessite ainsi des forces mécaniques engendrées non seulement par le tissu neural lui-même mais également celles créées par l'ectoderme de surface. Une étude récente de Varner VD et al. a mis en évidence la nécessité de forces engendrées par l'ectoderme de surface lors du soulèvement de la plaque neurale et de la formation définitive du tube neural encéphalique d'embryon d'oiseau (Varner et al., 2010). Bien évidemment cette dernière étude rappelle les travaux réalisés par Davidson et al. mettant en évidence un





**Figure 64 :** *Formation du tube neural intermédiaire lors du développement humain*

Coupes histologiques d'embryon humain au stade CS12 (8 semaines d'aménorrhées) observées selon l'axe antéro-postérieur (A-H). A : les bourrelets neuraux n'ont pas encore fusionnés, tube neural juste rostral au Nœud ; B : coupe histologique juste caudal au Nœud avec une notochorde pas encore condensée mais un tube neural déjà bien structuré ; C-D-E-F : **neurulation intermédiaire** : séquence de condensation de cellules mésenchymateuses neurales ventralement et formation d'une lumière centrale selon un axe dorso-ventral à partir de bourrelets dorsaux ; G-H : région la plus postérieure du bourgeon caudal. (d'après Hiroto Saito et al.2004)

phénomène d'extension et de convergence des cellules de l'ectoderme de surface lors de la neurulation d'embryons d'amphibien (Davidson and Keller, 1999) (Wallingford and Harland, 2002). Cependant, bien que les mécanismes cellulaires semblent similaires chez les deux espèces, la transmission des forces générées est, elle, complètement différente du fait de la configuration spatiale initiale de l'embryon. En effet, l'embryon d'amphibien est sphérique contrairement à l'embryon humain ou d'oiseau. De plus, cette nécessité du mécanisme d'extension et de convergence n'a été décrite uniquement que dans le soulèvement et la fusion des bourrelets neuraux ayant lieu lors de la neurulation primaire, c'est-à-dire dans la région

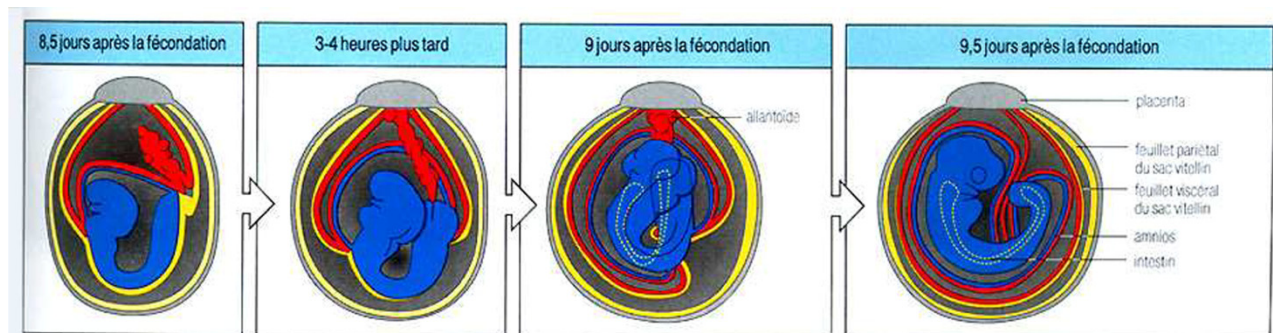
antérieure de l'embryon ! Qu'en est-il dans la région postérieure ? Comment comprendre précisément les mécanismes de malformation du système nerveux humain sans modèle animal qui reproduise autant que faire se peut les mêmes mouvements morphogénétiques selon l'axe antéro-postérieur à partir d'une configuration spatiale initiale de l'embryon identique ? Il apparaît ainsi que l'utilisation du modèle oiseau dans l'étude des mouvements morphogénétiques observés lors de la formation du système nerveux central humain est certainement plus pertinente que l'emploi du modèle murin !

### III. *Chez la souris*

Comme l'ensemble des modèles vertébrés amniotes étudiés, la formation du tube neural murin se fait selon deux modes, une neurulation primaire antérieure et une neurulation secondaire postérieure (Schoenwolf, 1984; Schoenwolf and Franks, 1984) (Copp et al., 2003) (Copp and Greene, 2010). Cependant, la neurulation secondaire chez l'embryon de souris diffère de celle observée chez l'embryon d'oiseau. Tout d'abord, au niveau anatomique, la neurulation secondaire chez la souris ne concerne uniquement que la queue de l'animal (Shum et al., 2010). L'intégralité du système nerveux central « vital » de la souris se forme par un mode de neurulation primaire contrairement à l'oiseau. En effet, le tube neural secondaire de l'embryon aviaire, et probablement de l'embryon humain, est à l'origine de la moelle épinière de la région lombo-sacrée. Ensuite au niveau cellulaire, il n'a été observé aucune cellule neurale mésenchymateuse ventrale malgré la présence d'un phénomène de cavitation (Schoenwolf, 1984; Schoenwolf and Franks, 1984). De plus, la formation du système nerveux central d'embryon murin nécessite un changement radical dans la morphologie globale de l'embryon. En effet, l'embryon murin connaît une véritable réversion dorso-ventrale entre les stades E8.5 et E9 (Greene and Copp, 2009) (Copp and Greene, 2010). A 8,5 jours de développement, l'embryon de souris, de forme conique, ressemble à un « écureuil » présentant sa face ventrale vers l'extérieur puis l'embryon prend une configuration « classique » à 9 jours de développement présentant cette fois sa région dorsale vers l'extérieur (Figure 65). Cette transformation anatomique majeure dénote ainsi de mécanismes morphogénétiques très différents entre la souris, l'oiseau et l'Homme. Malgré le fait d'être un outil génétique fantastique, le modèle murin apporte des explications restreintes sur la fonction des différents gènes mutés lors des études de modélisation de pathologies de fermeture du tube neural humain. Les souris *loop-tail* (souris mutées *vangl2*<sup>-/-</sup>) ou mutées pour le gène *Celsr1* (souris *celsr1*<sup>-/-</sup>) présentent des défauts de fermeture du tube neural, mais il s'agirait plutôt de conséquences de perturbations de l'extension et de la convergence du

tissu ectodermique de surface (Murdoch et al., 2001) (Robinson et al., 2012). De plus, il s'agit encore une fois de défauts de formation du tube neural primaire et très peu de modèles génétiques murins ne conduisent exclusivement à des défauts de formation du tube neural secondaire ! Cependant, le phénotype intéressant des souris mutées décrites ci-dessus serait la forme de la queue en « tire-bouchon », ces phénotypes suggèrent ainsi des défauts de formation du tube neural secondaire ! Il est certes très important de reproduire en laboratoire des phénotypes de pathologies humaines mais il serait nécessaire de faire des études sur des modèles animaux se rapprochant au maximum au développement humain comme l'oiseau et d'autant plus dans un contexte d'étude de mouvements morphogénétiques complexes observés lors de la neurulation. Confirmer chez la souris l'effet d'une mutation décrite chez l'Homme dénote tout de même d'une certaine conservation des acteurs moléculaires impliqués dans ces mécanismes morphogénétiques mais n'est pas suffisant pour comprendre précisément comment sont régulés ces mouvements tissulaires complexes.

Ainsi, le contexte génétique est certes important mais la configuration spatiale de l'embryon l'est tout autant pour comprendre précisément les mouvements morphogénétiques impliqués lors de la formation de l'ensemble du système nerveux central humain.



**Figure 65 :** *La neurulation murine nécessite un changement conformationnel brutal de l'ensemble de l'embryon*

Entre 8.5 jours et 9.5 jours de développement, l'embryon de souris change complètement de conformation tridimensionnelle. A 8.5 jours, l'embryon murin présente sa face ventrale vers « l'extérieur » tandis qu'à 9.5 jours, l'embryon reprend une configuration plus classique reprenant un axe dorso-ventral plus dogmatique : face ventral vers « l'intérieur » et face dorsale tournée vers « l'extérieur ». (<http://webs.unice.fr/site/pierson/>)

#### *IV. Chez les anamniotes*

La formation du système nerveux central chez l'amphibien et le poisson-zèbre rappelle la neurulation primaire décrite lors du développement embryonnaire des amniotes (voilà pourquoi on assimile le plus souvent la neurulation primaire à LA neurulation).

En effet, au niveau morphologique, la neurulation d'amphibien implique la formation d'une plaque neurale qui s'enroule avec fusion des bourrelets neuraux dans la région dorso-médiane (Schroeder, 1970) (Jacobson and Gordon, 1976) (Keller et al., 1992b). Cependant, contrairement à une neurulation primaire observée chez les amniotes, la plaque neurale d'embryon d'amphibien est constituée de deux assises cellulaires : une couche superficielle et une couche profonde de cellules neurales (Jacobson and Gordon, 1976). De plus, la formation du tube neural met en jeu des mécanismes d'extension et de convergence non-seulement de cellules de l'ectoderme de surface mais également des cellules neurales elles-mêmes ainsi que des phénomènes d'intercalation radiaire des cellules de la couche profonde de la plaque neurale (Elul et al., 1997) (Davidson and Keller, 1999) (Wallingford and Harland, 2002). Ces mouvements cellulaires coordonnés et dirigés mettent en jeu les protéines de la polarité planaire (Keller et al., 2000) (Zohn et al., 2003). Enfin, aucune neurulation secondaire n'a été décrite chez l'amphibien suggérant une formation strictement identique du système nerveux central selon l'axe antéro-postérieur.

La neurulation du poisson-zèbre est plus complexe. En effet, dans la région du cerveau moyen uniquement, le tube neural se forme à partir de l'enroulement d'une plaque neurale impliquant ainsi des mouvements morphogénétiques caractéristiques d'une neurulation primaire (Lowery and Sive, 2004). Cependant la formation du tube neural des autres régions anatomiques rappelle sensiblement la neurulation d'amphibien (Papan and Campos-Ortega, 1999) (Kimmel et al., 1995) (Geldmacher-Voss et al., 2003) (Handrigan, 2003). En effet, la grande majorité du système nerveux central téléostéen ne se forme pas à partir d'une plaque neurale « classique » qui s'enroule pour former une gouttière neurale et enfin un tube par fusion des bourrelets neuraux mais d'une « quille » neurale dont les cellules formant deux assises vont converger médianement puis des phénomènes d'intercalation radiaire vont finalement conduire à la formation d'un cordon neural (rappelant le bourgeon caudal) (Hong and Brewster, 2006). La formation de la lumière centrale ne se fait pas par cavitation contrairement au phénomène décrit lors de la neurulation secondaire d'oiseau mais par une division symétrique en miroir selon l'axe dorso-ventral des cellules neurales mettant en jeu la

protéine Par-3 (Tawk et al., 2007). De plus, le tube neural téléostéen se forme selon ces mêmes modalités morphologiques jusque dans la région la plus postérieure de l'embryon indiquant ainsi qu'il n'y a pas non plus d'équivalent chez le poisson-zèbre d'autres formes de neurulation (Harrington et al., 2009).

Au niveau cellulaire, il apparaît ainsi qu'à la fois chez l'amphibien et le poisson téléostéen, les cellules neuroépithéliales adoptent très rapidement des caractéristiques et des comportements de cellules mésenchymateuses contrairement aux cellules neurales des amniotes qui gardent très longtemps leurs caractéristiques épithéliales. En effet, lors de la neurulation primaire des amniotes, la plaque neurale organisée en épithélium simple composé de cellules cuboïdes puis prismatiques comportant des jonctions adhérentes et serrées va s'enrouler conduisant à la formation d'un tube neural organisé en épithélium pseudo-stratifié composé de cellules allongées filiformes toujours polarisées. Ces caractéristiques mésenchymateuses acquises précocement des cellules neurales d'amphibien et de poisson-zèbre s'observe par des mécanismes de migration cellulaire orientée médialement, la faculté des cellules des couches superficielles et profondes à s'intercaler de manière radiaire et surtout par l'absence de jonctions serrées. Malgré ces propriétés mésenchymateuses, les cellules neurales des anamniotes semblent également comporter quelques caractéristiques épithéliales : la couche cellulaire superficielle de la « plaque neurale » téléostéenne repose sur une lame basale (Papan and Campos-Ortega, 1999) et les cellules neurales de la couche superficielle de la plaque neurale d'amphibien subissent des constriction apicales (Haigo et al., 2003; Wallingford, 2005). De plus, plus la formation du système nerveux central progresse plus ces cellules acquièrent des caractéristiques épithéliales avec notamment la mise en place d'une polarité apico-basale indiquant ainsi un mécanisme de Transition Mésenchyme-Epithélium (Geldmacher-Voss et al., 2003) (Hong and Brewster, 2006). Alors qu'au niveau tissulaire, la formation du système nerveux central des anamniotes s'apparente à la neurulation primaire, les mécanismes cellulaires de formation du tube neural se rapprocheraient plutôt de ceux impliqués lors de la neurulation secondaire des amniotes.

#### ***V. Neurulation et contraintes spatiales***

Alors que la formation du système nerveux central de tous les amniotes met en jeu à la fois une neurulation primaire dans la région antérieure et une neurulation secondaire dans la région postérieure de l'embryon, une neurulation intermédiaire a lieu lors de la neurogenèse précoce d'oiseau et probablement d'humain faisant la transition entre neurulation primaire et

secondaire (tandis qu'elle n'est pas observée lors du développement murin). La formation du tube neural des vertébrés anamniotes tels que l'amphibien ou le poisson téléostéen ne correspondrait à aucun mode de neurulation décrit. Alors qu'au niveau tissulaire, il semble que le système nerveux central des anamniotes se mette en place selon un mode de neurulation apparenté à la neurulation primaire ; au niveau cellulaire, l'observation de cellules neurales aux caractéristiques mésenchymateuses lors des phases précoces du processus puis l'acquisition plus tardive de propriétés épithéliales suggère plutôt le mécanisme de TME observé lors de la neurulation secondaire. Contrairement au modèle classique décrit chez les amniotes, il semblerait ainsi que les anamniotes ne connaissent qu'une neurulation secondaire.

Mais pourquoi existe-t-il une telle diversité morphologique dans la formation du système nerveux central chez les vertébrés ?

Il n'y a évidemment pas une réponse simple et claire à cette question mais seulement des spéculations. L'hypothèse la plus plausible reposerait sur la configuration tridimensionnelle de l'embryon de vertébrés. Tout d'abord, faisons un peu d'origami, la neurulation primaire engendre la formation d'un tube neural à partir d'une plaque. Il se crée ainsi une structure tridimensionnelle - le tube neural - à partir d'une plaque en deux dimensions. Il semble ainsi que la neurulation primaire soit assujettie à la caractéristique plane de l'embryon. C'est le cas pour l'embryon humain, d'oiseau et dans une certaine mesure pour l'embryon murin (O'Rahilly and Muller, 1994) (O'Rahilly and Muller, 2002) (Nakatsu et al., 2000) (Saito et al., 2004) (Saito and Shiota, 2008) (Pytel et al., 2007) (Colas and Schoenwolf, 2001) (Schoenwolf, 1984; Schoenwolf and Franks, 1984) (Copp et al., 2003) (Greene and Copp, 2009). De plus, gardons en mémoire que la neurulation secondaire a lieu dans la région postérieure de l'embryon de vertébrés, dans une région cylindrique appelée le bourgeon caudal (Criley, 1969) (Catala et al., 1995; Colas and Schoenwolf, 2001). **L'embryon passe ainsi d'une configuration bidimensionnelle à une organisation tridimensionnelle de manière très progressive au cours du développement de l'Homme et de l'oiseau. Le programme de développement de ces espèces nécessite ainsi une transition entre configuration 2D/3D nécessitant des contraintes mécaniques particulières !** De plus, cette configuration plane peut également expliquer la fermeture du tube neural non pas en fermeture éclair mais de manière très progressive selon l'axe antéro-postérieur malgré un point initial de fusion des bourrelets bien précis (Copp et al., 1990) (Van Straaten et al., 1996). En effet, elle met jeu des forces générées par les mouvements d'extension et de convergence de l'ectoderme de surface.

La neurulation chez l'embryon de souris est atypique. Tout d'abord, l'embryon murin est conique puis va connaître un changement brutal de morphologie entre E8,5 et E9 suggérant que la neurulation primaire dogmatique n'a réellement lieu uniquement avant cette réversion (Copp et al., 2003) (Greene and Copp, 2009). De plus, il apparaît que la fermeture du tube neural murin nécessite ce changement brutal de configuration spatiale. **L'absence de neurulation intermédiaire chez la souris dénote ainsi de la rapidité voire de la brutalité du passage 2D vers 3D de l'embryon.**

**Les embryons anamniotes sont originellement sphériques donc comportent déjà une configuration 3D.** Cet état initial 3D va ainsi engendrer des contraintes mécaniques se rapprochant de celles subies par les cellules neurales mésenchymateuses du bourgeon caudal. Ces contraintes spatiales expliquent probablement pourquoi la neurulation des anamniotes se fait de manière similaire selon l'axe antéro-postérieur de l'embryon sans aucune transition quelconque et pourquoi ces caractéristiques si spécifiques décrites lors de la formation du système nerveux central d'amphibien et de poisson téléostéen sont plus proches de la neurulation secondaire observé chez les amniotes (Harrington et al., 2009).

## ***Mais en fin de compte comment se met en place l'axe dorso-ventral du tube neural ?***

Après sa fermeture, le tube neural est séparé en plusieurs régions : le plancher ou *floor plate* est immédiatement dorsal par rapport à la notochorde, le toit ou *roof plate* est opposé au plancher, les murs du tube neural sont séparés en plaque alaire (dorsale) et plaque basale (ventrale). La cavité centrale délimitée par le tube neural forme le canal central ou neurocoèle (qui préfigure le système ventriculaire du système nerveux central).

La polarisation médio-latérale de la plaque neurale est un préalable à la polarisation ventro-dorsale du tube neural. Ainsi, les régions médianes de la plaque formeront les futures régions ventrales alors que les régions latérales donneront naissance aux régions dorsales du fait des mouvements de neurulation (Le Douarin et al., 1998) (Colas and Schoenwolf, 2001). L'origine de la polarisation du tube neural est ainsi à rechercher au stade plaque neurale. Le tube neural est soumis à deux influences : une influence ventralisante par les tissus axiaux que sont la notochorde et le plancher du tube neural. Ces tissus, lorsqu'ils sont greffés latéralement par rapport au tube neural, peuvent ventraliser ce dernier (van Straaten et al., 1988). Par ailleurs, le tube neural est aussi soumis à une influence dorsalisante générée par l'ectoderme de surface (Liem et al., 1995) (Liem et al., 1997).

D'un point de vue moléculaire, il est probable que tous les facteurs ne sont pas connus. Aussi, les schémas présentés dans les livres sont sans doute simplistes mais ils ont l'avantage d'être plus compréhensibles. Une des molécules importantes dans le processus de ventralisation est la protéine sécrétée Sonic Hedgehog (shh). Cette protéine agit sur Patched, récepteur à douze domaines transmembranaires. Patched à l'état basal inhibe la protéine membranaire Smoothened. La liaison de Sonic Hedgehog à son récepteur Patched inhibe l'action de ce dernier et libère ainsi Smoothened qui peut alors agir au niveau cytoplasmique sur des protéines de la famille des facteurs de transcription Gli (Matise and Wang, 2011).

Sonic Hedgehog est sécrété par la notochorde puis le plancher du tube neural et diffuse dans le neurocoèle formant ainsi un gradient de concentration ventro-dorsal. Ce gradient génère des domaines dans le tube neural qui préfigurent les domaines neuronaux qui se développeront selon l'axe ventro-dorsal (Balaskas et al., 2012).



L'ectoderme de surface sécrète des molécules de la famille des BMP (dont BMP-4 et BMP-7) (Figure 66) (Liem et al., 1995) (Liem et al., 1997). Ces facteurs diffusent et agissent sur des récepteurs membranaires de la famille des récepteurs à activité sérine-thréonine kinase exprimés par les cellules du tube neural. L'action de ces facteurs est de dorsaliser les cellules du tube neural : BMP-4 est impliqué entre autre dans l'induction des cellules de crête neurale (Selleck and Bronner-Fraser, 1995) (Betancur et al., 2010) et BMP-7 est requis à la mise en place de trois sous-populations d'interneurones de la région dorsale, dI1-dI3-dI5 (Le Dreau et al., 2012). Il faut noter que les organes axiaux sécrètent aussi des inhibiteurs des BMP tel que Chordine (Sasai et al., 1994) (Streit et al., 1998). Ainsi, le système moléculaire rendant compte de l'établissement de l'axe ventro-dorsal peut être parfaitement régulé. **Alors que la formation du plancher du tube neural - et ainsi l'origine du tissu-source de Sonic Hedgehog - a été l'objet de nombreuses et élégantes investigations, la formation du toit (et ainsi l'origine de la source de BMP) n'est encore à ce jour pas très bien comprise.**

### ***I. Formation du plancher du tube neural et origine du signal ventralisant Shh***

Lors du développement précoce d'embryon d'oiseau, à 24 heures de développement, au stade ligne primitive (HH4), les cellules présomptives de la notochorde sont situées dans le centre organisateur, le Nœud de Hensen (NH) (Pasteels, 1937) (Spratt, 1946) (Nicolet, 1971) (Rosenquist, 1983) (Selleck and Stern, 1991) (Schoenwolf, 1992). Cependant, très peu d'études se sont intéressées aux mécanismes impliquées lors de l'élongation de la notochorde. En utilisant des particules de carbone comme marqueurs, les travaux de Spratt suggèrent que les cellules de la ligne primitive situées caudalement au nœud de Hensen contribuent à la formation et à l'élongation de cette structure mésodermique axiale (Spratt and Condon, 1947). De manière similaire, Sausedo et Schoenwolf ont conclu, en étudiant la gastrulation sur des embryons murins et d'oiseau en culture, que l'extension de la notochorde requiert à la fois un phénomène d'accrétion de cellules situées caudalement mais également des réarrangements et une prolifération de cellules notochordales elles-mêmes (Sausedo and Schoenwolf, 1993) (Sausedo and Schoenwolf, 1994). Ces études montrent ainsi que la formation de la notochorde nécessite le recrutement de cellules qui ne sont pas initialement issues du nœud de Hensen mais plutôt situées plus postérieurement. Afin de comprendre précisément les mécanismes morphogénétiques impliquées dans la formation de la notochorde, Martin Catala et ses collaborateurs ont réalisé des expériences de greffes isotopiques et isochroniques *in ovo* de Nœud de Hensen et de tissus avoisinants d'embryons de caille donneurs sur des embryons de poulet receveurs (Catala et al., 1996). Les opérations

ont lieu sur des embryons au stade 5-6 somites et les chimères caille-poule ainsi générées vont ensuite se développer jusqu'à 9 jours. A ce stade, le Nœud de Hensen se situe au niveau du futur niveau brachial de l'embryon d'oiseau supposant ainsi que les structures axiales (notochorde, tube neural et mésoderme paraxial) sont déjà mises en place dans les régions antérieures céphalique et cervicale. Les embryons opérés présentent dans une région anatomique allant de la zone greffée jusqu'à la région la plus postérieure du futur pygostyle un plancher du tube neural ainsi qu'une notochorde composés de cellules issues du greffon de caille.

De plus, dans ces conditions expérimentales, les auteurs n'ont pas observé de modifications morphologiques marquant une transition franche et nette entre tube neural issu d'une neurulation primaire et secondaire suggérant ainsi une continuité dans ces mouvements morphogénétiques. Des embryons opérés et observés plus tardivement au stade 25 somites présentent des cellules du donneur-caille composant la Charnière Chordo-Neurale située dans la région ventro-rostrale du bourgeon caudale (siège des précurseurs de la notochorde la plus caudale) (Catala et al., 1995).

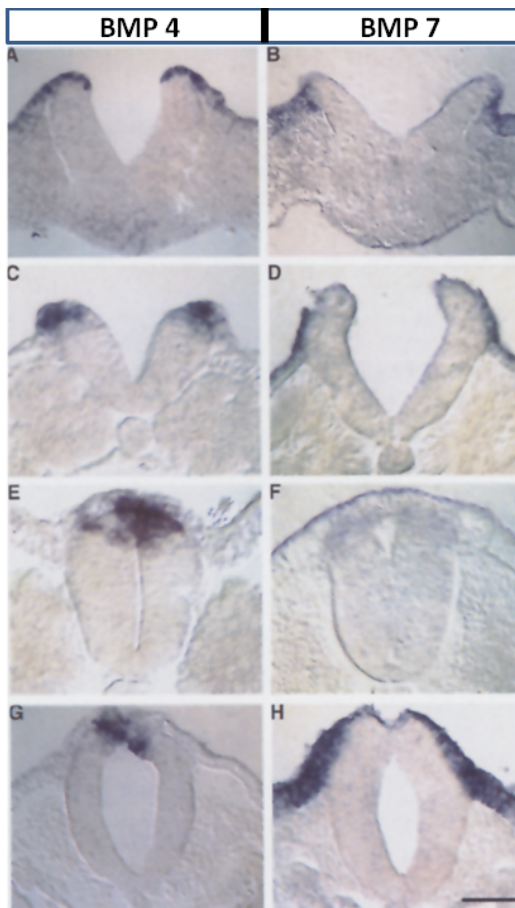
Ces expériences montrent de manière élégante que le plancher du tube neural est composé de cellules issues du Nœud de Hensen, une structure mésodermique démontrant ainsi que le tube neural n'est pas une structure anatomique homogène d'un point de vue origine tissulaire. Nous avons ainsi une explication plutôt convaincante de l'origine de la signalisation ventralisante du tube neural. En effet, cette vision classique d'une induction du plancher du tube neural uniquement imputée à la notochorde n'a été fondée que sur des expériences d'ablation de cet organe axial transitoire à des stades de développement assez tardifs chez l'embryon d'oiseau (van Straaten and Hekking, 1991) (Yamada et al., 1991). Dans ces études l'ablation de la notochorde dans la région non-segmentée au stade HH10 à HH12 (de 10-15 somites) conduirait à l'absence de formation du plancher du tube neural. Ces auteurs concluent ainsi que les cellules de la région ventro-médiane du tube neural seraient induites par un signal émis par la notochorde. En fait, à ce stade de développement embryonnaire, si le tube neural est séparé de la notochorde puis mis en culture dans un Matrigel, aucune modification du *patterning* dorso-ventral n'est observée !! En effet, les profils d'expression des facteurs de transcription Pax-3 et Pax-6 (gènes exprimés au niveau de la plaque alaire-toit du tube neural) ne sont pas altérés et le plancher exprime le facteur de transcription spécifique HNF $\beta$ /FoxC2 et surtout le morphogène Shh (Pituello et al., 1995).

Il apparaît ainsi que le plancher dont l'origine est différente du reste du tube neural est un tissu déjà compétent et capable de mettre en place de manière autonome une signalisation ventralisante en sécrétant Shh (exclure un rôle de la notochorde dans le maintien de cette compétence par exemple en sécrétant des signaux anti-apoptotiques serait tout de même absurde (Charrier et al., 2001; Teillet et al., 1998).

Alors que la mise en place du gradient ventro-dorsal du morphogène Shh est donc bien connue malgré sa complexité. Qu'en est-il de la mise en place du gradient dorso-ventral BMP ?

## ***II. Origine du signal dorsalisant induit par les BMP***

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ectoderme de surface sécrète des molécules de la famille des BMP (dont BMP-4 et BMP-7) (Figure 66) (Liem et al., 1995) (Liem et al., 1997) et des expériences sur des tubes neuraux en culture en présence de BMP-4 et BMP-7 montrent un effet dorsalisant de ces morphogènes. Cette étude concluant ainsi que le signal responsable de la différenciation des progéniteurs dorsaux du tube neural est sécrété par l'ectoderme de surface et met en jeu les BMP-4 et BMP-7 (Liem et al., 1995). De même que pour la formation du plancher du tube neural, le modèle général consistait (avant les travaux de Martin Catala) en une nécessaire induction des cellules du tube neural par la notochorde impliquant l'action du morphogène Shh (van Straaten and Hekking, 1991) (Yamada et al., 1991). Ce modèle reposait toutefois sur le parti pris d'un tube neural constitué de cellules neurales à l'origine tissulaire commune neuro-ectodermique. Comme nous l'avons discuté plus tôt, le plancher du tube neural se forme à partir de cellules du Nœud de Hensen (Catala et al., 1995). Ces travaux démontrant ainsi que le tube neural est constitué de cellules dont l'origine est multiple !!! Alors pourquoi ne pas imaginer un toit du tube neural issu principalement de cellules de l'ectoderme de surface non neural ? L'idée la plus simple et la plus répandue pour l'induction des cellules du toit consiste en une sécrétion des BMP par l'ectoderme de surface et ensuite induction et sécrétion de ces morphogènes par les cellules du toit du tube neural elles-mêmes (Liem et al., 1995) (Liem et al., 1997). Cependant, ce modèle n'a été imaginé et conceptualisé qu'à partir de travaux *in vitro* et sur l'analyse des patrons d'expression de BMP-4 et BMP-7 (Figure 66) (Liem et al., 1995). La compréhension



**Figure 66 : Profils d'expression de BMP4 et**

**BMP7 au cours de la fermeture du  
tube neural d'embryons d'oiseau**

Hybridation *in situ* sur coupes d'embryon d'oiseau au stade HH10 (10 somites) montrant les profils d'expression de BMP4 et BMP7. A et B : coupes histologiques rostrales au nœud de Hensen. BMP4 et BMP7 sont exprimés par les cellules de l'ectoderme de surface. BMP4 est exprimé par les cellules de l'ectoderme non-neural qui recouvre les bourrelets neuraux ; C et D : niveau plus antérieur. BMP4 est exprimé non seulement par les cellules de l'ectoderme de surface mais également par les cellules des bourrelets neuraux. BMP7 n'est uniquement exprimé par les cellules de l'ectoderme de surface ; E et F : Coupes histologiques d'un tube neural formé. BMP4 est exprimé par l'ensemble des cellules du toit du tube neural et par celles de l'ectoderme juxtaposant le tube. BMP7 n'est plus exprimé par les cellules de l'ectoderme et très légèrement par les cellules du toit ; G et H : coupes histologiques au niveau du cerveau antérieur. Expression de BMP4 par les cellules du toit et BMP7 par celles de l'ectoderme uniquement (Liem KF et al.1995)

exacte des mécanismes de formation du toit du tube neural sera donc une étape clef dans celle de la mise en place du gradient dorso-ventral BMP au sein même du tube neural.

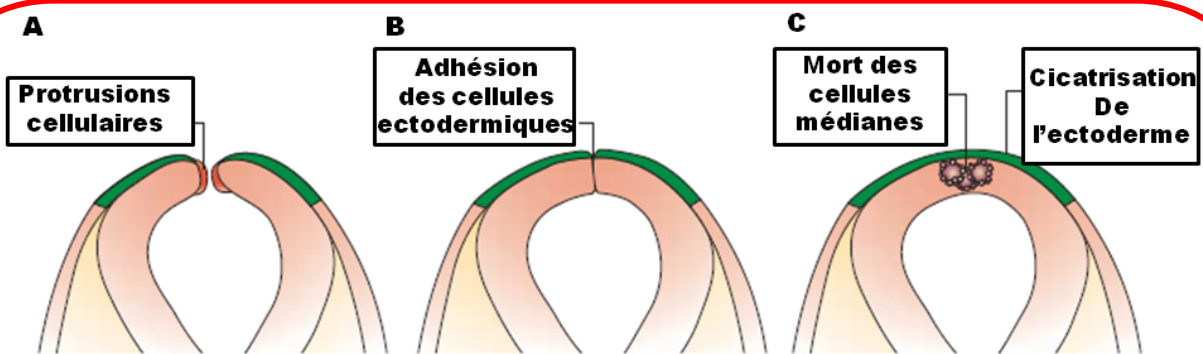
### **III. Formation du toit du tube neural**

Lors de la neurulation, le soulèvement de la plaque neurale entraîne inévitablement l'apposition des bourrelets neuraux dans la partie dorso-médiane de l'embryon. Les bourrelets neuraux rentrent ainsi en contact, vont fusionner pour former le toit du tube neural comportant ainsi une lumière centrale qui représente les futurs ventricules cérébraux et le canal de l'épendyme dans lequel circulera le liquide cérébro-spinal. Ce tube neural néo-formé s'individualise enfin et va être entièrement recouvert par l'ectoderme de surface (Colas and Schoenwolf, 2001). Cependant, les mécanismes cellulaires exacts de la fermeture du tube neural sont peu ou pas connus (cf Chapitre 2). Classiquement, les concepts expliquant la fusion des bourrelets neuraux et la séparation entre tube neural et ectoderme de surface qui s'ensuit étaient basés sur l'adhérence sélective des deux tissus. En effet, traditionnellement – avant notre étude!! – il était décrit que toutes les cellules du tube neural exprimaient la N-

CAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) et le N-cadhérine tandis que les cellules de l'ectoderme de surface expriment la E-cadhérine (Hatta et al., 1987) (Thiery et al., 1984) (Rutishauser and Jessell, 1988). Cependant, des embryons d'amphibien dont les cellules à la fois du tube neural et de l'ectoderme de surface expriment la N-cadhérine comportent des défauts de fermeture du tube neural causé probablement par une mauvaise ségrégation entre tube neural et ectoderme (Detrick et al., 1990) (Fujimori et al., 1990). De plus, une expression ectopique de la N-CAM par les cellules de l'ectoderme de surface ne perturbe pas la fermeture du tube neural (Detrick et al., 1990) et les souris mutées homozygotes pour la N-cadhérine (*N-cad -/-*) ne présentent pas de défauts de fermeture du tube neural malgré une morphologie en zig-zag due à des anomalies de formation et d'épithélialisation du mésoderme paraxial (Cremer et al., 1994) (Radice et al., 1997). L'ensemble de ces données suggère ainsi que ni la N-cadhérine ni la N-CAM ne jouent un rôle essentiel dans la fusion des bourrelets neuraux et ainsi dans la fermeture du tube neural.

Des études assez anciennes ont pu montrer que les cellules à l'apex des bourrelets neuraux formaient des protrusions cellulaires ressemblant à des lamellipodes (Figure 67) (Geelen and Langman, 1979). Ces protrusions permettraient de mettre en place un « véritable échafaudage » cytoplasmique favorisant ainsi un rapprochement et faciliter ensuite l'apposition des cellules neurales des bourrelets neuraux... De plus, le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose des cellules des bourrelets neuraux rentrent en compte dans ces événements. Un phénomène massif d'apoptose ou au contraire pas assez de mort cellulaire peut conduire à des défauts de fermeture du tube neural céphalique (Weil et al., 1997) (Yamaguchi et al., 2011).

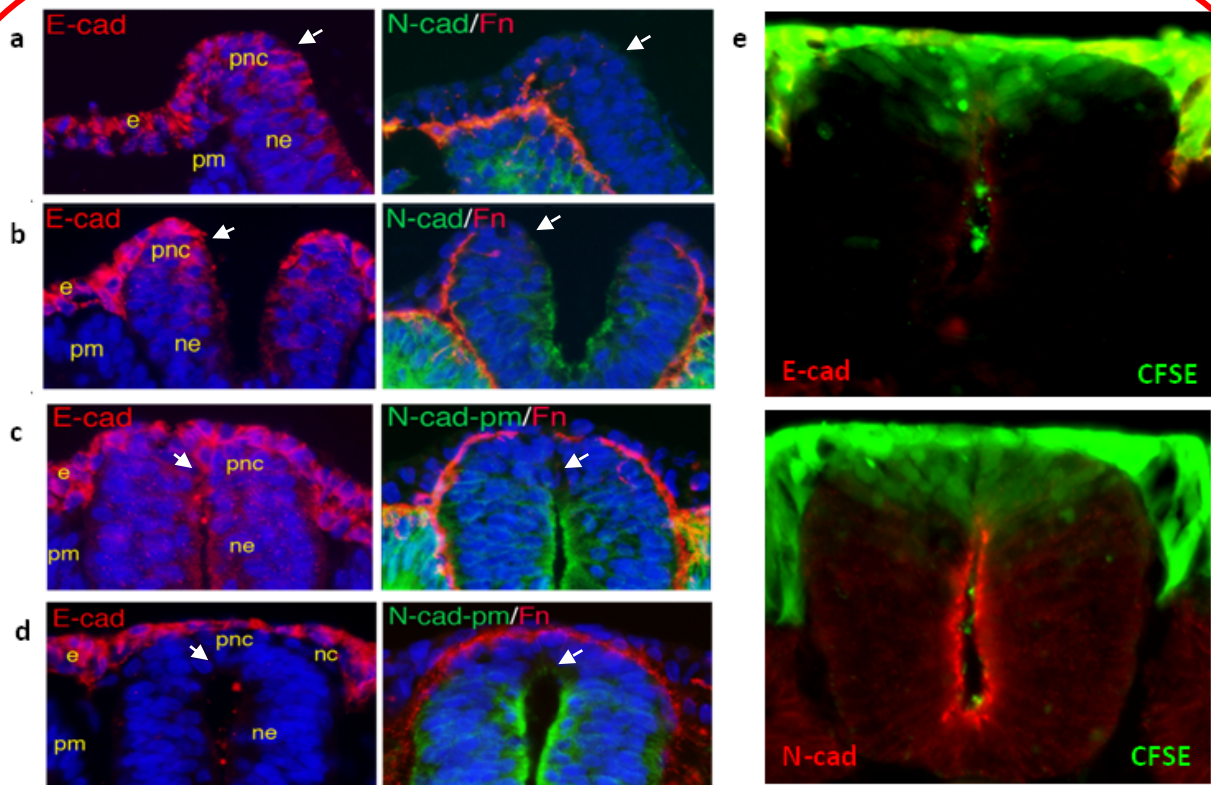
Notre étude sur la cinétique de la transition entre E- et N-cadhérine lors de la neurulation d'embryons d'oiseau a permis d'avoir une nouvelle vision de la fermeture du tube neural des vertébrés (Dady et al., 2012). En effet, toutes les cellules des bourrelets neuraux (cellules du tube neural et cellules de l'ectoderme de surface) expriment la E-cadhérine pendant l'ensemble des mouvements de formation du tube neural (lors du soulèvement, de l'apposition puis de la fusion des bourrelets neuraux) (Figure 68 a et b). Ces données suggèrent ainsi que la fusion des bourrelets neuraux nécessitent l'expression de cette molécule d'adhérence expliquant ainsi le phénotype des souris mutées pour la N-cadhérine (souris *Ncad -/-*) (Radice et al., 1997). De plus, les cellules du toit expriment toujours la E-cadhérine juste après la fusion des bourrelets neuraux (Figure 68 c). Une réorganisation spatiale des cellules de cette région dorsale va ensuite avoir lieu et une régulation du nombre de cellules



**Figure 67 : Modèle classique de fusion des bourrelets neuraux et formation du toit du tube neural lors de la neurulation des vertébrés**

Schéma représentant la fusion des bourrelets neuraux et fermeture du tube neural d'après le modèle classique. A : les cellules de l'ectoderme de surface forme des protrusions cytoplasmiques qui entourent les cellules des bourrelets neuraux ; B : des mouvements d'extension et de convergence de l'ectoderme non-neural conduit à l'adhésion des cellules ectodermiques qui recouvrent les bourrelets neuraux et d'accoler les cellules neurales ; C : fusion des bourrelets neuraux, compensation et contrôle du nombre de cellules du toit du tube neural par un phénomène d'apoptose puis cicatrisation de l'ectoderme de surface et enfin séparation du tube neural et de l'ectoderme de surface. *En vert* : ectoderme de surface ; *rose* : neuro-épithélium. (d'après A.J. Copp et al.2003)

s'opère probablement par apoptose (Figure 68 d) ce qui expliquerait le rôle si important de la régulation du cycle cellulaire sur la fermeture du tube neural (Weil et al., 1997) (Yamaguchi et al., 2011). Nos données suggèrent également que bien plus que des protrusions émises par les cellules ectodermiques non-neurales de surface, ce seraient plutôt une petite cohorte de ces mêmes cellules ectodermiques qui va s'invaginer et former le toit du tube neural. En effet, les expériences de marquage de cellules de surface par le CFDA-SE conduisent toujours à un toit du tube neural marqué (Figure 68 e)!! Enfin, en observant les profils d'expression des BMP et surtout celui de BMP-4 réalisés par l'équipe de Jessel en 1995, une véritable corrélation peut être faite entre les cellules des bourrelets neuraux d'origine ectodermiques non-neurales exprimant BMP-4 et celles exprimant la E-cadhérine (Liem et al., 1995) (Liem et al., 1997). De plus, cette forte expression de BMP-4 va induire l'expression de la cadhérin-6B par les cellules du toit du tube neural ségrégeant ainsi cette population cellulaire du reste du tube neural (Liem et al., 1995) (Liem et al., 1997). L'ensemble de ces observations suggèrent ainsi une origine ectodermique non-neurale des cellules formant le toit du tube neural et permet enfin de mieux comprendre comment se met en place le signal dorsalisant induit par les BMP.



**Figure 68** : Profils d'expression de la E-cadhérine et de la N-cadhérine lors de la fusion des bourrelets Neuraux et marquage des cellules du toit du tube neural au CFSE

Immunohistochimie anti-Ecadhérine (E-cad), anti-Ncadhérine (N-cad) et anti-fibronectine (Fn) sur coupes d'embryons d'oiseau du stade HH 8 (a) au stade HH 11(d) dans la région du tronc antérieur (a-b) et coupes d'embryon d'oiseau après marquage au CFDA-SE (CFSE) de la même région d'un embryon au stade HH8 laissé incubé 6 heures (e). Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI. *pm* : paraxial mesoderm ou mésoderme paraxial ; *pnc* : presumptive neural crest ou progéniteurs des cellules de la Crête Neurale ; *ne* : neuro-épithélium

Ainsi pour conclure, nos données ainsi que celles de la littérature ont tendance à dessiner un tube neural totalement hétérogène d'un point de vue tissulaire !!! La mise en place de ces signaux dorsalisants (les BMP) et ventralisant (Shh) nécessiteraient ainsi respectivement l'intégration d'une portion de tissu ectodermique non-neural pour la mise en place du gradient BMP en région dorsale et une portion de tissu Nodal ou mésodermique axial pour celle du gradient Shh en région ventrale. Il semblerait ainsi que le tube neural est en fait un parfait exemple d'une véritable synergie entre des populations aux origines très différentes et exotiques ! Les cellules neurales « canoniques » (celles qui se forment comme dans les livres !!) ne constitueraient en fait que les murs ou parties latérales du tube neural.

## *Peut-on encore parler de Cellules de la Crête « Neurale » ?*

Comme nous venons d'en discuter ci-dessus, le tube neural n'est absolument pas un tissu homogène constitué de cellules de même origine. Ce dernier serait plutôt déjà un organe complexe très compartimenté. En effet, la mise en place du toit du tube neural se ferait de manière analogue à celle du plancher, il s'agit en fait de l'intégration d'une portion d'un tissu non-neural soit, respectivement, des cellules de l'ectoderme de surface non-neural exprimant les BMP et des cellules du nœud de Hensen exprimant Shh. Ainsi classiquement les cellules dites de la Crête neurale ne doivent leur nom qu'à deux observations : la première, ces cellules émergent du tube neural et la deuxième, cette population va engendrer, entre autre, l'intégralité du système nerveux périphérique (Tableau 3) (Le Douarin and Kalcheim, 1999) (Duband, 2006). Cependant, cette population de cellules est considérée de plus en plus dans la communauté scientifique comme un véritable 4<sup>ème</sup> feuillet embryonnaire avec ses propres caractéristiques cellulaires et moléculaires. En effet, ces CC « N » vont non seulement être à l'origine du système nerveux périphérique (neurones ainsi que cellules gliales des systèmes nerveux sympathique, parasympathique et sensoriel) mais également de l'ensemble ostéo-cartilagineux de la face (dans la partie rostrale, elles forment les cartilages fronto-nasaux et les os membraneux du crâne. Plus postérieurement, ces cellules entrent dans la poche pharyngée et les arcs brachiaux où elles contribuent à la formation de la mâchoire, des cartilages hyoïdien et thyroïdien, de l'oreille moyenne et forment les odontoblastes des premières dents), de cellules endocrines, de mélanocytes entre autres dérivés (Tableau 3) (Le Douarin and Kalcheim, 1999) (Gammill and Bronner-Fraser, 2003). Il apparaît ainsi que ces cellules dites neurales ne donnent pas uniquement naissance à des dérivés neuraux mais ce serait très minimaliste de s'arrêter à ce genre de question finaliste.

Notre étude très précise sur l'expression et les régulations des cadhérines impliquées lors de la genèse des cellules de la crête « neurale » au cours du développement d'embryon d'oiseau nous a amenés à complètement repenser l'histoire de ces cellules et nous a permis de mieux comprendre voire d'expliquer certaines incohérences rencontrées de ci de là dans cette littérature si riche engendrée par l'analyse de cette population cellulaire si particulière.



### *Dérivés de la Crête Neurale*

#### Crête céphalique

- Quasi-totalité du squelette de la tête : cartilage du chondrocrâne (capsule nasale, cartilage de Meckel, osselets scléreux, l'os carré, le cartilage articulaire, l'hyoïde et la columelle), trachéal et laryngé, le dermatocranium (os membranaire), les ailettes dorsales et la carapace des tortues (vertébrés inférieurs)
- les odontoblastes
- les papilles dentaires
- les péricytes et les muscles lisses des artères et veines brachiales
- les tendons des muscles oculaires et masticateurs
- le tissu conjonctif des glandes de la tête et du cou (pituitaire, salivaires, lacrymales, thymus, thyroïdienne)
- le derme et le tissu adipeux de la calvaria, de la partie ventrale du cou et de la face

#### Crête vagale

- ganglions du système nerveux entérique, aussi appelés ganglions parasymphatiques
- mélanocytes, en cartilage, en tissu conjonctif et en neurone de certains arcs branchiaux.
- tissu musculo-conjonctif des artères
- partie du septum qui sépare la circulation pulmonaire de l'aorte

#### Crête troncale

##### Dérivés en cellules endocrines:

- cellules chromaffines de la médullo-surrénale
- cellules parafolliculaires
- cellules sécrétrices de calcitonine de la thyroïde
- cellules du corps carotidiens, type I/II

##### Dérivés formant le Système nerveux périphérique:

- Neurones sensoriels et glie des ganglions spinaux et céphaliques (VII et en partie, III, V, IX, et X), sympathique et parasymphatique
- Cellules des capsules frontières

- Cellules de Rohon-Beard
- Cellules de Merkel
- cellules satellites (gliales) de tous les ganglions autonomes et sensitifs
- Cellules de Schwann de tous les nerfs périphériques.

**Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents dérivés de la crête « neurale »**

*(d'après Le Douarin et Kalcheim.1999)*

### **I. Cellules de la Crête Neurale et idées reçues**

Classiquement, « l'imagerie populaire » décrit une cascade d'expression de cadhérines par les cellules de la Crête assez classique qui suit celle de l'ensemble des cellules du tube neural. En effet, la première molécule d'adhérence intercellulaire exprimée par les cellules neuroépithéliales et les précurseurs des CCN serait la E-cadhérine. Cette molécule serait remplacée par la N-cadhérine au cours du repliement de la plaque neurale et de sa fermeture en tube neural mais, contrairement à ce que l'on observe dans les carcinomes, ce phénomène n'induirait pas de migration cellulaire. Les CCN exprimeraient également la cadhérine-6B, et comme la N-cadhérine, ces molécules disparaîtraient de la surface de ces cellules dès le début de la migration. Ensuite, les CCN en migration exprimeraient d'autres cadhérines, la 7 et la 11 (Taneyhill, 2008) (Duband, 2006). **Toutefois, aussi surprenant que cela puisse paraître, ce modèle n'a jamais été directement vérifié (!?) mais sert de dogme très solide sur lequel l'ensemble des études sur la délamination des cellules de la Crête repose...**

Ainsi, des modèles exotiques apparaissent et persistent montrant une répression nécessaire de la N-cadhérine par Snail-2/Slug lors de la Transition Epithélium-Mésenchyme des CCN alors qu'aucun argument scientifique n'existe (Theveneau and Mayor, 2012)!!! Bien au contraire, des études du promoteur du gène codant pour cette molécule d'adhérence n'ont montré aucune séquence de fixation – E box – permettant une répression directe de Snail-2/Slug, facteur de transcription nécessaire à la délamination des CCN (Matsumata et al., 2005). De plus, une expression ectopique de Snail-2/Slug dans le tube neural troncal n'induit jamais de délamination ectopique de cellules neurales exprimant la N-cadhérine (del Barrio and Nieto, 2002). Autant d'arguments en défaveur d'une transition E- /N- cadhérine à la surface des CCN. Chaya Kalcheim avait pourtant « réussi » le tour de force de concilier expression de la N-cadhérine et délamination des CCN ! Son étude conclut en effet à une répression requise par clivage protéolytique de la molécule d'adhérence dans le processus de

TEM des cellules de la Crête (Shoval et al., 2007). Cependant, son hypothèse est basée sur l'étude non rigoureuse du profil d'expression de la N-cadhérine à un unique stade (HH 14 – 20 somites) du développement d'oiseau. De plus, elle prend le parti d'un tube neural dont la formation demeure strictement identique selon l'axe antéro-postérieur et dont l'histoire cellulaire et moléculaire peut ainsi être remontée en observant la région caudale (le tube neural rostral étant censé être plus mature mais identique au tube neural caudal)... Ce qui s'avère malheureusement complètement faux !!! **La question d'une transition –E/-N lors du développement des CCN s'impose donc.**

Marianne Bronner-fraser a pris la question de la régulation de la TEM des CCN avec plus de hauteur. En effet, en étudiant le promoteur du gène codant pour la cadhérine-6B (molécule exprimée par les CCN), son équipe a pu observer la présence de séquences de fixation au facteur de transcription Snail-2/Slug et ainsi mettre en évidence pour la première fois une cible moléculaire pertinente de ce facteur de transcription impliqué dans la délamination des cellules de la Crête (Nakagawa and Takeichi, 1995) (Coles et al., 2007) (Taneyhill et al., 2007). Néanmoins le rôle de la cadhérine-6B dans la délamination des CCN est sujet à controverse. L'équipe de Gary Gumbiner a en effet mis en évidence plus ou moins un rôle de cette molécule d'adhérence dans un phénomène dé-épithélialisation (des cellules rondes perdant l'expression de molécules d'adhérence que ce soit la N-cadhérine ou des protéines des jonctions serrées telles que ZO-1 et tombant dans la lumière du tube neural...) de cellules du tube neural sans pour autant entraîner de TEM. Ils observent de plus une induction du morphogène BMP-4 lors d'expression ectopique de cadhérine-6B dans le tube neural (Park and Gumbiner, 2010). Il apparaît que les phénomènes observés s'apparentent plus à des phénomènes d'anoïkis causés par un tri cellulaire lié au caractère homophilique et exclusif des liaisons entre cadhérines déjà très bien décrit par les travaux de Steinberg (Steinberg and Takeichi, 1994) (Foty and Steinberg, 2005). De plus, l'induction forte de BMP-4 dans les cellules transfectées marquerait plus un engagement vers une mort programmée apoptotique qu'un réel changement de destin cellulaire (Graham et al., 1994).

**Connaître précisément les profils d'expression des cadhérines–E /-N et -6B au cours de la formation et de la délamination des cellules de la Crête était donc indispensable.**

## II. Les Cellules de la Crête ou le paradigme du « ni ni »

Notre étude systématique (et très complet !!) des profils d'expression des cadhérine –E/-N/ -6B et -7 ainsi que les régulateurs les plus connus de la Transition Epithélium-Mésenchyme que sont Snail-2/Slug, ZEB-2/Sip-1 et Twist au cours de la spécification jusqu'à la délamination des Cellules de la Crête apporte un éclairage nouveau et enfin une vision très précise des modulations d'adhérence mises en jeu lors de la biologie de ces cellules.

A l'image d'un tube neural très compartimenté (en toit, murs et plancher) et dont les cellules n'ont pas toute la même origine tissulaire contrairement au dogme transmis de génération en génération, l'initiation des mouvements de neurulation ne nécessite absolument pas un changement dans le répertoire des cadhérines. Nos données suggèrent en effet que ces deux événements seraient disjoints. Une transition E-/N-cadhérine a cependant lieu à la surface des cellules neurales (et uniquement les cellules neurales !!) mais cette transition n'est pas du tout un prérequis à la formation du tube neural. Cette observation explique ainsi le phénotype des souris *Ncad*<sup>-/-</sup> qui ne comportent pas de défauts de formation du tube neural (Radice et al., 1997). De plus, nos données suggèrent que le programme de transition de cadhérines s'initie à un moment bien précis et unique au cours de la neurogenèse précoce. Cette transition E-/N-cadhérine à la surface des cellules neurales a ainsi lieu très tardivement par rapport aux mouvements de neurulation dans la région antérieure de l'embryon. Une persistance d'expression de la E-cadhérine à la surface de l'ensemble des cellules du tube neural du cerveau moyen a été observé jusqu'à délamination des CCN céphaliques (stade 10 somites ou HH10). Dans la région postérieure, le tube neural caudal se forme à partir de cellules exprimant la N-cadhérine suggérant ainsi que cette transition E-/N-cadhérine a eu lieu bien avant les mouvements de neurulation. En effet, pour rappel, les travaux de marquage de cellules de la plaque neurale réalisées par l'équipe de Kate Storey, à un stade très précoce du développement embryonnaire (stade HH5), ont montré que l'intégralité des progéniteurs des cellules du futur système nerveux central est déjà présente à ce stade (Brown and Storey, 2000). **De plus, contrairement aux carcinomes, cette transition E-/N-cadhérine ne conduit pas à une TEM !** Il semblerait que le contrôle de la cinétique de cette transition soit l'explication la plus pertinente. Cette fameuse transition de cadhérines à la surface des cellules neurales a lieu de façon très progressive au cours du développement embryonnaire, elle se fait sur plusieurs jours, alors que dans le cas des métastases, il s'agirait d'un événement brutal.

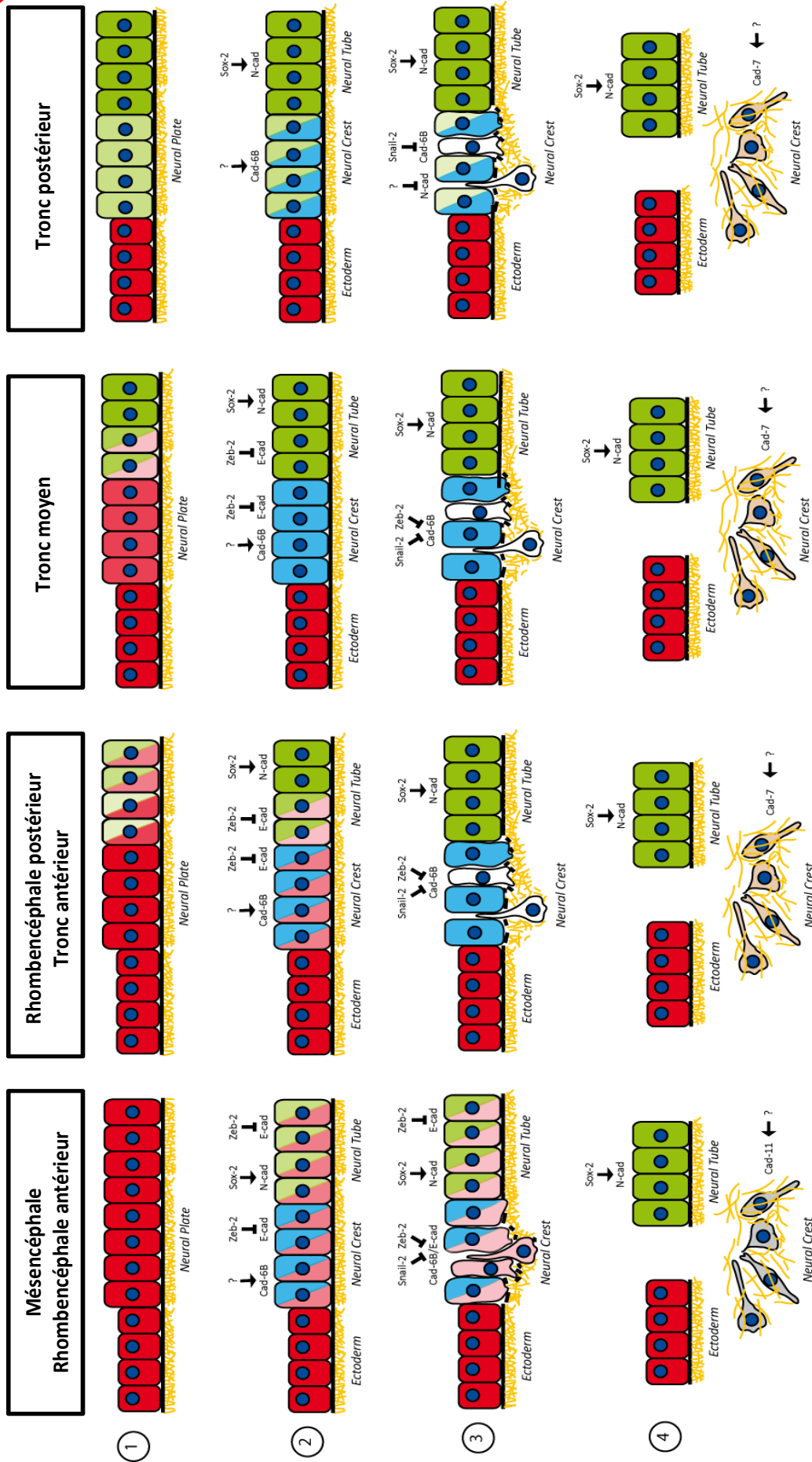
Mais qu'en est-il pour les cellules de la Crête ? Encore une fois, nos données contredisent le modèle communément admis ! **Les cellules de la Crête expriment un répertoire spécifique de cadhérines. Tout d'abord, lors de la phase de spécification, ces cellules expriment la E-cadhérine puis la cadhérine-6B juste avant la phase de délamination mais n'expriment jamais la N-cadhérine (ou peut-être seulement dans la région la plus postérieure de l'embryon...)** (Figure 69). Nos données suggèrent ainsi une véritable ségrégation tissulaire et cellulaire orchestrée par l'expression de cadhérines spécifiques à chaque tissu : les cellules de l'ectoderme de surface exprimant la E-cadhérine, les cellules de la Crête la cadhérine-6B et enfin les cellules neurales « canoniques » la N-cadhérine. Il apparaît ainsi qu'il n'y a absolument aucune transition E-/N-cadhérine à la surface des cellules de la Crête mais une transition cadhérine-E/-6B avec parfois une co-expression de ces deux dernières molécules d'adhérence à la surface de ces cellules dans la région antérieure de l'embryon d'oiseau (région céphalique et tronc antérieur de l'embryon). Cette ségrégation cellulaire est ainsi l'événement majeur et propice au déclenchement de la Transition Epithélium-Mésenchyme des cellules de la Crête. En effet, une répression directe des cadhérine-E et -6B par le facteur de transcription Snail-2/Slug a été largement documentée dans la littérature faisant de ce facteur de transcription l'acteur majeur (connu !) de la TEM des cellules de la Crête (Peinado et al., 2007) (Coles et al., 2007) (Taneyhill et al., 2007). De plus, la présence des mêmes séquences régulatrices – E box – sur le promoteur du gène codant pour la cadhérine-6B laisse imaginer une répression par d'autres facteurs de transcription également connus pour celle de la E-cadhérine (Peinado et al., 2007) (Thiery et al., 2009). Ainsi, nous pouvons légitimement considérer ZEB-2/Sip-1 comme un autre acteur de la TEM des cellules de la Crête. Ce facteur de transcription est en effet exprimé par ces cellules lors de leur délamination et les souris mutées pour le gène *ZEB-2/sip-1* spécifiquement dans les CCN comportent des anomalies sévères de développement cranio-facial et cardiaque ainsi qu'une diminution sévère du nombre de mélanocytes et de neurones du système nerveux périphérique (Van de Putte et al., 2007). Faire un parallèle entre acteurs moléculaires connus lors de la tumorigenèse et TEM des cellules de la Crête est donc tout à fait pertinent et légitime dans l'investigation de nouveaux candidats. Il semble ainsi que Chaya Kalcheim avait touché du bout du doigt le concept d'une nécessaire absence d'expression de N-cadhérine par les cellules de la Crête mais non par clivage protéolytique d'une protéine déjà exprimée (Shoval et al., 2007)!!! De plus, la fameuse région Carboxy-terminal ou domaine CTRF2 (ou *Carboxy-Terminal Region Fragment-2*) issu du second clivage de la N-cadhérine dans la région cytoplasmique de cette protéine est décrite dans cette

même étude comme facteur de transcription est sujette à discussion. En effet, cette région présente une séquence en acide-aminés quasi-identique à celle de la E-cadhérine... remettant ainsi en cause la spécificité et ainsi l'origine réelle de ce fragment-facteur de transcription (sans pour autant exclure un rôle effectif de cette région !!).

Cette ségrégation tissulaire et cellulaire n'est en fait que la conséquence d'un jeu subtil entre différents acteurs moléculaires : les BMPs et les FGF. Le morphogène BMP-4 a depuis toujours été décrit comme un inducteur majeur de la Transition Epithélium-Mésenchyme des cellules tumorales et de la Crête Neurale (Peinado et al., 2007) (Thiery et al., 2009) (Duband, 2010). Il joue également un rôle majeur lors de la spécification de ces cellules du toit du tube neural en induisant de nombreux gènes spécifiques du destin Crête (Duband, 2006) (Betancur et al., 2010). Notre étude a mis cependant en évidence un rôle insoupçonné et original de ce morphogène dans la biologie des cellules de la Crête : **BMP-4 est l'acteur majeur de la ségrégation tissulaire et cellulaire dans le toit du tube neural**. Tout d'abord, lors de la phase précoce de spécification, BMP-4, exprimé par les cellules du toit du tube neural (Liem et al., 1995) (Liem et al., 1997), réprime d'une part l'expression du facteur de transcription Sox-2 ce qui conduit *de facto* à une répression transcriptionnelle de la N-cadhérine et d'autre part, en concomitance, induit l'expression de la cadhérine-6B par les cellules du toit du tube neural ou cellules de la Crête. Enfin, plus tardivement, lors de la phase de délamination, BMP-4 induit les acteurs de la Transition Epithélium-Mésenchyme que sont les facteurs de transcription Snail-2/Slug et ZEB-2/Sip-1 (Peinado et al., 2007) (Thiery et al., 2009) (Duband, 2010).

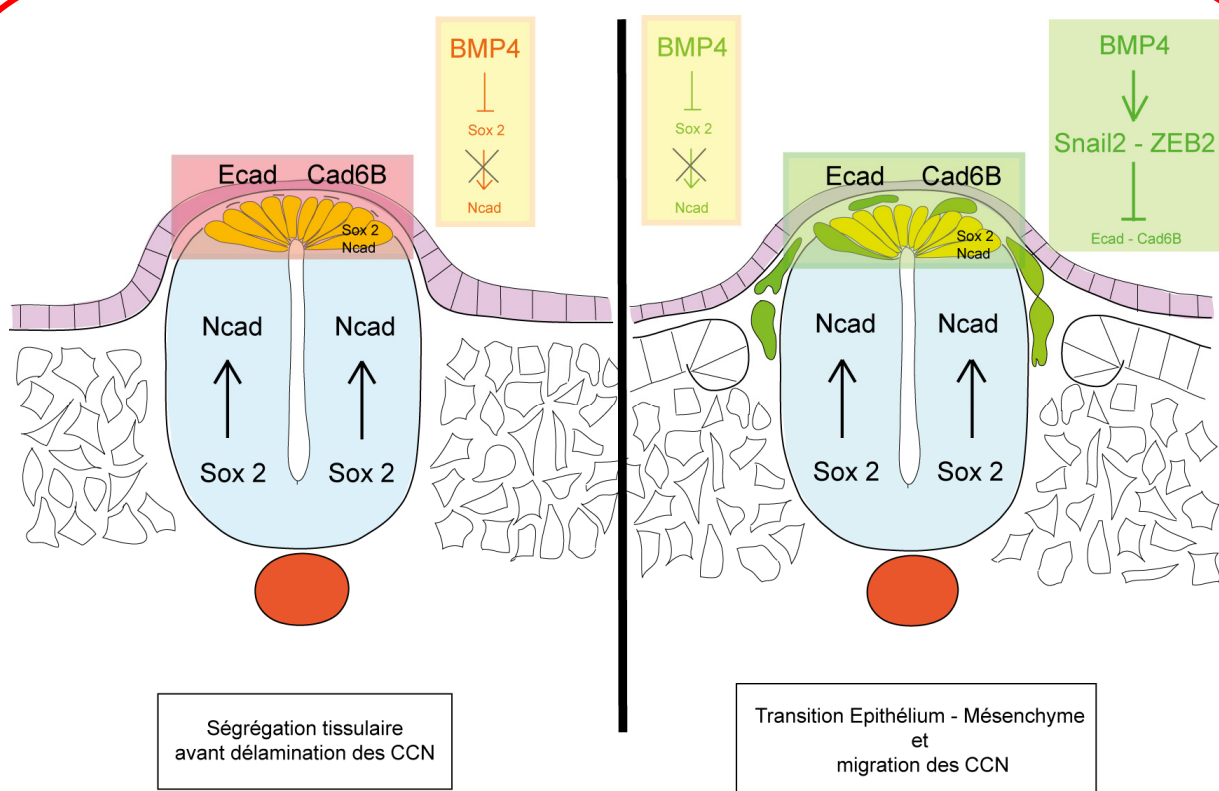
**Nous pouvons ainsi imaginer un double effet du morphogène BMP-4 dans la biologie des cellules de la Crête (Figure 70) :**

- **Phase 1 : ségrégation tissulaire par la mise en place d'un répertoire spécifique de cadhérines et spécification des cellules de la Crête**
- **Phase 2 : induction des facteurs de transcription Snail-2 et ZEB-2 et ainsi promotion de la Transition Epithélium-Mésenchyme des cellules de la Crête Neurale**



**Figure 69** : Schémas représentant la cinétique des transitions de cadhérines et les régulateurs moléculaires impliqués lors de la Transition Epithélium-Mésenchyme des cellules de la Crête selon l'axe antéro-postérieur de l'embryon d'oiseau

Contrairement à l'effet « pro-crête » de l'activation de la voie de signalisation des BMPs, l'activation de la signalisation liée aux FGF conduit à la perte totale de cellules de la Crête dans le tube neural. En effet, des travaux récents ont mis en évidence un rôle de la balance Acide Rétinoïque/FGF-8 (déjà bien décrit lors de la segmentation des vertébrés (Aulehla and Pourquie, 2010)) dans la délamination des cellules de la Crête Neurale (Martinez-Morales et al., 2011). Nos travaux sur des explants de tubes neuraux en culture en présence de FGF-8 soluble confirment un effet inhibiteur de la voie des FGF dans la TEM de ces cellules : **Les FGF conduisent à une expression ectopique de la N-cadhérine par l'ensemble des cellules du tube neural, à**



**Figure 70 : Rôle Bivalent de BMP4 sur la délamination des Cellules de la Crête**

a) Ségrégation tissulaire

b) Inducteur de la Transition épithélium - mésenchyme des CCN

une répression de la cadhérine-6B par les cellules de la Crête Neurale et ainsi finalement à une disparition de ces dernières. Ces données suggèrent ainsi que la voie FGF est nécessaire à la ségrégation du tissu neural « canonique » en induisant l'expression de la N-cadhérine par les cellules latérales du tube neural probablement par le biais d'une activation du facteur de transcription Sox-2. Malgré un rôle précoce des FGF dans la spécification des CCN, il apparaît que ces morphogènes exprimés par le mésoderme paraxial doivent



nécessairement être réprimés plus tardivement afin de promouvoir la délamination de ces cellules.

Pour conclure, nos données redessinent le concept de Cellules de la Crête Neurale ! En effet, cette population se distingue du reste du tube neural par un répertoire de cadhérines bien spécifique : **ces cellules connaissent d'une part uniquement une transition cadhérine-E/-6B et surtout d'autre part n'expriment pas la N-cadhérine**. Il apparaît que cette spécification tissulaire par adhérence sélective est l'étape majeure et le prérequis nécessaire à la délamination de ces cellules. Cette ségrégation cellulaire est ainsi orchestrée d'une part par l'action du morphogène BMP-4 qui prévient l'expression de la N-cadhérine par ces cellules en réprimant Sox-2 dans un premier temps puis induire la Transition Epithélium-Mésenchyme en induisant les facteurs de transcription Snail-2/Slug et ZEB-2 mais également d'autre part la répression de la voie de signalisation des FGF qui induit l'expression de la N-cadhérine par les cellules neurales « canoniques ». Comme nous l'avons discuté précédemment, la mise en place de la signalisation et du gradient dorso-ventral BMP-4 dans le tube neural serait imputée à l'intégration d'une portion d'ectoderme de surface non-neural au sein du tube neural, cet argument ajouté au répertoire spécifique de cadhérines exprimé par les cellules de la Crête exclut ou du moins atténue la terminaison neurale de cette population cellulaire. En effet, les cellules de la Crête seraient plutôt d'origine ectodermique que neurale « canonique » !! Nos données rejoignent ainsi les résultats obtenus par Breau et al. montrant que les CCN à l'origine du mésenchyme squelettogénique de la tête dérivent de certaines régions de l'ectoderme non neural des bourrelets neuraux de la région céphalique de souris (Breau et al., 2008).

L'ensemble de ces résultats soutiennent ainsi une ancienne théorie soutenue par Thomas M. Jessel et James A. Weston : il s'agirait de **Cellules de la Crête Ectodermique**.

Cependant pour atténuer la polémique et reprendre le titre de ce chapitre, nos données suggèrent surtout que les cellules de la Crête ne sont en définitive ni « neurales » ni vraiment tout à fait « ectodermiques » mais forment un véritable quatrième feuillet embryonnaire.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Aaku-Saraste, E., A. Hellwig, et al. (1996). "Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis." *Dev Biol* 180(2): 664-79.
- Abu-Abed, S., P. Dolle, et al. (2001). "The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures." *Genes Dev* 15(2): 226-40.
- Acloque, H., O. H. Ocana, et al. (2011). "Reciprocal repression between Sox3 and snail transcription factors defines embryonic territories at gastrulation." *Dev Cell* 21(3): 546-58.
- Ahlstrom, J. D. and C. A. Erickson (2009). "The neural crest epithelial-mesenchymal transition in 4D: a 'tail' of multiple non-obligatory cellular mechanisms." *Development* 136(11): 1801-12.
- Akai, J., P. A. Halley, et al. (2005). "FGF-dependent Notch signaling maintains the spinal cord stem zone." *Genes Dev* 19(23): 2877-87.
- Al-Amoudi, A., D. C. Diez, et al. (2007). "The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes." *Nature* 450(7171): 832-7.
- Alfandari, D., H. Cousin, et al. (2003). "Integrin alpha5beta1 supports the migration of *Xenopus* cranial neural crest on fibronectin." *Dev Biol* 260(2): 449-64.
- Alfandari, D., H. Cousin, et al. (2001). "*Xenopus* ADAM 13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration." *Curr Biol* 11(12): 918-30.
- Alvarez, I. S. and G. C. Schoenwolf (1992). "Expansion of surface epithelium provides the major extrinsic force for bending of the neural plate." *J Exp Zool* 261(3): 340-8.
- Amiel, J. and S. Lyonnet (2001). "Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review." *J Med Genet* 38(11): 729-39.
- Anastasiadis, P. Z. (2007). "p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases." *Biochim Biophys Acta* 1773(1): 34-46.
- Anastasiadis, P. Z. and A. B. Reynolds (2001). "Regulation of Rho GTPases by p120-catenin." *Curr Opin Cell Biol* 13(5): 604-10.
- Angers, S. and R. T. Moon (2009). "Proximal events in Wnt signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(7): 468-77.
- Au, K. S., A. Ashley-Koch, et al. (2010). "Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects." *Dev Disabil Res Rev* 16(1): 6-15.
- Aulehla, A. and O. Pourquie (2010). "Signaling gradients during paraxial mesoderm development." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(2): a000869.
- Avilion, A. A., S. K. Nicolis, et al. (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." *Genes Dev* 17(1): 126-40.
- Balaskas, N., A. Ribeiro, et al. (2012). "Gene regulatory logic for reading the Sonic Hedgehog signaling gradient in the vertebrate neural tube." *Cell* 148(1-2): 273-84.
- Bang, A. G., N. Papalopulu, et al. (1999). "Expression of Pax-3 in the lateral neural plate is dependent on a Wnt-mediated signal from posterior nonaxial mesoderm." *Dev Biol* 212(2): 366-80.
- Barrallo-Gimeno, A. and M. A. Nieto (2005). "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." *Development* 132(14): 3151-61.
- Barrallo-Gimeno, A. and M. A. Nieto (2006). "Evolution of the neural crest." *Adv Exp Med Biol* 589: 235-44.
- Basch, M. L., M. Bronner-Fraser, et al. (2006). "Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7." *Nature* 441(7090): 218-22.

- Bassez, G., O. J. Camand, et al. (2004). "Pleiotropic and diverse expression of ZFH1B gene transcripts during mouse and human development supports the various clinical manifestations of the "Mowat-Wilson" syndrome." *Neurobiol Dis* 15(2): 240-50.
- Battle, E., E. Sancho, et al. (2000). "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells." *Nat Cell Biol* 2(2): 84-9.
- Bellmeyer, A., J. Krase, et al. (2003). "The protooncogene c-myc is an essential regulator of neural crest formation in xenopus." *Dev Cell* 4(6): 827-39.
- Betancur, P., M. Bronner-Fraser, et al. (2010). "Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network." *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 581-603.
- Bollerot, K., D. Sugiyama, et al. (2006). "Widespread lipoplex-mediated gene transfer to vascular endothelial cells and hemangioblasts in the vertebrate embryo." *Dev Dyn* 235(1): 105-14.
- Bonstein, L., S. Elias, et al. (1998). "Paraxial-fated mesoderm is required for neural crest induction in *Xenopus* embryos." *Dev Biol* 193(2): 156-68.
- Bowles, J., G. Schepers, et al. (2000). "Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators." *Dev Biol* 227(2): 239-55.
- Braga, V. (2000). "The crossroads between cell-cell adhesion and motility." *Nat Cell Biol* 2(10): E182-4.
- Breau M. A., T. P., Marc P. Stemmler, Jean Paul Thiery, and James A. Weston. (2008). A nonneural epithelial domain of embryonic cranial neural folds gives rise to ectomesenchyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7750-7755
- Brembeck, F. H., M. Rosario, et al. (2006). "Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin." *Curr Opin Genet Dev* 16(1): 51-9.
- Brembeck, F. H., T. Schwarz-Romond, et al. (2004). "Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions." *Genes Dev* 18(18): 2225-30.
- Brender, J. D., M. Felkner, et al. (2010). "Maternal pesticide exposure and neural tube defects in Mexican Americans." *Ann Epidemiol* 20(1): 16-22.
- Brown, J. M. and K. G. Storey (2000). "A region of the vertebrate neural plate in which neighbouring cells can adopt neural or epidermal fates." *Curr Biol* 10(14): 869-72.
- Burstyn-Cohen, T. and C. Kalcheim (2002). "Association between the cell cycle and neural crest delamination through specific regulation of G1/S transition." *Dev Cell* 3(3): 383-95.
- Burstyn-Cohen, T., J. Stanleigh, et al. (2004). "Canonical Wnt activity regulates trunk neural crest delamination linking BMP/noggin signaling with G1/S transition." *Development* 131(21): 5327-39.
- Cacheux, V., F. Dastot-Le Moal, et al. (2001). "Loss-of-function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease." *Hum Mol Genet* 10(14): 1503-10.
- Cai, D. H. and P. R. Brauer (2002). "Synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases early cardiac neural crest migration in chicken embryos." *Dev Dyn* 224(4): 441-9.
- Cai, D. H., T. M. Vollberg, Sr., et al. (2000). "MMP-2 expression during early avian cardiac and neural crest morphogenesis." *Anat Rec* 259(2): 168-79.
- Camerer, E., A. Barker, et al. (2010). "Local protease signaling contributes to neural tube closure in the mouse embryo." *Dev Cell* 18(1): 25-38.
- Canfield, M. A., T. A. Ramadhani, et al. (2009). "Anencephaly and spina bifida among Hispanics: maternal, sociodemographic, and acculturation factors in the National Birth Defects Prevention Study." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 85(7): 637-46.

- Cano, A., M. A. Perez-Moreno, et al. (2000). "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." Nat Cell Biol 2(2): 76-83.
- Carver, E. A., R. Jiang, et al. (2001). "The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition." Mol Cell Biol 21(23): 8184-8.
- Catala, M. (2002). "Genetic control of caudal development." Clin Genet 61(2): 89-96.
- Catala, M., M. A. Teillet, et al. (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(9): 2599-610.
- Catala, M., M. A. Teillet, et al. (1995). "Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimaera system." Mech Dev 51(1): 51-65.
- Catron, K. M., H. Wang, et al. (1996). "Comparison of MSX-1 and MSX-2 suggests a molecular basis for functional redundancy." Mech Dev 55(2): 185-99.
- Chan, A. M., S. Takai, et al. (1996). "Isolation of a novel oncogene, NET1, from neuroepithelioma cells by expression cDNA cloning." Oncogene 12(6): 1259-66.
- Chang, C. and Z. Werb (2001). "The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis." Trends Cell Biol 11(11): S37-43.
- Chapman, D. L., I. Agulnik, et al. (1996). "Tbx6, a mouse T-Box gene implicated in paraxial mesoderm formation at gastrulation." Dev Biol 180(2): 534-42.
- Chapman, D. L. and V. E. Papaioannou (1998). "Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene Tbx6." Nature 391(6668): 695-7.
- Chapman, S. C., J. Collignon, et al. (2001). "Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier." Dev Dyn 220(3): 284-9.
- Charrier, J. B., F. Lapointe, et al. (2001). "Anti-apoptotic role of Sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis." Development 128(20): 4011-20.
- Chen, Y. T., D. B. Stewart, et al. (1999). "Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells." J Cell Biol 144(4): 687-99.
- Chen, Z. F. and R. R. Behringer (1995). "twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis." Genes Dev 9(6): 686-99.
- Cheng, Y., M. Cheung, et al. (2000). "Chick sox10, a transcription factor expressed in both early neural crest cells and central nervous system." Brain Res Dev Brain Res 121(2): 233-41.
- Cheung, M. and J. Briscoe (2003). "Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9." Development 130(23): 5681-93.
- Cheung, M., M. C. Chaboissier, et al. (2005). "The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination." Dev Cell 8(2): 179-92.
- Ciruna, B., A. Jenny, et al. (2006). "Planar cell polarity signalling couples cell division and morphogenesis during neurulation." Nature 439(7073): 220-4.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." Cell 127(3): 469-80.
- Cogram, P., A. Hynes, et al. (2004). "Specific isoforms of protein kinase C are essential for prevention of folate-resistant neural tube defects by inositol." Hum Mol Genet 13(1): 7-14.
- Colas, J. F. and G. C. Schoenwolf (2001). "Towards a cellular and molecular understanding of neurulation." Dev Dyn 221(2): 117-45.
- Coles, E. G., L. A. Taneyhill, et al. (2007). "A critical role for Cadherin6B in regulating avian neural crest emigration." Dev Biol 312(2): 533-44.
- Coluccia, A. M., A. Vacca, et al. (2007). "Bcr-Abl stabilizes beta-catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation." Embo J 26(5): 1456-66.

- Comijn, J., G. Berx, et al. (2001). "The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion." Mol Cell 7(6): 1267-78.
- Cooper, O., D. Sweetman, et al. (2008). "Expression of avian prickle genes during early development and organogenesis." Dev Dyn 237(5): 1442-8.
- Copp, A. J., F. A. Brook, et al. (1990). "The embryonic development of mammalian neural tube defects." Prog Neurobiol 35(5): 363-403.
- Copp, A. J., I. Checiu, et al. (1994). "Developmental basis of severe neural tube defects in the loop-tail (Lp) mutant mouse: use of microsatellite DNA markers to identify embryonic genotype." Dev Biol 165(1): 20-9.
- Copp, A. J. and N. D. Greene (2010). "Genetics and development of neural tube defects." J Pathol 220(2): 217-30.
- Copp, A. J., N. D. Greene, et al. (2003). "The genetic basis of mammalian neurulation." Nat Rev Genet 4(10): 784-93.
- Cousin, H., G. Abbruzzese, et al. (2012). "ADAM13 function is required in the 3 dimensional context of the embryo during cranial neural crest cell migration in *Xenopus laevis*." Dev Biol 368(2): 335-44.
- Cremer, H., R. Lange, et al. (1994). "Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning." Nature 367(6462): 455-9.
- Criley, B. B. (1969). "Analysis of embryonic sources and mechanisms of development of posterior levels of chick neural tubes." J Morphol 128(4): 465-501.
- Curtin, J. A., E. Quint, et al. (2003). "Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse." Curr Biol 13(13): 1129-33.
- Dady, A., C. Blavet, et al. (2012). "Timing and kinetics of E- to N-cadherin switch during neurulation in the avian embryo." Dev Dyn 241(8): 1333-49.
- Dale, J. K., P. Malapert, et al. (2006). "Oscillations of the snail genes in the presomitic mesoderm coordinate segmental patterning and morphogenesis in vertebrate somitogenesis." Dev Cell 10(3): 355-66.
- Daniel, J. M. (2007). "Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso." Biochim Biophys Acta 1773(1): 59-68.
- Darken, R. S., A. M. Scola, et al. (2002). "The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*." Embo J 21(5): 976-85.
- Das, G., J. Reynolds-Kenneally, et al. (2002). "The atypical cadherin *Flamingo* links *Frizzled* and Notch signaling in planar polarity establishment in the *Drosophila* eye." Dev Cell 2(5): 655-66.
- Daugherty, R. L. and C. J. Gottardi (2007). "Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions." Physiology (Bethesda) 22: 303-9.
- Davidson, L. A. and R. E. Keller (1999). "Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension." Development 126(20): 4547-56.
- De Marco, P., E. Merello, et al. (2006). "Current perspectives on the genetic causes of neural tube defects." Neurogenetics 7(4): 201-21.
- De Robertis, E. M. and H. Kuroda (2004). "Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos." Annu Rev Cell Dev Biol 20: 285-308.
- De Wals, P., F. Tairou, et al. (2007). "Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada." N Engl J Med 357(2): 135-42.
- del Barrio, M. G. and M. A. Nieto (2002). "Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation." Development 129(7): 1583-93.

- Delalande, J. M., M. E. Guyote, et al. (2008). "Zebrafish sip1a and sip1b are essential for normal axial and neural patterning." *Dev Dyn* 237(4): 1060-9.
- Delannet, M., F. Martin, et al. (1994). "Specific roles of the alpha V beta 1, alpha V beta 3 and alpha V beta 5 integrins in avian neural crest cell adhesion and migration on vitronectin." *Development* 120(9): 2687-702.
- Detrait, E. R., T. M. George, et al. (2005). "Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics." *Neurotoxicol Teratol* 27(3): 515-24.
- Detrick, R. J., D. Dickey, et al. (1990). "The effects of N-cadherin misexpression on morphogenesis in *Xenopus* embryos." *Neuron* 4(4): 493-506.
- Dominguez, D., B. Montserrat-Sentis, et al. (2003). "Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor." *Mol Cell Biol* 23(14): 5078-89.
- Donovan, D. J. and R. C. Pedersen (2005). "Human tail with noncontiguous intraspinal lipoma and spinal cord tethering: case report and embryologic discussion." *Pediatr Neurosurg* 41(1): 35-40.
- Dottori, M., M. K. Gross, et al. (2001). "The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate." *Development* 128(21): 4127-38.
- Doudney, K., P. Ybot-Gonzalez, et al. (2005). "Analysis of the planar cell polarity gene Vangl2 and its co-expressed paralogue Vangl1 in neural tube defect patients." *Am J Med Genet A* 136(1): 90-2.
- Duband, J. L. (2006). "Neural crest delamination and migration: integrating regulations of cell interactions, locomotion, survival and fate." *Adv Exp Med Biol* 589: 45-77.
- Duband, J. L. (2010). "Diversity in the molecular and cellular strategies of epithelium-to-mesenchyme transitions: Insights from the neural crest." *Cell Adh Migr* 4(3): 458-82.
- Duband, J. L., S. Dufour, et al. (1987). "Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo." *J Cell Biol* 104(5): 1361-74.
- Duband, J. L. and J. P. Thiery (1982). "Distribution of fibronectin in the early phase of avian cephalic neural crest cell migration." *Dev Biol* 93(2): 308-23.
- Duband, J. L., T. Volberg, et al. (1988). "Spatial and temporal distribution of the adherens-junction-associated adhesion molecule A-CAM during avian embryogenesis." *Development* 103(2): 325-44.
- Dubrulle, J. and O. Pourquie (2004). "fgf8 mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo." *Nature* 427(6973): 419-22.
- Duguay, D., R. A. Foty, et al. (2003). "Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants." *Dev Biol* 253(2): 309-23.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." *Nat Rev Cancer* 2(3): 161-74.
- Eger, A., K. Aigner, et al. (2005). "DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells." *Oncogene* 24(14): 2375-85.
- Ellenberger, T., D. Fass, et al. (1994). "Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer." *Genes Dev* 8(8): 970-80.
- Elul, T., M. A. Koehl, et al. (1997). "Cellular mechanism underlying neural convergent extension in *Xenopus laevis* embryos." *Dev Biol* 191(2): 243-58.
- Endo, Y., N. Osumi, et al. (2002). "Bimodal functions of Notch-mediated signaling are involved in neural crest formation during avian ectoderm development." *Development* 129(4): 863-73.
- Endo, Y., N. Osumi, et al. (2003). "Deltex/Dtx mediates NOTCH signaling in regulation of Bmp4 expression in cranial neural crest formation during avian development." *Dev Growth Differ* 45(3): 241-8.

- Eom, D. S., S. Amarnath, et al. (2011). "Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway." Development 138(15): 3179-88.
- Escriou, V., C. Ciolina, et al. (1998). "Cationic lipid-mediated gene transfer: analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA." Cell Biol Toxicol 14(2): 95-104.
- Etheridge, S. L., S. Ray, et al. (2008). "Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development." PLoS Genet 4(11): e1000259.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature 420(6916): 629-35.
- Fernandez Caso, M., P. De Paz, et al. (1992). "Delamination of neuroepithelium and nonneural ectoderm and its relation to the convergence step in chick neurulation." J Anat 180 ( Pt 1): 143-53.
- Fleming, A. and A. J. Copp (1998). "Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects." Science 280(5372): 2107-9.
- Fleming, A. and A. J. Copp (2000). "A genetic risk factor for mouse neural tube defects: defining the embryonic basis." Hum Mol Genet 9(4): 575-81.
- Formstone, C. J. and I. Mason (2005). "Expression of the Celsr/flamingo homologue, c-fmi1, in the early avian embryo indicates a conserved role in neural tube closure and additional roles in asymmetry and somitogenesis." Dev Dyn 232(2): 408-13.
- Foty, R. A. and M. S. Steinberg (2005). "The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation." Dev Biol 278(1): 255-63.
- Fuentealba, L. C., E. Eivers, et al. (2007). "Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal." Cell 131(5): 980-93.
- Fujimori, T., S. Miyatani, et al. (1990). "Ectopic expression of N-cadherin perturbs histogenesis in *Xenopus* embryos." Development 110(1): 97-104.
- Fujita, Y., G. Krause, et al. (2002). "Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex." Nat Cell Biol 4(3): 222-31.
- Funahashi, J., R. Sekido, et al. (1993). "Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis." Development 119(2): 433-46.
- Furuse, M., K. Fujita, et al. (1998). "Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin." J Cell Biol 141(7): 1539-50.
- Gallin, W. J., G. M. Edelman, et al. (1983). "Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells." Proc Natl Acad Sci U S A 80(4): 1038-42.
- Gammill, L. S. and M. Bronner-Fraser (2003). "Neural crest specification: migrating into genomics." Nat Rev Neurosci 4(10): 795-805.
- Garcia-Castro, M. I., C. Marcelle, et al. (2002). "Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer." Science 297(5582): 848-51.
- Garton, H. J. and G. C. Schoenwolf (1996). "Improving the efficacy of fluorescent labeling for histological tracking of cells in early mammalian and avian embryos." Anat Rec 244(1): 112-17.
- Geelen, J. A. and J. Langman (1979). "Ultrastructural observations on closure of the neural tube in the mouse." Anat Embryol (Berl) 156(1): 73-88.
- Geiger, B. and O. Ayalon (1992). "Cadherins." Annu Rev Cell Biol 8: 307-32.
- Geldmacher-Voss, B., A. M. Reugels, et al. (2003). "A 90-degree rotation of the mitotic spindle changes the orientation of mitoses of zebrafish neuroepithelial cells." Development 130(16): 3767-80.



- Germanguz, I., D. Lev, et al. (2007). "Four twist genes in zebrafish, four expression patterns." Dev Dyn 236(9): 2615-26.
- Gherzi, G. and M. L. Vittorelli (1990). "Immunological evidence for the presence in sea urchin embryos of a cell adhesion protein similar to mouse uvomorulin (E-cadherin)." Cell Differ Dev 31(1): 67-75.
- Gitelman, I. (1997). "Twist protein in mouse embryogenesis." Dev Biol 189(2): 205-14.
- Godt, D. and U. Tepass (1998). "Drosophila oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion." Nature 395(6700): 387-91.
- Goetzinger, K. R., D. M. Stamilio, et al. (2008). "Evaluating the incidence and likelihood ratios for chromosomal abnormalities in fetuses with common central nervous system malformations." Am J Obstet Gynecol 199(3): 285 e1-6.
- Gogoi, R. N., F. R. Schubert, et al. (2002). "The paired-type homeobox gene Dmbx1 marks the midbrain and preteectum." Mech Dev 114(1-2): 213-7.
- Goodrich, L. V., L. Milenkovic, et al. (1997). "Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants." Science 277(5329): 1109-13.
- Goossens, S., V. Janzen, et al. (2011). "The EMT regulator Zeb2/Sip1 is essential for murine embryonic hematopoietic stem/progenitor cell differentiation and mobilization." Blood 117(21): 5620-30.
- Goto, T., L. Davidson, et al. (2005). "Planar cell polarity genes regulate polarized extracellular matrix deposition during frog gastrulation." Curr Biol 15(8): 787-93.
- Gould, S. E. and R. M. Grainger (1997). "Neural induction and antero-posterior patterning in the amphibian embryo: past, present and future." Cell Mol Life Sci 53(4): 319-38.
- Graham, A., P. Francis-West, et al. (1994). "The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest." Nature 372(6507): 684-6.
- Graham, V., J. Khudyakov, et al. (2003). "SOX2 functions to maintain neural progenitor identity." Neuron 39(5): 749-65.
- Gray (1989). "Gray's anatomy." Rev. ed. of: Anatomy, descriptive and surgical.
- Gray, R. S., P. B. Abitua, et al. (2009). "The planar cell polarity effector Fuz is essential for targeted membrane trafficking, ciliogenesis and mouse embryonic development." Nat Cell Biol 11(10): 1225-32.
- Greene, N. D. and A. J. Copp (1997). "Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse." Nat Med 3(1): 60-6.
- Greene, N. D. and A. J. Copp (2009). "Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube." Prenat Diagn 29(4): 303-11.
- Greene, N. D., P. Stanier, et al. (2009). "Genetics of human neural tube defects." Hum Mol Genet 18(R2): R113-29.
- Grewal, J., S. L. Carmichael, et al. (2009). "Neural tube defects: an analysis of neighbourhood- and individual-level socio-economic characteristics." Paediatr Perinat Epidemiol 23(2): 116-24.
- Griffith, C. M., M. J. Wiley, et al. (1992). "The vertebrate tail bud: three germ layers from one tissue." Anat Embryol (Berl) 185(2): 101-13.
- Grigoryan, T., P. Wend, et al. (2008). "Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice." Genes Dev 22(17): 2308-41.
- Grosheva, I., M. Shtutman, et al. (2001). "p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion." J Cell Sci 114(Pt 4): 695-707.
- Gubbay, J., J. Collignon, et al. (1990). "A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes." Nature 346(6281): 245-50.

- Gumbiner, B. M. (2005). "Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol 6(8): 622-34.
- Hackett, D. A., J. L. Smith, et al. (1997). "Epidermal ectoderm is required for full elevation and for convergence during bending of the avian neural plate." Dev Dyn 210(4): 397-406.
- Haigo, S. L., J. D. Hildebrand, et al. (2003). "Shroom induces apical constriction and is required for hinge-point formation during neural tube closure." Curr Biol 13(24): 2125-37.
- Halbleib, J. M. and W. J. Nelson (2006). "Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis." Genes Dev 20(23): 3199-214.
- Hall, R. J. and C. A. Erickson (2003). "ADAM 10: an active metalloprotease expressed during avian epithelial morphogenesis." Dev Biol 256(1): 146-59.
- Hamblet, N. S., N. Lijam, et al. (2002). "Dishevelled 2 is essential for cardiac outflow tract development, somite segmentation and neural tube closure." Development 129(24): 5827-38.
- Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1992). "A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951." Dev Dyn 195(4): 231-72.
- Handrigan, G. R. (2003). "Concordia discors: duality in the origin of the vertebrate tail." J Anat 202(Pt 3): 255-67.
- Harland, R. (2000). "Neural induction." Curr Opin Genet Dev 10(4): 357-62.
- Harley, V. R., R. Lovell-Badge, et al. (1994). "Definition of a consensus DNA binding site for SRY." Nucleic Acids Res 22(8): 1500-1.
- Harrington, M. J., E. Hong, et al. (2009). "Comparative analysis of neurulation: first impressions do not count." Mol Reprod Dev 76(10): 954-65.
- Harris, M. J. and D. M. Juriloff (2007). "Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 79(3): 187-210.
- Harris, M. J. and D. M. Juriloff (2010). "An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 88(8): 653-69.
- Hatta, K., S. Takagi, et al. (1987). "Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos." Dev Biol 120(1): 215-27.
- Hatta, K. and M. Takeichi (1986). "Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development." Nature 320(6061): 447-9.
- Hebrok, M., K. Wertz, et al. (1994). "M-twist is an inhibitor of muscle differentiation." Dev Biol 165(2): 537-44.
- Hemmati-Brivanlou, A. and D. Melton (1997). "Vertebrate neural induction." Annu Rev Neurosci 20: 43-60.
- Henderson, D. J., H. M. Phillips, et al. (2006). "Vang-like 2 and noncanonical Wnt signaling in outflow tract development." Trends Cardiovasc Med 16(2): 38-45.
- Henderson, D. J., P. Ybot-Gonzalez, et al. (2000). "RhoB is expressed in migrating neural crest and endocardial cushions of the developing mouse embryo." Mech Dev 95(1-2): 211-4.
- Heuberger, J. and W. Birchmeier (2010). "Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol 2(2): a002915.
- Hildebrand, J. D. and P. Soriano (1999). "Shroom, a PDZ domain-containing actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice." Cell 99(5): 485-97.
- Hirano, S., S. T. Suzuki, et al. (2003). "The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules." Front Biosci 8: d306-55.

- Hobmayer, B., F. Rentzsch, et al. (2000). "WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra." *Nature* 407(6801): 186-9.
- Holmdahl (1925). "Experimentelle Untersuchungen Über die Lage der Grenze zwischen primärer und sekundärer Körperentwicklung beim Huhn." *Anat. Anz.* 59: 393-396.
- Holmdahl (1938). "Die Morphogenese des Vertebratorganismus vom formalen und experimentellen Gesichtspunkt." *Roux's Arch. Dev. Biol.* 139: 191-226.
- Hong, C. S. and J. P. Saint-Jeannet (2007). "The activity of Pax3 and Zic1 regulates three distinct cell fates at the neural plate border." *Mol Biol Cell* 18(6): 2192-202.
- Hong, E. and R. Brewster (2006). "N-cadherin is required for the polarized cell behaviors that drive neurulation in the zebrafish." *Development* 133(19): 3895-905.
- Hopwood, N. D., A. Pluck, et al. (1989). "A Xenopus mRNA related to Drosophila twist is expressed in response to induction in the mesoderm and the neural crest." *Cell* 59(5): 893-903.
- Huber, M. A., N. Kraut, et al. (2005). "Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression." *Curr Opin Cell Biol* 17(5): 548-58.
- Hughes, A. F. and R. B. Freeman (1974). "Comparative remarks on the development of the tail cord among higher vertebrates." *J Embryol Exp Morphol* 32(2): 355-63.
- Huh, M. I., Y. M. Lee, et al. (2007). "Roles of MMP/TIMP in regulating matrix swelling and cell migration during chick corneal development." *J Cell Biochem* 101(5): 1222-37.
- Ikenouchi, J., M. Matsuda, et al. (2003). "Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail." *J Cell Sci* 116(Pt 10): 1959-67.
- Jacobson, A. G. and R. Gordon (1976). "Changes in the shape of the developing vertebrate nervous system analyzed experimentally, mathematically and by computer simulation." *J Exp Zool* 197(2): 191-246.
- Jaquier, M., A. Klein, et al. (2006). "Spontaneous pregnancy outcome after prenatal diagnosis of anencephaly." *Bjog* 113(8): 951-3.
- Jenny, A., J. Reynolds-Kenneally, et al. (2005). "Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding." *Nat Cell Biol* 7(7): 691-7.
- Jessell, T. M. and J. R. Sanes (2000). "Development. The decade of the developing brain." *Curr Opin Neurobiol* 10(5): 599-611.
- Jessen, J. R., J. Topczewski, et al. (2002). "Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements." *Nat Cell Biol* 4(8): 610-5.
- Kaestner, K. H., W. Knochel, et al. (2000). "Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors." *Genes Dev* 14(2): 142-6.
- Kajiguchi, T., E. J. Chung, et al. (2007). "FLT3 regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation, nuclear localization, and transcriptional activity in acute myeloid leukemia cells." *Leukemia* 21(12): 2476-84.
- Kamachi, Y., M. Uchikawa, et al. (2000). "Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development." *Trends Genet* 16(4): 182-7.
- Kan, N. G., M. P. Stemmler, et al. (2007). "Gene replacement reveals a specific role for E-cadherin in the formation of a functional trophoderm." *Development* 134(1): 31-41.
- Kane, D. A., K. N. McFarland, et al. (2005). "Mutations in half baked/E-cadherin block cell behaviors that are necessary for teleost epiboly." *Development* 132(5): 1105-16.
- Katsamba, P., K. Carroll, et al. (2009). "Linking molecular affinity and cellular specificity in cadherin-mediated adhesion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(28): 11594-9.
- Kawakami, A., M. Kimura-Kawakami, et al. (1997). "Distributions of PAX6 and PAX7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development." *Mech Dev* 66(1-2): 119-30.

- Kee, Y. and M. Bronner-Fraser (2005). "To proliferate or to die: role of Id3 in cell cycle progression and survival of neural crest progenitors." Genes Dev 19(6): 744-55.
- Kee, Y., B. J. Hwang, et al. (2007). "Evolutionary conservation of cell migration genes: from nematode neurons to vertebrate neural crest." Genes Dev 21(4): 391-6.
- Keller, R., L. Davidson, et al. (2000). "Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 355(1399): 897-922.
- Keller, R., L. A. Davidson, et al. (2003). "How we are shaped: the biomechanics of gastrulation." Differentiation 71(3): 171-205.
- Keller, R., J. Shih, et al. (1992). "The cellular basis of the convergence and extension of the *Xenopus* neural plate." Dev Dyn 193(3): 199-217.
- Keller, R., J. Shih, et al. (1992). "Planar induction of convergence and extension of the neural plate by the organizer of *Xenopus*." Dev Dyn 193(3): 218-34.
- Khudyakov, J. and M. Bronner-Fraser (2009). "Comprehensive spatiotemporal analysis of early chick neural crest network genes." Dev Dyn 238(3): 716-23.
- Kibar, Z., C. M. Bosoi, et al. (2009). "Novel mutations in VANGL1 in neural tube defects." Hum Mutat 30(7): E706-15.
- Kibar, Z., S. Salem, et al. (2011). "Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects." Clin Genet 80(1): 76-82.
- Kibar, Z., E. Torban, et al. (2007). "Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects." N Engl J Med 356(14): 1432-7.
- Kibar, Z., K. J. Vogan, et al. (2001). "Ltap, a mammalian homolog of *Drosophila* Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail." Nat Genet 28(3): 251-5.
- Kiefer, J. C. (2007). "Back to basics: Sox genes." Dev Dyn 236(8): 2356-66.
- Kil, S. H., T. Lallier, et al. (1996). "Inhibition of cranial neural crest adhesion in vitro and migration in vivo using integrin antisense oligonucleotides." Dev Biol 179(1): 91-101.
- Kim, J. B., S. Islam, et al. (2000). "N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility." J Cell Biol 151(6): 1193-206.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, et al. (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." Dev Dyn 203(3): 253-310.
- Kimura, W., S. Yasugi, et al. (2006). "Fate and plasticity of the endoderm in the early chick embryo." Dev Biol 289(2): 283-95.
- King, N., C. T. Hittinger, et al. (2003). "Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins." Science 301(5631): 361-3.
- Kjoller, L. and A. Hall (1999). "Signaling to Rho GTPases." Exp Cell Res 253(1): 166-79.
- Klein, T. J. and M. Mlodzik (2005). "Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction." Annu Rev Cell Dev Biol 21: 155-76.
- Kloos, R. a. (1945). "Induction by medial and lateral pieces of the archenteron roof, with special reference to the determination of neural crest." Act. Neer. Morphol. 5: 362-384.
- Kos, R., M. V. Reedy, et al. (2001). "The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos." Development 128(8): 1467-79.
- Koshida, S., M. Shinya, et al. (2002). "Inhibition of BMP activity by the FGF signal promotes posterior neural development in zebrafish." Dev Biol 244(1): 9-20.
- LaBonne, C. and M. Bronner-Fraser (1998). "Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model." Development 125(13): 2403-14.
- Lallier, T. and M. Bronner-Fraser (1992). "Alpha 1 beta 1 integrin on neural crest cells recognizes some laminin substrata in a Ca(2+)-independent manner." J Cell Biol 119(5): 1335-45.

- Lallier, T. and M. Bronner-Fraser (1993). "Inhibition of neural crest cell attachment by integrin antisense oligonucleotides." *Science* 259(5095): 692-5.
- Larue, L., M. Ohsugi, et al. (1994). "E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17): 8263-7.
- Lawson, A., H. Anderson, et al. (2001). "Cellular mechanisms of neural fold formation and morphogenesis in the chick embryo." *Anat Rec* 262(2): 153-68.
- Le Douarin, N. M., J. Smith, et al. (1981). "From the neural crest to the ganglia of the peripheral nervous system." *Annu Rev Physiol* 43: 653-71.
- Le Douarin, N. M., M. A. Teillet, et al. (1998). "Neurulation in amniote vertebrates: a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras." *Int J Dev Biol* 42(7): 909-16.
- Le Douarin and Kalcheim (1999). The neural crest.
- Le Dreau, G., L. Garcia-Campmany, et al. (2012). "Canonical BMP7 activity is required for the generation of discrete neuronal populations in the dorsal spinal cord." *Development* 139(2): 259-68.
- Lee, H. and R. G. Nagele (1985). "Neural tube defects caused by local anesthetics in early chick embryos." *Teratology* 31(1): 119-27.
- Lei, Y. P., T. Zhang, et al. (2010). "VANGL2 mutations in human cranial neural-tube defects." *N Engl J Med* 362(23): 2232-5.
- Lemaire, P. and L. Kodjabachian (1996). "The vertebrate organizer: structure and molecules." *Trends Genet* 12(12): 525-31.
- Lemire, R. J. (1969). "Variations in development of the caudal neural tube in human embryos (Horizons XIV-XXI)." *Teratology* 2(4): 361-9.
- Liem, K. F., Jr., G. Tremml, et al. (1997). "A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord." *Cell* 91(1): 127-38.
- Liem, K. F., Jr., G. Tremml, et al. (1995). "Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm." *Cell* 82(6): 969-79.
- Light, W., A. E. Vernon, et al. (2005). "Xenopus Id3 is required downstream of Myc for the formation of multipotent neural crest progenitor cells." *Development* 132(8): 1831-41.
- Linder, E., S. Stenman, et al. (1978). "Distribution of fibronectin in human tissues and relationship to other connective tissue components." *Ann N Y Acad Sci* 312: 151-9.
- Linker, C. and C. D. Stern (2004). "Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists." *Development* 131(22): 5671-81.
- Litsiou, A., S. Hanson, et al. (2005). "A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head." *Development* 132(18): 4051-62.
- Liu, J., J. Qi, et al. (2008). "Effects of retinoic acid on the expressions of Vangl1 and vangl2 in mouse fetuses." *J Neurogenet* 22(3): 167-79.
- Liu, J. P. and T. M. Jessell (1998). "A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube." *Development* 125(24): 5055-67.
- Loeken, M. R. (2005). "Current perspectives on the causes of neural tube defects resulting from diabetic pregnancy." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135C(1): 77-87.
- Lowery, L. A. and H. Sive (2004). "Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation." *Mech Dev* 121(10): 1189-97.
- Lu, B., F. Roegiers, et al. (2001). "Adherens junctions inhibit asymmetric division in the *Drosophila* epithelium." *Nature* 409(6819): 522-5.
- Macfarlane, S. R., M. J. Seatter, et al. (2001). "Proteinase-activated receptors." *Pharmacol Rev* 53(2): 245-82.
- Maher, M. T., A. S. Flozak, et al. (2009). "Activity of the beta-catenin phosphodestruction complex at cell-cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion." *J Cell Biol* 186(2): 219-28.

- Mancilla, A. and R. Mayor (1996). "Neural crest formation in *Xenopus laevis*: mechanisms of Xslug induction." Dev Biol 177(2): 580-9.
- Marambaud, P., J. Shioi, et al. (2002). "A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions." Embo J 21(8): 1948-56.
- Marambaud, P., P. H. Wen, et al. (2003). "A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations." Cell 114(5): 635-45.
- Marchant, L., C. Linker, et al. (1998). "The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient." Dev Biol 198(2): 319-29.
- Maretzky, T., K. Reiss, et al. (2005). "ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation." Proc Natl Acad Sci U S A 102(26): 9182-7.
- Marlow, F., F. Zwartkruis, et al. (1998). "Functional interactions of genes mediating convergent extension, knypek and trilobite, during the partitioning of the eye primordium in zebrafish." Dev Biol 203(2): 382-99.
- Martinez-Morales, P. L., R. Diez del Corral, et al. (2011). "FGF and retinoic acid activity gradients control the timing of neural crest cell emigration in the trunk." J Cell Biol 194(3): 489-503.
- Martins-Green, M. (1988). "Origin of the dorsal surface of the neural tube by progressive delamination of epidermal ectoderm and neuroepithelium: implications for neurulation and neural tube defects." Development 103(4): 687-706.
- Martins-Green, M. and C. A. Erickson (1986). "Development of neural tube basal lamina during neurulation and neural crest cell emigration in the trunk of the mouse embryo." J Embryol Exp Morphol 98: 219-36.
- Massari, M. E. and C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." Mol Cell Biol 20(2): 429-40.
- Matise, M. P. and H. Wang (2011). "Sonic hedgehog signaling in the developing CNS where it has been and where it is going." Curr Top Dev Biol 97: 75-117.
- Matsumata, M., M. Uchikawa, et al. (2005). "Multiple N-cadherin enhancers identified by systematic functional screening indicate its Group B1 SOX-dependent regulation in neural and placodal development." Dev Biol 286(2): 601-17.
- Mayor, R., R. Morgan, et al. (1995). "Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*." Development 121(3): 767-77.
- McCrea, P. D., D. Gu, et al. (2009). "Junctional music that the nucleus hears: cell-cell contact signaling and the modulation of gene activity." Cold Spring Harb Perspect Biol 1(4): a002923.
- McLarren, K. W., A. Litsiou, et al. (2003). "DLX5 positions the neural crest and preplacode region at the border of the neural plate." Dev Biol 259(1): 34-47.
- Menegola, E., M. L. Broccia, et al. (2005). "Craniofacial and axial skeletal defects induced by the fungicide triadimefon in the mouse." Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 74(2): 185-95.
- Merlo, G. R., B. Zerega, et al. (2000). "Multiple functions of *Dlx* genes." Int J Dev Biol 44(6): 619-26.
- Mitchell, L. E. (2005). "Epidemiology of neural tube defects." Am J Med Genet C Semin Med Genet 135C(1): 88-94.
- Mitchell, L. E., N. S. Adzick, et al. (2004). "Spina bifida." Lancet 364(9448): 1885-95.
- Monsoro-Burq, A. H., R. B. Fletcher, et al. (2003). "Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals." Development 130(14): 3111-24.

- Monsoro-Burq, A. H., E. Wang, et al. (2005). "Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during *Xenopus* neural crest induction." *Dev Cell* 8(2): 167-78.
- Moretti, M. E., B. Bar-Oz, et al. (2005). "Maternal hyperthermia and the risk for neural tube defects in offspring: systematic review and meta-analysis." *Epidemiology* 16(2): 216-9.
- Morriss-Kay, G. and F. Tuckett (1985). "The role of microfilaments in cranial neurulation in rat embryos: effects of short-term exposure to cytochalasin D." *J Embryol Exp Morphol* 88: 333-48.
- Morriss-Kay, G., H. Wood, et al. (1994). "Normal neurulation in mammals." *Ciba Found Symp* 181: 51-63; discussion 63-9.
- Moury, J. D. and A. G. Jacobson (1989). "Neural fold formation at newly created boundaries between neural plate and epidermis in the axolotl." *Dev Biol* 133(1): 44-57.
- Moury, J. D. and G. C. Schoenwolf (1995). "Cooperative model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: autonomous movements of the neural plate, autonomous movements of the epidermis, and interactions in the neural plate/epidermis transition zone." *Dev Dyn* 204(3): 323-37.
- Muhr, J., T. M. Jessell, et al. (1997). "Assignment of early caudal identity to neural plate cells by a signal from caudal paraxial mesoderm." *Neuron* 19(3): 487-502.
- Muller, F. and R. O'Rahilly (1987). "The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of secondary neurulation at stage 12." *Anat Embryol (Berl)* 176(4): 413-30.
- Muller, F. and R. O'Rahilly (1988). "The development of the human brain from a closed neural tube at stage 13." *Anat Embryol (Berl)* 177(3): 203-24.
- Murdoch, J. N., R. A. Rachel, et al. (2001). "Circletail, a new mouse mutant with severe neural tube defects: chromosomal localization and interaction with the loop-tail mutation." *Genomics* 78(1-2): 55-63.
- Murray, S. A. and T. Gridley (2006). "Snail family genes are required for left-right asymmetry determination, but not neural crest formation, in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(27): 10300-4.
- Nakagawa, S. and M. Takeichi (1995). "Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins." *Development* 121(5): 1321-32.
- Nakagawa, S. and M. Takeichi (1998). "Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression." *Development* 125(15): 2963-71.
- Nakatsu, T., C. Uwabe, et al. (2000). "Neural tube closure in humans initiates at multiple sites: evidence from human embryos and implications for the pathogenesis of neural tube defects." *Anat Embryol (Berl)* 201(6): 455-66.
- Nakaya, Y., E. W. Sukowati, et al. (2008). "RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation." *Nat Cell Biol* 10(7): 765-75.
- Newgreen, D. F., M. E. Powell, et al. (1990). "Spatiotemporal changes in HNK-1/L2 glycoconjugates on avian embryo somite and neural crest cells." *Dev Biol* 139(1): 100-20.
- Nichols, S. A., W. Dirks, et al. (2006). "Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33): 12451-6.
- Nicolet, G. (1971). "The young notochord can induce somite genesis by means of diffusible substances in the chick." *Experientia* 27(8): 938-9.
- Nieto, M. A. (2002). "The snail superfamily of zinc-finger transcription factors." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3): 155-66.

- Nieto, M. A., M. F. Bennett, et al. (1992). "Cloning and developmental expression of Sna, a murine homologue of the Drosophila snail gene." Development 116(1): 227-37.
- Nieto, M. A., M. G. Sargent, et al. (1994). "Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene." Science 264(5160): 835-9.
- Nievelstein, R. A., N. G. Hartwig, et al. (1993). "Embryonic development of the mammalian caudal neural tube." Teratology 48(1): 21-31.
- Njamnshi, A. K., P. Djientcheu Vde, et al. (2008). "Neural tube defects are rare among black Americans but not in sub-Saharan black Africans: the case of Yaounde - Cameroon." J Neurol Sci 270(1-2): 13-7.
- Nollet, F., P. Kools, et al. (2000). "Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members." J Mol Biol 299(3): 551-72.
- Noren, N. K., B. P. Liu, et al. (2000). "p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases." J Cell Biol 150(3): 567-80.
- Nose, A., A. Nagafuchi, et al. (1988). "Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems." Cell 54(7): 993-1001.
- Oda, H., S. Tsukita, et al. (1998). "Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during Drosophila gastrulation." Dev Biol 203(2): 435-50.
- Odenthal, J. and C. Nusslein-Volhard (1998). "fork head domain genes in zebrafish." Dev Genes Evol 208(5): 245-58.
- O'Rahilly, R. and F. Muller (1994). "Neurulation in the normal human embryo." Ciba Found Symp 181: 70-82; discussion 82-9.
- O'Rahilly, R. and F. Muller (2002). "The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo." Teratology 65(4): 162-70.
- O'Rourke, M. P. and P. P. Tam (2002). "Twist functions in mouse development." Int J Dev Biol 46(4): 401-13.
- O'Shea, K. S. and L. H. Liu (1987). "Basal lamina and extracellular matrix alterations in the caudal neural tube of the delayed Splotch embryo." Brain Res 465(1-2): 11-20.
- Osorio, L., M. A. Teillet, et al. (2009). "Neural crest ontogeny during secondary neurulation: a gene expression pattern study in the chick embryo." Int J Dev Biol 53(4): 641-8.
- Ossovskaya, V. S. and N. W. Bunnnett (2004). "Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease." Physiol Rev 84(2): 579-621.
- Panda, D. K., D. Miao, et al. (2001). "The transcription factor SOX9 regulates cell cycle and differentiation genes in chondrocytic CFK2 cells." J Biol Chem 276(44): 41229-36.
- Papan, C. and J. A. Campos-Ortega (1999). "Region-specific cell clones in the developing spinal cord of the zebrafish." Dev Genes Evol 209(3): 135-44.
- Papin, C., L. A. van Grunsven, et al. (2002). "Dynamic regulation of Brachyury expression in the amphibian embryo by XSIP1." Mech Dev 111(1-2): 37-46.
- Park, C. H., W. Stewart, et al. (1992). "Is there etiologic heterogeneity between upper and lower neural tube defects?" Am J Epidemiol 136(12): 1493-501.
- Park, K. S. and B. M. Gumbiner (2010). "Cadherin 6B induces BMP signaling and de-epithelialization during the epithelial mesenchymal transition of the neural crest." Development 137(16): 2691-701.
- Pasteels (1937). "Etudes sur la gastrulation des vertébrés méroblastiques.III.Oiseaux.IVConclusions générales." Arch.Biol. 48: 381-488.
- Pece, S. and J. S. Gutkind (2000). "Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation." J Biol Chem 275(52): 41227-33.
- Peinado, H., D. Olmeda, et al. (2007). "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" Nat Rev Cancer 7(6): 415-28.



- Peinado, H., F. Portillo, et al. (2005). "Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta." Cell Cycle 4(12): 1749-52.
- Pera, E., S. Stein, et al. (1999). "Ectodermal patterning in the avian embryo: epidermis versus neural plate." Development 126(1): 63-73.
- Perez-Pomares, J. M. (2008). "Myocardial-coronary interactions: against the canon." Circ Res 102(5): 513-5.
- Pevny, L. H. and R. Lovell-Badge (1997). "Sox genes find their feet." Curr Opin Genet Dev 7(3): 338-44.
- Peyrieras, N., F. Hyafil, et al. (1983). "Uvomorulin: a nonintegral membrane protein of early mouse embryo." Proc Natl Acad Sci U S A 80(20): 6274-7.
- Piedra, J., S. Miravet, et al. (2003). "p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction." Mol Cell Biol 23(7): 2287-97.
- Pituello, F., G. Yamada, et al. (1995). "Activin A inhibits Pax-6 expression and perturbs cell differentiation in the developing spinal cord in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 92(15): 6952-6.
- Postigo, A. A. and D. C. Dean (2000). "Differential expression and function of members of the zfh-1 family of zinc finger/homeodomain repressors." Proc Natl Acad Sci U S A 97(12): 6391-6.
- Postigo, A. A., J. L. Depp, et al. (2003). "Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins." Embo J 22(10): 2453-62.
- Puelles, L., G. Domenech-Ratto, et al. (1987). "Location of the rostral end of the longitudinal brain axis: review of an old topic in the light of marking experiments on the closing rostral neuropore." J Morphol 194(2): 163-71.
- Pyrgaki, C., P. Trainor, et al. (2010). "Dynamic imaging of mammalian neural tube closure." Dev Biol 344(2): 941-7.
- Pytel, A., M. Bruska, et al. (2007). "Evidence that the caudal portion of the neural tube develops by cavitation of a neural cord in the caudal eminence of human embryos." Folia Morphol (Warsz) 66(2): 104-8.
- Radice, G. L., H. Rayburn, et al. (1997). "Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin." Dev Biol 181(1): 64-78.
- Ray, J. G., P. R. Wyatt, et al. (2005). "Greater maternal weight and the ongoing risk of neural tube defects after folic acid flour fortification." Obstet Gynecol 105(2): 261-5.
- Reiss, K., T. Maretzky, et al. (2005). "ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling." Embo J 24(4): 742-52.
- Remacle, J. E., H. Kraft, et al. (1999). "New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites." Embo J 18(18): 5073-84.
- Rhee, J., T. Buchan, et al. (2007). "Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription." Nat Cell Biol 9(8): 883-92.
- Robinson, A., S. Escuin, et al. (2012). "Mutations in the planar cell polarity genes CELSR1 and SCRIB are associated with the severe neural tube defect craniorachischisis." Hum Mutat 33(2): 440-7.
- Rollhauser-ter Horst, J. (1979). "Artificial neural crest formation in amphibia." Anat Embryol (Berl) 157(1): 113-20.
- Rosenquist, G. C. (1983). "The chorda center in Hensen's node of the chick embryo." Anat Rec 207(2): 349-55.

- Rouso, D. L., C. A. Pearson, et al. (2012). "Foxp-mediated suppression of N-cadherin regulates neuroepithelial character and progenitor maintenance in the CNS." Neuron 74(2): 314-30.
- Rutishauser, U. and T. M. Jessell (1988). "Cell adhesion molecules in vertebrate neural development." Physiol Rev 68(3): 819-57.
- Saitou, H. and K. Shiota (2008). "Involvement of the axially condensed tail bud mesenchyme in normal and abnormal human posterior neural tube development." Congenit Anom (Kyoto) 48(1): 1-6.
- Saitou, H., S. Yamada, et al. (2004). "Development of the posterior neural tube in human embryos." Anat Embryol (Berl) 209(2): 107-17.
- Sakai, D., Y. Tanaka, et al. (2005). "Regulation of Slug transcription in embryonic ectoderm by beta-catenin-Lef/Tcf and BMP-Smad signaling." Dev Growth Differ 47(7): 471-82.
- Sakai, Y., C. Meno, et al. (2001). "The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo." Genes Dev 15(2): 213-25.
- Saraga-Babic, M., D. Sapunar, et al. (1995). "Variations in the formation of the human caudal spinal cord." J Hirnforsch 36(3): 341-7.
- Sasai, N., K. Mizuseki, et al. (2001). "Requirement of FoxD3-class signaling for neural crest determination in *Xenopus*." Development 128(13): 2525-36.
- Sasai, Y. and E. M. De Robertis (1997). "Ectodermal patterning in vertebrate embryos." Dev Biol 182(1): 5-20.
- Sasai, Y., B. Lu, et al. (1994). "Xenopus chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes." Cell 79(5): 779-90.
- Sato, T., N. Sasai, et al. (2005). "Neural crest determination by co-activation of Pax3 and Zic1 genes in *Xenopus* ectoderm." Development 132(10): 2355-63.
- Satokata, I. and R. Maas (1994). "Mx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development." Nat Genet 6(4): 348-56.
- Sauka-Spengler, T. and M. Bronner-Fraser (2008). "A gene regulatory network orchestrates neural crest formation." Nat Rev Mol Cell Biol 9(7): 557-68.
- Sausedo, R. A. and G. C. Schoenwolf (1993). "Cell behaviors underlying notochord formation and extension in avian embryos: quantitative and immunocytochemical studies." Anat Rec 237(1): 58-70.
- Sausedo, R. A. and G. C. Schoenwolf (1994). "Quantitative analyses of cell behaviors underlying notochord formation and extension in mouse embryos." Anat Rec 239(1): 103-12.
- Sausedo, R. A., J. L. Smith, et al. (1997). "Role of nonrandomly oriented cell division in shaping and bending of the neural plate." J Comp Neurol 381(4): 473-88.
- Schlosser, G. (2010). "Making sense development of vertebrate cranial placodes." Int Rev Cell Mol Biol 283: 129-234.
- Schoenwolf, G. C. (1979). "Observations on closure of the neuropores in the chick embryo." Am J Anat 155(4): 445-65.
- Schoenwolf, G. C. (1984). "Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos." Am J Anat 169(4): 361-76.
- Schoenwolf, G. C. (1992). "Morphological and mapping studies of the paranodal and postnodal levels of the neural plate during chick neurulation." Anat Rec 233(2): 281-90.
- Schoenwolf, G. C. and I. S. Alvarez (1989). "Roles of neuroepithelial cell rearrangement and division in shaping of the avian neural plate." Development 106(3): 427-39.
- Schoenwolf, G. C., N. B. Chandler, et al. (1985). "Analysis of the origins and early fates of neural crest cells in caudal regions of avian embryos." Dev Biol 110(2): 467-79.

- Schoenwolf, G. C. and J. Delongo (1980). "Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo." Am J Anat 158(1): 43-63.
- Schoenwolf, G. C., S. Everaert, et al. (1989). "Neural plate- and neural tube-forming potential of isolated epiblast areas in avian embryos." Anat Embryol (Berl) 179(6): 541-9.
- Schoenwolf, G. C., D. Folsom, et al. (1988). "A reexamination of the role of microfilaments in neurulation in the chick embryo." Anat Rec 220(1): 87-102.
- Schoenwolf, G. C. and M. V. Franks (1984). "Quantitative analyses of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate." Dev Biol 105(2): 257-72.
- Schoenwolf, G. C. and R. O. Kelley (1980). "Characterization of intercellular junctions in the caudal portion of the developing neural tube of the chick embryo." Am J Anat 158(1): 29-41.
- Schoenwolf, G. C. and M. L. Powers (1987). "Shaping of the chick neuroepithelium during primary and secondary neurulation: role of cell elongation." Anat Rec 218(2): 182-95.
- Schoenwolf, G. C. and J. L. Smith (1990). "Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances." Development 109(2): 243-70.
- Schroeder, T. E. (1970). "Neurulation in *Xenopus laevis*. An analysis and model based upon light and electron microscopy." J Embryol Exp Morphol 23(2): 427-62.
- Sela-Donenfeld, D. and C. Kalcheim (1999). "Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube." Development 126(21): 4749-62.
- Selleck, M. A. and M. Bronner-Fraser (1995). "Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions." Development 121(2): 525-38.
- Selleck, M. A., M. I. Garcia-Castro, et al. (1998). "Effects of Shh and Noggin on neural crest formation demonstrate that BMP is required in the neural tube but not ectoderm." Development 125(24): 4919-30.
- Selleck, M. A. and C. D. Stern (1991). "Fate mapping and cell lineage analysis of Hensen's node in the chick embryo." Development 112(2): 615-26.
- Seller, M. J. (1990). "Neural tube defects: are neurulation and canalization forms causally distinct?" Am J Med Genet 35(3): 394-6.
- Seller, M. J. (1995). "Multi-site neural tube closure in humans and maternal folate supplementation." Am J Med Genet 58(3): 222-4.
- Sepulveda, W., E. Corral, et al. (2004). "Chromosomal abnormalities in fetuses with open neural tube defects: prenatal identification with ultrasound." Ultrasound Obstet Gynecol 23(4): 352-6.
- Sheng, G., M. dos Reis, et al. (2003). "Churchill, a zinc finger transcriptional activator, regulates the transition between gastrulation and neurulation." Cell 115(5): 603-13.
- Shimizu, T., T. Yabe, et al. (2005). "E-cadherin is required for gastrulation cell movements in zebrafish." Mech Dev 122(6): 747-63.
- Shimokita, E. and Y. Takahashi (2011). "Secondary neurulation: Fate-mapping and gene manipulation of the neural tube in tail bud." Dev Growth Differ 53(3): 401-10.
- Shin, K., V. C. Fogg, et al. (2006). "Tight junctions and cell polarity." Annu Rev Cell Dev Biol 22: 207-35.
- Shoval, I., A. Ludwig, et al. (2007). "Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination." Development 134(3): 491-501.
- Shum, A. S., L. S. Tang, et al. (2010). "Lack of motor neuron differentiation is an intrinsic property of the mouse secondary neural tube." Dev Dyn 239(12): 3192-203.
- Simons, M. and M. Mlodzik (2008). "Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease." Annu Rev Genet 42: 517-40.

- Sinclair, A. H., P. Berta, et al. (1990). "A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif." Nature 346(6281): 240-4.
- Skaper, S. D., S. E. Moore, et al. (2001). "Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues." Prog Neurobiol 65(6): 593-608.
- Smith, J. L. and G. C. Schoenwolf (1987). "Cell cycle and neuroepithelial cell shape during bending of the chick neural plate." Anat Rec 218(2): 196-206.
- Smith, J. L. and G. C. Schoenwolf (1988). "Role of cell-cycle in regulating neuroepithelial cell shape during bending of the chick neural plate." Cell Tissue Res 252(3): 491-500.
- Smith, J. L. and G. C. Schoenwolf (1989). "Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation." J Exp Zool 250(1): 49-62.
- Soo, K., M. P. O'Rourke, et al. (2002). "Twist function is required for the morphogenesis of the cephalic neural tube and the differentiation of the cranial neural crest cells in the mouse embryo." Dev Biol 247(2): 251-70.
- Spemann and Mangold (1924). "Uber induktion von embryonalanlagen durch implantation artfremder organisatoren." Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org. 100: 500-638.
- Spemann (1938). "Embryonic Development and Induction." New Haven, Yale University Press.
- Spratt (1946). "Formation of the primitive streak in the explanted chick blastoderm marked with carbon particles." J Exp Zool 103 (2): 259-304.
- Spratt (1947). "Localization of the prospective neural plate in the primitive streak blastoderm of the chick." Anat. Rec. 99: 654.
- Spratt, N. T., Jr. and L. Condon (1947). "Localization of prospective chorda and somite mesoderm during regression of the primitive streak in the chick blastoderm." Anat Rec 99(4): 653.
- Steinberg, M. S. and M. Takeichi (1994). "Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression." Proc Natl Acad Sci U S A 91(1): 206-9.
- Stepniak, E., G. L. Radice, et al. (2009). "Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development." Cold Spring Harb Perspect Biol 1(5): a002949.
- Stern, C. D. (2004). Gastrulation : from Cells to Embryo.
- Stewart, R. A., B. L. Arduini, et al. (2006). "Zebrafish foxd3 is selectively required for neural crest specification, migration and survival." Dev Biol 292(1): 174-88.
- Storey, K. G., A. Goriely, et al. (1998). "Early posterior neural tissue is induced by FGF in the chick embryo." Development 125(3): 473-84.
- Streit, A., K. J. Lee, et al. (1998). "Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick embryo." Development 125(3): 507-19.
- Strutt, D. (2003). "Frizzled signalling and cell polarisation in Drosophila and vertebrates." Development 130(19): 4501-13.
- Strutt, D. and H. Strutt (2007). "Differential activities of the core planar polarity proteins during Drosophila wing patterning." Dev Biol 302(1): 181-94.
- Strutt, H. and D. Strutt (2008). "Differential stability of flamingo protein complexes underlies the establishment of planar polarity." Curr Biol 18(20): 1555-64.
- Suyama, K., I. Shapiro, et al. (2002). "A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor." Cancer Cell 2(4): 301-14.
- Tada, M. and J. C. Smith (2000). "Xwnt11 is a target of Xenopus Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway." Development 127(10): 2227-38.

- Takeichi, M. (1988). "The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis." *Development* 102(4): 639-55.
- Takemoto, T., M. Uchikawa, et al. (2011). "Tbx6-dependent Sox2 regulation determines neural or mesodermal fate in axial stem cells." *Nature* 470(7334): 394-8.
- Takeuchi, M., J. Nakabayashi, et al. (2003). "The prickle-related gene in vertebrates is essential for gastrulation cell movements." *Curr Biol* 13(8): 674-9.
- Tanabe, Y. and T. M. Jessell (1996). "Diversity and pattern in the developing spinal cord." *Science* 274(5290): 1115-23.
- Tanaka, E. M. and P. W. Reddien (2011). "The cellular basis for animal regeneration." *Dev Cell* 21(1): 172-85.
- Taneyhill, L. A. (2008). "To adhere or not to adhere: the role of Cadherins in neural crest development." *Cell Adh Migr* 2(4): 223-30.
- Taneyhill, L. A., E. G. Coles, et al. (2007). "Snail2 directly represses cadherin6B during epithelial-to-mesenchymal transitions of the neural crest." *Development* 134(8): 1481-90.
- Tavares, A. T., J. C. Izpisua-Belmonte, et al. (2001). "Developmental expression of chick twist and its regulation during limb patterning." *Int J Dev Biol* 45(5-6): 707-13.
- Tawk, M., C. Araya, et al. (2007). "A mirror-symmetric cell division that orchestrates neuroepithelial morphogenesis." *Nature* 446(7137): 797-800.
- Teillet, M. A., C. Kalcheim, et al. (1987). "Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells." *Dev Biol* 120(2): 329-47.
- Teillet, M. A., F. Lapointe, et al. (1998). "The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revisited." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20): 11733-8.
- Theveneau, E., J. L. Duband, et al. (2007). "Ets-1 confers cranial features on neural crest delamination." *PLoS One* 2(11): e1142.
- Theveneau, E. and R. Mayor (2012). "Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration." *Dev Biol* 366(1): 34-54.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." *Nat Rev Cancer* 2(6): 442-54.
- Thiery, J. P., H. Acloque, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." *Cell* 139(5): 871-90.
- Thiery, J. P., A. Delouree, et al. (1984). "Ontogenetic expression of cell adhesion molecules: L-CAM is found in epithelia derived from the three primary germ layers." *Dev Biol* 102(1): 61-78.
- Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(2): 131-42.
- Thomson, M., S. J. Liu, et al. (2011). "Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers." *Cell* 145(6): 875-89.
- Torban, E., C. Kor, et al. (2004). "Van Gogh-like2 (Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates." *Trends Genet* 20(11): 570-7.
- Torban, E., A. M. Patenaude, et al. (2008). "Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(9): 3449-54.
- Tree, D. R., D. Ma, et al. (2002). "A three-tiered mechanism for regulation of planar cell polarity." *Semin Cell Dev Biol* 13(3): 217-24.
- Tribulo, C., M. J. Aybar, et al. (2003). "Regulation of Msx genes by a Bmp gradient is essential for neural crest specification." *Development* 130(26): 6441-52.

- Tucker, G. C., H. Aoyama, et al. (1984). "Identical reactivity of monoclonal antibodies HNK-1 and NC-1: conservation in vertebrates on cells derived from the neural primordium and on some leukocytes." Cell Differ 14(3): 223-30.
- Uchikawa, M., Y. Ishida, et al. (2003). "Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals." Dev Cell 4(4): 509-19.
- Uchikawa, M., Y. Kamachi, et al. (1999). "Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken." Mech Dev 84(1-2): 103-20.
- Uchikawa, M., M. Yoshida, et al. (2011). "B1 and B2 Sox gene expression during neural plate development in chicken and mouse embryos: universal versus species-dependent features." Dev Growth Differ 53(6): 761-71.
- Usui, T., Y. Shima, et al. (1999). "Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled." Cell 98(5): 585-95.
- Vallin, J., R. Thuret, et al. (2001). "Cloning and characterization of three *Xenopus* slug promoters reveal direct regulation by Lef/beta-catenin signaling." J Biol Chem 276(32): 30350-8.
- Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey (1997). "Rho GTPases and signaling networks." Genes Dev 11(18): 2295-322.
- Van Allen, M. I., D. K. Kalousek, et al. (1993). "Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans." Am J Med Genet 47(5): 723-43.
- van Buul, J. D., E. C. Anthony, et al. (2005). "Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) mediates vascular endothelial-cadherin-based cell-cell adhesion by regulating beta-catenin tyrosine phosphorylation." J Biol Chem 280(22): 21129-36.
- Van de Putte, T., A. Francis, et al. (2007). "Neural crest-specific removal of *Zfhx1b* in mouse leads to a wide range of neurocristopathies reminiscent of Mowat-Wilson syndrome." Hum Mol Genet 16(12): 1423-36.
- Van de Putte, T., M. Maruhashi, et al. (2003). "Mice lacking *ZFHX1B*, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome." Am J Hum Genet 72(2): 465-70.
- van de Wetering, M., M. Oosterwegel, et al. (1993). "Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes." Embo J 12(10): 3847-54.
- van Grunsven, L. A., C. Papin, et al. (2000). "XSIP1, a *Xenopus* zinc finger/homeodomain encoding gene highly expressed during early neural development." Mech Dev 94(1-2): 189-93.
- van Grunsven, L. A., V. Taelman, et al. (2007). "XSip1 neuralizing activity involves the co-repressor CtBP and occurs through BMP dependent and independent mechanisms." Dev Biol 306(1): 34-49.
- van Straaten, H. W. and J. W. Hekking (1991). "Development of floor plate, neurons and axonal outgrowth pattern in the early spinal cord of the notochord-deficient chick embryo." Anat Embryol (Berl) 184(1): 55-63.
- van Straaten, H. W., J. W. Hekking, et al. (1988). "Effect of the notochord on the differentiation of a floor plate area in the neural tube of the chick embryo." Anat Embryol (Berl) 177(4): 317-24.
- Van Straaten, H. W., H. C. Janssen, et al. (1996). "Neural tube closure in the chick embryo is multiphasic." Dev Dyn 207(3): 309-18.
- Vandewalle, C., J. Comijn, et al. (2005). "SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions." Nucleic Acids Res 33(20): 6566-78.

- Vandewalle, C., F. Van Roy, et al. (2009). "The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease." Cell Mol Life Sci 66(5): 773-87.
- Varner, V. D., D. A. Voronov, et al. (2010). "Mechanics of head fold formation: investigating tissue-level forces during early development." Development 137(22): 3801-11.
- Veeman, M. T., J. D. Axelrod, et al. (2003). "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." Dev Cell 5(3): 367-77.
- Vega, S., A. V. Morales, et al. (2004). "Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death." Genes Dev 18(10): 1131-43.
- Verschuere, K. and D. Huylebroeck (1999). "Remarkable versatility of Smad proteins in the nucleus of transforming growth factor-beta activated cells." Cytokine Growth Factor Rev 10(3-4): 187-99.
- Vieira, A. R. and S. Castillo Taucher (2005). "[Maternal age and neural tube defects: evidence for a greater effect in spina bifida than in anencephaly]." Rev Med Chil 133(1): 62-70.
- Villanueva, S., A. Glavic, et al. (2002). "Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction." Dev Biol 241(2): 289-301.
- Vincent, M. and J. P. Thiery (1984). "A cell surface marker for neural crest and placodal cells: further evolution in peripheral and central nervous system." Dev Biol 103(2): 468-81.
- Wakamatsu, N., Y. Yamada, et al. (2001). "Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease." Nat Genet 27(4): 369-70.
- Wakamatsu, Y., Y. Endo, et al. (2004). "Multiple roles of Sox2, an HMG-box transcription factor in avian neural crest development." Dev Dyn 229(1): 74-86.
- Wallingford, J. B. (2005). "Neural tube closure and neural tube defects: studies in animal models reveal known knowns and known unknowns." Am J Med Genet C Semin Med Genet 135C(1): 59-68.
- Wallingford, J. B. (2006). "Planar cell polarity, ciliogenesis and neural tube defects." Hum Mol Genet 15 Spec No 2: R227-34.
- Wallingford, J. B. and R. M. Harland (2002). "Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline." Development 129(24): 5815-25.
- Wallingford, J. B., B. A. Rowling, et al. (2000). "Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation." Nature 405(6782): 81-5.
- Wang, F., K. Dumstrei, et al. (2004). "The role of DE-cadherin during cellularization, germ layer formation and early neurogenesis in the *Drosophila* embryo." Dev Biol 270(2): 350-63.
- Wang, Y. and J. Nathans (2007). "Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions." Development 134(4): 647-58.
- Wartiovaara, J., I. Leivo, et al. (1978). "Cell surface and extracellular matrix glycoprotein fibronectin: expression in embryogenesis and in teratocarcinoma differentiation." Ann N Y Acad Sci 312: 132-41.
- Watterson (1965). "Structure and mitotic behavior of the early neural tube." organogenesis: 129-159.
- Wawersik, S., C. Evola, et al. (2005). "Conditional BMP inhibition in *Xenopus* reveals stage-specific roles for BMPs in neural and neural crest induction." Dev Biol 277(2): 425-42.
- Wegner, M. (1999). "From head to toes: the multiple facets of Sox proteins." Nucleic Acids Res 27(6): 1409-20.
- Weil, M., M. D. Jacobson, et al. (1997). "Is programmed cell death required for neural tube closure?" Curr Biol 7(4): 281-4.
- Weinstein, D. C. and A. Hemmati-Brivanlou (1999). "Neural induction." Annu Rev Cell Dev Biol 15: 411-33.

- Werner, T., A. Hammer, et al. (2007). "Multiple conserved regulatory elements with overlapping functions determine Sox10 expression in mouse embryogenesis." Nucleic Acids Res 35(19): 6526-38.
- Wheelock, M. J., C. A. Buck, et al. (1987). "Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion." J Cell Biochem 34(3): 187-202.
- Wheelock, M. J. and K. R. Johnson (2003). "Cadherin-mediated cellular signaling." Curr Opin Cell Biol 15(5): 509-14.
- Wilkinson, D. G., S. Bhatt, et al. (1990). "Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation." Nature 343(6259): 657-9.
- Williams, E. J., J. Furness, et al. (1994). "Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin." Neuron 13(3): 583-94.
- Williams, E. J., G. Williams, et al. (2001). "Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth." J Biol Chem 276(47): 43879-86.
- Williams, G., E. J. Williams, et al. (2002). "Dimeric versions of two short N-cadherin binding motifs (HAVDI and INPISG) function as N-cadherin agonists." J Biol Chem 277(6): 4361-7.
- Wilson, S. I. and T. Edlund (2001). "Neural induction: toward a unifying mechanism." Nat Neurosci 4 Suppl: 1161-8.
- Wilson, V., I. Olivera-Martinez, et al. (2009). "Stem cells, signals and vertebrate body axis extension." Development 136(10): 1591-604.
- Woda, J. M., J. Pastagia, et al. (2003). "Dlx proteins position the neural plate border and determine adjacent cell fates." Development 130(2): 331-42.
- Woo, K. and S. E. Fraser (1998). "Specification of the hindbrain fate in the zebrafish." Dev Biol 197(2): 283-96.
- Wood, L. R. and M. T. Smith (1984). "Generation of anencephaly: 1. Aberrant neurulation and 2. Conversion of exencephaly to anencephaly." J Neuropathol Exp Neurol 43(6): 620-33.
- Wright, E. M., B. Snopek, et al. (1993). "Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development." Nucleic Acids Res 21(3): 744.
- Wu, G., X. Huang, et al. (2011). "Roles of planar cell polarity pathways in the development of neural [correction of neural] tube defects." J Biomed Sci 18: 66.
- Wu, M., D. F. Chen, et al. (1996). "Neural tube defects and abnormal brain development in F52-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A 93(5): 2110-5.
- Wyszynski (2005). "Neural Tube Defects : From Origin to treatment."
- Yagi, T. and M. Takeichi (2000). "Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity." Genes Dev 14(10): 1169-80.
- Yamada, K., Y. Yamada, et al. (2001). "Nonsense and frameshift mutations in ZFHX1B, encoding Smad-interacting protein 1, cause a complex developmental disorder with a great variety of clinical features." Am J Hum Genet 69(6): 1178-85.
- Yamada, T., M. Placzek, et al. (1991). "Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord." Cell 64(3): 635-47.
- Yamaguchi, H., T. Niimi, et al. (1999). "Brachyury (T) expression in embryonal carcinoma P19 cells resembles its expression in primitive streak and tail-bud but not that in notochord." Dev Growth Differ 41(3): 253-64.
- Yamaguchi, Y., N. Shinotsuka, et al. (2011). "Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure." J Cell Biol 195(6): 1047-60.
- Yamashita, Y. M., D. L. Jones, et al. (2003). "Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome." Science 301(5639): 1547-50.



- Yan, Y. L., J. Willoughby, et al. (2005). "A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish *sox9* co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development." Development 132(5): 1069-83.
- Yang, D. C., C. C. Tsai, et al. (2011). "Twist controls skeletal development and dorsoventral patterning by regulating *runx2* in zebrafish." PLoS One 6(11): e27324.
- Yang, H. J., K. C. Wang, et al. (2003). "Neural differentiation of caudal cell mass (secondary neurulation) in chick embryos: Hamburger and Hamilton Stages 16-45." Brain Res Dev Brain Res 142(1): 31-6.
- Yang, L., H. Zhang, et al. (1998). "An early phase of embryonic *Dlx5* expression defines the rostral boundary of the neural plate." J Neurosci 18(20): 8322-30.
- Ybot-Gonzalez, P., P. Cogram, et al. (2002). "Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure." Development 129(10): 2507-17.
- Ybot-Gonzalez, P. and A. J. Copp (1999). "Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments." Dev Dyn 215(3): 273-83.
- Ybot-Gonzalez, P., C. Gaston-Massuet, et al. (2007). "Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling." Development 134(17): 3203-11.
- Yin, T., S. Getsios, et al. (2005). "Mechanisms of plakoglobin-dependent adhesion: desmosome-specific functions in assembly and regulation by epidermal growth factor receptor." J Biol Chem 280(48): 40355-63.
- Yoshida, C. and M. Takeichi (1982). "Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation." Cell 28(2): 217-24.
- Zhou, B. P., J. Deng, et al. (2004). "Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition." Nat Cell Biol 6(10): 931-40.
- Zhou, W., L. Lin, et al. (2007). "Modulation of morphogenesis by noncanonical Wnt signaling requires ATF/CREB family-mediated transcriptional activation of *TGFbeta2*." Nat Genet 39(10): 1225-34.
- Zhurinsky, J., M. Shtutman, et al. (2000). "Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin." Mol Cell Biol 20(12): 4238-52.
- Zohn, I. E., C. R. Chesnutt, et al. (2003). "Cell polarity pathways converge and extend to regulate neural tube closure." Trends Cell Biol 13(9): 451-4.
- Zolessi, F. R. and C. Arruti (2001). "Apical accumulation of MARCKS in neural plate cells during neurulation in the chick embryo." BMC Dev Biol 1: 7.
- Zweier, C., B. Albrecht, et al. (2002). "'Mowat-Wilson' syndrome with and without Hirschsprung disease is a distinct, recognizable multiple congenital anomalies-mental retardation syndrome caused by mutations in the zinc finger homeo box 1B gene." Am J Med Genet 108(3): 177-81.