



HAL
open science

Régulation de la voie MEK/ERK par la signalisation éphrine lors du développement neural chez l'ascidie *Ciona intestinalis*

Nicolas Haupaix

► **To cite this version:**

Nicolas Haupaix. Régulation de la voie MEK/ERK par la signalisation éphrine lors du développement neural chez l'ascidie *Ciona intestinalis*. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4003 . tel-01059798

HAL Id: tel-01059798

<https://theses.hal.science/tel-01059798>

Submitted on 2 Sep 2014

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.

UNIVERSITÉ DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS
École doctorale : Science de la Vie et de la Santé

THÈSE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS

Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

Soutenue et présentée publiquement le 10 février 2014 par

Nicolas Haupaix

Régulation de la voie MEK/ERK par la signalisation éphrine lors du développement neural chez l'ascidie *Ciona intestinalis*.

Équipe d'accueil : Destin cellulaire
UMR 7009 Laboratoire de Biologie du Développement de Villefranche
Observatoire Océanologique de Villefranche-sur-mer
181 chemin du Lazaret
06230 Villefranche-sur-mer

Composition du jury :

Dr Alice Davy	Rapporteur
Dr Sylvie Schneider-Maunoury	Rapporteur
Pr Thomas Lamonerie	Examineur
Dr Patrick Lemaire	Examineur
Dr Hitoyoshi Yasuo	Directeur de thèse

Résumé

Durant ma thèse, j'ai participé à une étude fonctionnelle qui a démontré que p120-RasGAP, une protéine appartenant à la famille GAP (GTPase-activating protein), est le médiateur cytoplasmique de l'éphrine lors de l'atténuation d'ERK1/2. Pour confirmer cela, j'ai réalisé une expérience de co-immunoprécipitation et j'ai démontré que p120-RasGAP s'associe au récepteur de l'éphrine, Eph3, quand celui-ci est activé par un ligand éphrine. Ce résultat indique fortement que les signaux FGF et éphrine convergent au niveau de Ras et qu'ils contrôlent de manière antagoniste son activité. Dès lors, j'ai analysé les autres événements de spécification cellulaire impliquant l'antagonisme FGF/éphrine. Chez l'embryon d'ascidie, le signal FGF est décrit comme inducteur du destin neural dans les cellules ectodermiques qui, en absence du signal FGF, adoptent le destin épidermique. L'induction neurale des ascidies a lieu au stade 32 cellules et se traduit par la spécification de quatre précurseurs neuraux (ERK+) parmi les 16 cellules ectodermiques. J'ai démontré que le signal éphrine/Eph/RasGAP antagonise le signal FGF pour générer une activation d'ERK1/2 de type tout ou rien parmi les cellules ectodermiques. Enfin, en collaboration avec Philip Abitua, doctorant dans le laboratoire du Dr. Mike Levine (UC Berkeley), nous démontrons que l'antagonisme entre les signaux éphrine et FGF est impliqué dans la régionalisation antéro-postérieure de la plaque neurale.

Ascidie, spécification, MAPK, FGF, Ephrine

Abstract

During my thesis study, I was involved in functional studies to demonstrate that p120-RasGAP, a GTPase-activating-protein (GAP), is a cytoplasmic mediator of the ephrin-mediated ERK attenuation. To confirm this notion, I conducted a co-immunoprecipitation experiment and demonstrated that p120-RasGAP associates with an ephrin receptor, Eph3, when the latter is activated by an ephrin ligand in ascidian embryos. These results strongly indicate that FGF and ephrin signals converge at the level of Ras and control its activity antagonistically. Following this finding, I looked for other cell fate specification events controlled by the antagonism between ephrin and FGF signals. In ascidian embryos, FGF signals are known to induce neural fates in ectodermal cells which otherwise adopt epidermal fates. Ascidian neural induction takes place at the 32-cell stage, resulting in specification of specific four cells as ERK1/2-active neural precursors among 16 ectodermal cells. I was able to demonstrate that ephrin/Eph/RasGAP signals counterbalance FGF neural inducing signals to generate the ON-OFF response of ERK activation among the ectodermal cells. Finally, in collaboration with a PhD student in Dr. Mike Levine's lab (UC Berkeley), the antagonism between ephrin and FGF signals plays a role in regionalisation of the neural plate along the anterior-posterior axis.

Ascidian, specification MAPK, FGF, Ephrin

Remerciements

Je pense sincèrement que la station biologique de Villefranche-sur-mer est l'endroit rêvé pour un doctorant. Certes, le lieu est magnifique, mais ce sont ses occupants qui le rendent magique et digne d'un grand intérêt. Du fond du cœur, je les remercie tous. Je voudrais également remercier Evelyn pour l'énergie constante dont elle fait preuve pour diriger et faire vivre l'Unité Bio Dev, tout en y maintenant une ambiance chaleureuse.

Antonella, Cécile, Éléonore, Negi, Pascal, Lorenzo et autres de passages. Mes compagnons de galère du bureau des étudiants, sans qui ces années à la station n'auraient pas été les mêmes. Je veux aussi inclure Maïta, qui fréquente assidument notre bureau et qui nous distribue toujours à grande dose sa bonne humeur.

Carine, Evelyn, Tsuyo, Patrick, Sandra, Stéfano et Sonia et les autres habitants de Jean Maetz qui chaque jour, font de ce laboratoire un lieu accueillant. Les habitants des Galériens, que j'ai moins croisés mais qui n'en sont pas moins précieux. J'ai toutefois une pensée spéciale pour Céline, Guy et Lydia qui m'ont souvent vu débarqué pour quelques questions techniques, ainsi que pour Christian, Faisal et Phillipe qui ont toujours été là de bonne humeur pendant mes interminables allers-retours devant l'imageur de blot et qui ont toujours été disponibles pour toute sorte d'ennuis techniques. Sans oublier de citer Anne-marie, qui était toujours là quand on a besoin d'une aide administrative rapide et efficace.

Cathy, Clare, Moly, Negi et autres membres de passage dans l'équipe Yas. Vous m'avez tellement donné, que ce n'est pas vraiment quantifiable. Merci pour tout ! Travailler à vos côtés a été un véritable plaisir et, le pincement au cœur que je ressens, en pensant que mon voyage avec vous arrive à son terme est bien réel. Cathy et Moly, votre aide m'a été précieuse. Sans vous je serais peut-être encore là à faire je ne sais quelle expérience qui ne marche pas. Clare, tu as été d'un soutien scientifique et moral permanent. A toi toute seule tu fais vivre le labo comme personne. Tes cris, ta joie et ta sensibilité vont me manquer plus que tu ne le penses.

Yas, j'ai gardé le meilleur pour la fin ! Merci de m'avoir donné l'opportunité de faire mon doctorat dans ton équipe. Tu as su faire de ces quatre années, les plus riches et intenses de toute ma vie. Au cours de mon doctorat, j'ai appris bien plus qu'à faire quelques expériences et quand je regarde le chemin parcouru, je me dis que tu n'y es pas étranger. J'ai trouvé dans ton équipe un environnement de travail idéal. Jour après jour, j'ai apprécié l'aspect humain qui y règne. Je tiens à te dire qu'avec Clare, vous formez un duo scientifique du tonnerre et je veux vous remercier une fois encore de m'avoir accueilli avec tant de générosité et de gentillesse.

Patrick Lemaire et ses collaborateurs, notamment Delphine Dauga pour m'avoir initié aux subtilités de la reconstruction 3D d'embryons.

Comme le doctorat n'est pas qu'une vie de laboratoire et qu'il nécessite également du soutien en dehors et dans sa vie personnelle, je tiens donc à remercier :

Éléonore sans qui rien de cela n'aurait été possible. Elle est l'ouvrière de l'ombre qui fait le travail ingrat de disjoncteur de la joie et des crises inhérentes au doctorat. Elle fait que je dois, chaque jour, me dépasser et viser plus haut.

Mes parents et mes frères qui sont une source d'encouragement permanente et qui sont toujours là quand il le faut.

Amis de fac, de labo et d'avant, qui même si on ne se voit pas si souvent restent présents et importants pour moi.

Merci à tous !

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	8
INTRODUCTION I : Modèle de l'ascidie Ciona intestinalis.....	9
Généralités sur Ciona intestinalis.....	10
Développement embryonnaire.....	12
INTRODUCTION II : Induction neurale.....	17
Induction neurale.....	18
Spécification des destins neuraux chez l'ascidie.....	21
INTRODUCTION III :Régionalisation antéro-postérieure du système nerveux.....	26
Régionalisation antéro-postérieure du système nerveux.....	27
Régionalisation antéro-postérieure du système nerveux chez l'ascidie.....	29
INTRODUCTION IV : La voie de signalisation éphrine-Eph.....	35
1) Introduction.....	36
2) Histoire évolutive.....	36
3) Fonctions biologiques de la signalisation éphrine.....	37
4) Fonctionnement de la voie éphrine.....	38
5) Interactions avec les MAPK.....	40
RÉSULTATS & DISCUSSIONS	42
PROJET I : Rôle de p120-RasGAP dans l'atténuation de la voie FGF par la voie éphrine/Eph dans les embryons d'ascidie	43
Questions et buts de l'étude.....	44
Données préliminaires.....	44
Manuscrits de l'article.....	44
Annexe 1 : localisation subcellulaire de p120-RasGAP dans les embryons d'ascidie.....	51
Bilan et perspectives.....	52
PROJET II : Rôle de l'antagonisme entre les voies FGF et éphrine dans la réponse binaire lors de l'induction neurale dans les embryons d'ascidie	53
Introduction.....	54
Résultats.....	55
Discussion.....	56
Matériels et méthodes.....	63
Annexe 2 Réponses binaires : une analyse littéraire.....	64
Projet III : Régionalisation antéro-postérieure de la plaque neurale dans les embryons d'ascidie	69
Introduction.....	70
Résultats.....	71
Discussion.....	75

Matériels et méthodes.....	76
FIGURES.....	78
BIBLIOGRAPHIE	138

INTRODUCTION

**INTRODUCTION I : MODELE DE L'ASCIDIE
CIONA INTESTINALIS**

GENERALITES SUR CIONA INTESTINALIS

1) HISTORIQUE

Les ascidies forment un groupe d'organismes modèles bien établis en biologie du développement. Les expériences fondatrices menées par Chabry en 1887 montrent que les cellules se développent différemment, en fonction des informations maternelles qu'elles reçoivent. En 1905, Conklin complète les connaissances sur cet organisme en décrivant la conservation de l'orientation des axes de clivages, associée à un lignage invariant. Bien plus tard, la biologie moléculaire bouleversera ces codes en montrant que de nombreux destins sont induits par une communication entre les différentes cellules. Il est cependant clair que les déterminants maternels ont une importance capitale dans le développement des ascidies, mais ne peuvent expliquer à eux seuls la génération de l'ensemble des destins cellulaires (Lemaire, 2009).

2) CYCLE DE VIE

Le cycle de vie des ascidies est composé de deux grandes phases. Dans la première, le zygote subit 13 cycles de divisions cellulaires selon des plans de clivages invariants, générant une larve composée d'environ 2600 cellules et présentant un plan d'organisation typique des Chordés (Fig. 1.1). Cette larve est entourée par une tunique de cellulose sécrétée par l'épiderme. La courte vie de la larve permet une nage autour de la zone de reproduction avant la métamorphose. Après l'éclosion, la larve se fixe rapidement sur un support par l'intermédiaire de trois papilles adhésives épidermiques. Après fixation, elle commence la métamorphose, caractérisée par trois événements simultanés (Richard et al., 2009) ; régression et disparition de la queue larvaire, développement d'organes adultes, et rotation générale du corps d'environ 180°.

3) POSITION PHYLOGENETIQUE

Les ascidies appartiennent au sous-phylum Tunicata. La structure des Tuniciers adultes semble ne pas correspondre au phylum des Chordés puisque, excepté les appendiculaires, ils sont dépourvus de tube nerveux et de chorde. Ainsi jusqu'en 1870, les ascidies étaient classées au voisinage des Mollusques. L'embryologiste Alexander Kovalewsky remarqua que le têtard d'ascidie présente un plan d'organisation caractéristique des Chordés, proche de celui l'amphioxus et classa les ascidies parmi les Chordés (Christiaen et al., 2009; Richard et al., 2009). Des études récentes, utilisant les nombreuses données génomiques disponibles, ont placé les Tuniciers comme étant le groupe sœur des Vertébrés (Fig. 1.2 A). Les Chordés (Vertébrés, Tuniciers et Céphalochordés) constituent un groupe monophylétique (Bourlat et al., 2006; Delsuc et al., 2006). Le sous-phylum Tunicata est composé de plus de 3000 espèces, réparties en 4 classes nommées Sorberacea, Appendicularia, Thaliacea et Ascidiacea. La classe des Ascidiacea, auquel appartiennent les ascidies, est subdivisée en

deux ordres nommés Stolidobranchia et Enterogona (lui-même subdivisé en deux sous-ordres : Aplousobranchia et Phlebobranchia) (Fig1.2 B) (Christiaen et al., 2009). Différentes espèces d'ascidies sont utilisées en laboratoire de recherche. Dans notre laboratoire, nous utilisons les espèces *Ciona intestinalis* et *Phalusia mammillata* qui appartiennent toutes les deux au groupe Phlebobranchia, alors qu'un autre modèle d'ascidie, *Halocynthia roretzi* qui appartenant au groupe Stolidobranchia, est utilisé uniquement au Japon. Malgré l'éloignement phylogénétique, *Ciona intestinalis* et *Phalusia mammillata* présentent en commun avec *Halocynthia roretzi*, une forte conservation des lignages et du plan d'organisation de la larve. Cependant, il existe une variabilité des mécanismes moléculaires impliqués pour les spécifications des destins cellulaires (Hudson and Yasuo, 2008; Lemaire, 2009). Par exemple, une partie des cellules musculaires secondaires, localisées au bout de la queue, viennent du même lignage cellulaire chez *C. intestinalis* et *H. roretzi*, bien qu'elles soient spécifiées par des mécanismes moléculaires différents (revue par Hudson and Yasuo, 2008).

4) AVANTAGES AU LABORATOIRE

La conservation des lignages entre les différentes espèces d'ascidies permet d'exploiter au maximum les spécificités de chacune. Par exemple, les embryons de *C. intestinalis* sont pigmentés et permettent une approche en imagerie limitée. En revanche, les embryons de *P. mammillata* sont transparents et sont applicables et sont alors préférentiellement utilisés pour une approche en imagerie « live » (Prodon et al., 2010).

Le séquençage du génome de *C. intestinalis* révèle un génome compact ne comportant pas de duplication du génome comme chez les Vertébrés (Dehal and Boore, 2005). Si l'on compare avec les Vertébrés, cela limite la redondance fonctionnelle et facilite l'ensemble des approches génétiques (Dehal and Boore, 2005; Dehal et al., 2002). L'injection d'ARNm ou de morpholinos (MO), oligonucléotides anti-sens inhibant soit la transcription des ARNm (hybridation sur le codon initiateur), soit l'épissage des ARNm (hybridation sur les séquences signal de l'épissage) est fréquemment utilisée pour l'analyse fonctionnelle (Satou et al., 2001; Stolfi and Christiaen, 2012). L'électroporation de plasmides directement dans le zygote permet d'obtenir l'expression d'exogènes dans un millier d'embryons synchrones (Corbo et al., 1997). Cette technique facilite l'analyse fonctionnelle en permettant la surexpression de gènes, l'expression de dominants négatifs ou encore d'ARN interférents (Nishiyama and Fujiwara, 2008).

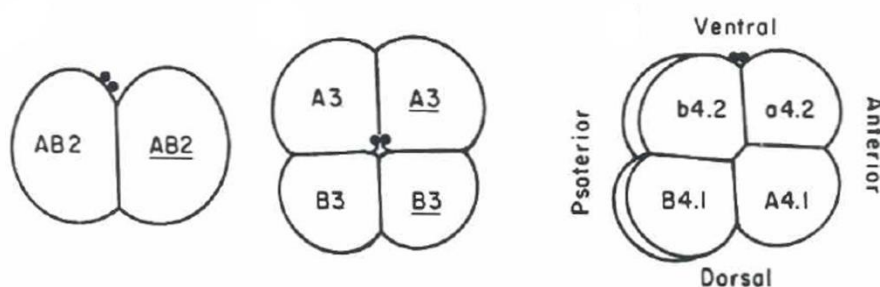
Enfin, l'avantage le plus remarquable provient du mode de développement des ascidies, qui implique un faible nombre de cellules et un patron de divisions cellulaires invariant (Fig. 1.1). Chez *H. roretzi*, ces propriétés ont permis de déterminer les lignages cellulaires de chaque cellule jusqu'à la gastrulation, par l'injection de traceurs intracellulaires (Fig. 1.3) (Nishida,

1987; Nishida and Satoh, 1983, 1985). Après la gastrulation, les lignages neuraux sont particulièrement bien décrits chez *C. intestinalis*, grâce à l'utilisation de la microscopie à balayage (Nicol and Meinertzhagen, 1988a, 1988b). Les lignages neuraux ne sont toutefois pas complets. L'avancée des connaissances des lignages neuraux repose sur une étude basée sur l'historique des mitoses après la gastrulation, qui n'as pas permis de décrire l'ensemble des lignages neuraux (Cole and Meinertzhagen, 2004). Seuls quelques lignages très étudiés sont complètement connus.

DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

1) NOMENCLATURE

La nomenclature du lignage établie par Conklin est toujours utilisée aujourd'hui (Conklin, 1905). Chaque cellule de l'embryon est désignée par une lettre et un code chiffré (ex : a4.2). La lettre « A » désigne la partie antérieure de l'embryon et la lettre « B » la partie postérieure. La lettre est en minuscule si la cellule appartient à l'hémisphère animal ou en majuscule si elle appartient à l'hémisphère végétatif. Le premier chiffre correspond au nombre de cycles cellulaires. Le deuxième chiffre permet d'identifier précisément la filiation des cellules et commence à être utilisé à partir du stade 8-cellules. A chaque division cellulaire, on ajoute 1 au premier chiffre et on double la valeur du second chiffre. On retranche également 1 au second chiffre d'une des deux cellules filles. Ainsi la division de la cellule « a4.2 » génère deux cellules filles désignées par « a5.3 » et « a5.4 ». L'embryon étant symétrique le long de l'axe droite-gauche, il n'y a pas de nomenclature spécifique. Ainsi, chaque embryon possède deux cellules « a4.2 » qui généreront deux cellules « a5.3 » et deux cellules « a5.4 » (Venuti and Jeffery, 1989).



Emprunté à Venuti et Jeffery, 1989

2) AXES EMBRYONNAIRES

L'établissement de l'axe animal-végétatif a lieu pendant la maturation de l'ovocyte. Le premier signe de polarisation est le positionnement décentralisé de la vésicule germinative d'un côté de l'ovocyte qui correspond au pôle animal (Prodon et al., 2008). L'établissement de l'axe animal-végétatif devient visible par la localisation polarisée d'organites (mitochondrie, réticulum et ARNm associés au réticulum) qui forment un gradient suivant cet axe (Fig. 1.4)(Sardet et al., 2007). Ce gradient est initié après la rupture de la vésicule germinative, qui induit un mouvement cytoplasmique cortical acto-myosine dépendant (Prodon et al., 2008). L'entrée du spermatozoïde se fait généralement par l'hémisphère animal. Il est suivi de deux réarrangements cytoplasmiques successifs qui vont établir définitivement les axes embryonnaires. L'entrée du spermatozoïde induit, via un « facteur spermatique » inconnu, une vague calcique qui se propage vers le pôle végétatif en suivant un axe défini par le point d'entrée du spermatozoïde. Cela induit le premier réarrangement cytoplasmique et la concentration de certains ARNm maternels au pôle végétatif (Fig. 1.4). La migration des pronoyaux commence durant la deuxième moitié du cycle cellulaire et aboutit à la rencontre des pro-noyaux au centre du zygote. Ce mouvement est généré par les microtubules venant du spermatozoïde, qui créent des forces qui induisent une translocation massive des organites et des ARNm qui leurs sont associés au pôle postérieur vers une région corticale appelée CAB (Centrosome Atracting Body) (Hibino et al., 1998). Le CAB contrôle une série de divisions inégales dans cellules végétatives postérieures qui en hérite. Lorsqu'un fragment cellulaire contenant le CAB, appelé PVC (Posterior-Vegetal Cytoplasm), est enlevé, l'embryon se développe sans les divisions inégales spécifiques aux cellules végétatives postérieures. Le lignage végétatif postérieur (lignage « B ») adopte alors un destin végétatif antérieur (Nishida, 1994).

La première division répartit de façon équitable les déterminants maternels entre les deux blastomères droit et gauche, assurant ainsi le plan de symétrie caractéristique des Bilatériens. La deuxième division sépare les parties antérieure et postérieure de l'embryon. La troisième division sépare les hémisphères animal et végétatif formant l'embryon au stade 8-cellules (Fig. 1.4).

3) REGIONALISATION DE L'EMBRYON

STADES 8- ET 16-CELLULES

Pem-1, un gène spécifique aux ascidies, code pour une protéine qui ne contient aucune homologie de séquence ou domaine connu, sauf le motif WRPW à l'extrémité C-terminale (Yoshida et al., 1998). Les transcrits maternels de *Pem-1* se localisent dans le CAB (Fig. 1.4) et génèrent le rôle de cette structure subcellulaire, lors des divisions inégales, par attraction du fuseau mitotique (Negishi et al., 2007; Prodon et al., 2007, 2010). *Pem-1* joue un autre rôle dans les noyaux en tant que répresseur général de la transcription dans la lignée germinale

qui hérite du CAB (Kumano et al., 2011; Shirae-Kurabayashi et al., 2011). *Macho-1* est un autre transcrite maternel qui s'associe au CAB et code pour un facteur de transcription à doigts de zinc (zinc-finger) (Nishida and Sawada, 2001). L'invalidation ou « knockdown » de *Macho-1*, induit une transformation du lignage végétatif postérieur en lignage végétatif antérieur, comme observé lors de l'ablation du PVC (Kobayashi et al., 2003). Ainsi, il semble que ces deux transcrits maternels, localisés dans le CAB, jouent un rôle important pour la différenciation antéro-postérieure précoce de l'embryon d'ascidie, et sont donc impliqués dans la régionalisation le long de l'axe antéro-postérieur.

Au stade 8 cellules, l'activation du complexe TCF/ β -caténine, dans les cellules végétatives, induit la première étape de régionalisation le long de l'axe animal-végétatif (Rothbacher et al., 2007). On ignore toujours le mécanisme qui est en amont de cette activation. Le complexe TCF/ β -caténine active des gènes tels que *FGF9/16/20* et *FoxD* (Imai et al., 2002a, 2002b). Par un mécanisme inconnu, l'activité du complexe TCF/ β -caténine inhibe l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription GATA-a dans les cellules végétatives, ce qui restreint l'activité de GATA-a dans les cellules animales (Rothbacher et al., 2007). Le rôle de GATA-a dans les cellules animales est d'initier le programme génétique de l'ectoderme (Rothbacher et al., 2007). Dans les cellules B5.1 de l'embryon au stade 16-cellules, *Macho-1* déclenche le programme génétique musculaire par une activation des gènes codant pour des facteurs de transcription à boîte T, *Tbx6b* et *Tbx6c* (Yagi et al., 2005).

La combinaison de ces facteurs maternels, Pem-1, *Macho-1*, GATAa et β -caténine, génèrent les patrons d'expression de 18 gènes, au stade 16-cellules, qui ensemble définissent 6 territoires différents (Fig. 1.5)(Lemaire, 2009; Satou et al., 2009). Il faut noter que dans la Figure 1.5, *FoxAa* est exprimé de façon différentielle le long de l'axe antéro-postérieur dans l'hémisphère animal au stade 16-cellules. On ignore encore le mécanisme responsable de cette expression différentielle, mais il joue un rôle important dans la régionalisation du système nerveux, comme détaillé dans le chapitre Introduction III.

STADE 32-CELLULES

Au stade de 32-cellules, les cellules végétatives, à l'exception de celles qui contiennent le CAB, se divisent le long de l'axe animal-végétatif. Cette division cellulaire est associée à une activation différentielle du complexe TCF/ β -caténine (Hudson et al., 2013). Dans la partie antérieure de l'hémisphère végétatif, le complexe TCF/ β -caténine active le programme génétique de l'endoderme (A6.1 et A6.3), alors que, les cellules sœurs de ces précurseurs endodermiques qui se trouvent du côté animal (A6.2 et A6.4), commencent à exprimer le gène *ZicL*, qui code pour un facteur de transcription à doigts de zinc (Fig. 1.6) (Hudson et al., 2013; Imai et al., 2002c). Ensuite, ces cellules « *ZicL*-positives » se divisent et génèrent un précurseur de la notochorde et un précurseur neural. Pour la partie postérieure de

l'hémisphère végétatif (quatre cellules au total), les deux cellules les plus proches du pôle végétatif (B6.1) deviennent les précurseurs endodermiques, alors que leurs cellules sœurs, qui se trouvent à la marge (B6.2), continuent à exprimer le programme génétique musculaire sous le contrôle de *Macho-1*. Chez *H. roretzi*, il a été suggéré que les voies de signalisation FGF et BMP sont nécessaires pour inhiber le programme génétique musculaire dans les précurseurs endodermiques (Kondoh et al., 2003). L'ensemble de ces mécanismes permet de ségréger l'hémisphère végétatif en deux lignages : le lignage endodermique et le lignage marginal (mésodermique) (Fig. 1.6).

STADE 64-CELLULES

Au stade 64-cellules, les précurseurs notochorde-neural (A6.2 et A6.4) se divisent le long de l'axe animal-végétatif. Les cellules filles du côté végétatif (A7.3 et A7.7) deviennent les précurseurs de la notochorde, alors que du côté animal (A7.4 et A7.8), elles deviennent les précurseurs neuraux (Fig 1.6). La spécification différentielle entre ces cellules sœurs est contrôlée par une activation différentielle d'ERK1/2 en aval de FGF9/16/20 (Yasuo and Hudson, 2007). Je développerai en détail le mécanisme moléculaire contrôlant l'activation différentielle d'ERK1/2 dans le prochain chapitre. Dans la partie postérieure de l'hémisphère végétatif, les cellules du lignage musculaire (B6.2 et B6.4) se divisent le long de l'axe animal-végétatif. Les cellules filles générées du côté végétatif (B7.3 et B7.7) deviennent les précurseurs du mésenchyme, alors que celles générées du côté animal (B7.4 et B7.8) deviennent les précurseurs du muscle (Fig. 1.6). Cette spécification différentielle est elle aussi contrôlée par une activation différentielle d'ERK1/2 entre les cellules sœurs. Dans ce cas, ERK1/2 est activé dans les cellules qui deviennent les précurseurs du mésenchyme (Kim et al., 2000; Nishida, 2003). Cette activation différentielle d'ERK1/2 est générée par un signal directionnel du ligand FGF9/16/20, venant des précurseurs endodermiques qui sont en contact direct avec les futurs précurseurs du mésenchyme (Kim et al., 2007). L'ensemble de ces mécanismes subdivise le domaine marginal en lignage neural et lignage de la notochorde, dans la partie antérieure de l'hémisphère végétatif ; et en lignage musculaire et lignage mésenchyme, dans la partie postérieure de l'hémisphère.

4) GASTRULATION ET NEURULATION

Chez *C. intestinalis*, l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme sont générés dès le stade 32-cellules chez *C. intestinalis* (Hudson et al., 2013). Cependant, ce n'est que lors de la gastrulation que les feuilletts embryonnaires adopteront leurs positions caractéristiques. La gastrulation commence après le stade 64-cellules, soit seulement sept cycles cellulaires après la fécondation. Au stade 64-cellules, les embryons sont sphériques et les cellules animales et végétatives sont à peu près égales en taille selon l'axe apico-basal (Fig. 1.7 A, 64-cellules). La gastrulation se déroule en deux étapes (Sherrard et al., 2010). La première étape implique une contraction apicale dépendante de la myosine au niveau des précurseurs

endodermiques végétatifs, créant au stade 76-cellules une surface plane côté végétatif (Fig. 1.7 A/B, 76-cellules). Dans le même temps, les cellules animales s'étendent vers le pôle végétatif, d'abord par contraction de l'axe apico-basal (Fig. 1.7 A/B, 64- à 76-cellules), puis par division (Fig. 1.7 A, 76- à 112-cellules). La deuxième étape est caractérisée par l'invagination des cellules de l'endoderme. Cette invagination est provoquée par la contraction de l'axe apico-basal, suite à une contraction baso-latérale myosine dépendante (Fig. 1.7 B) (Sherrard et al., 2010).

Juste avant la gastrulation, les précurseurs notochorde et neuraux forment 4 rangées de cellules (Fig. 1.7C). Lors de l'invagination, les précurseurs de la notochorde sont entraînés dans la dépression créée par les précurseurs endodermiques, alors que les trois rangées du lignage neural restent à l'extérieur de l'embryon et forment la plaque neurale (Fig. 1.7C). Comme décrit en détail dans l'Introduction III, les cellules qui composent ces trois rangées neurales se diviseront le long de l'axe antéro-postérieur, lors des deux prochaines divisions cellulaires. Ensuite, le tube neural se forme par enroulement de la plaque neurale, en commençant par les cellules les plus postérieures et en progressant vers l'antérieur. Durant les derniers stades du développement larvaire, l'allongement du tube neural se fait par divisions cellulaires orientées et par intercalations médio-latérales des cellules (Fig. 1.7D) (Munro et al., 2006).

5) SYSTEME NERVEUX CENTRAL CHEZ *CIONA INTESTINALIS*.

Le système nerveux central (SNC) de *C. intestinalis* est composé de quatre structures positionnées le long de l'axe antéro-postérieur (la vésicule sensorielle, le cou, le ganglion cérébral et le tube neural), comprenant en tout 330 cellules (Fig. 1.8)(Lemaire et al., 2002). La vésicule sensorielle est composée d'une neurohypophyse, de 80 à 100 neurones du SNC et de trois structures sensorielles. L'otolithe assure les fonctions géostatiques, l'ocellus assure les réactions à la lumière ; et une dernière structure appelée « pressure organ » permet la mesure de la pression et la chemo-sensation (Lemaire et al., 2002). L'otolithe et l'ocellus sont facilement identifiables chez le têtard, car ils expriment des pigments mélanisés. Ceux-ci, associés à leurs positions dans le SNC et aux gènes exprimés, supportent l'hypothèse d'une homologie avec le RPE des Vertébrés (Retinal Pigment Epithelium) (Ramón Martínez-Morales et al., 2004). L'homologie des structures et des patrons d'expression du système nerveux, le long de l'axe antéro-postérieur, suggèrent une conservation de l'organisation en trois parties du SNC chez les ascidies (Fig. 1.8).

INTRODUCTION II : INDUCTION NEURALE

INDUCTION NEURALE

L'induction neurale est définie couramment comme un processus embryonnaire pendant lequel l'ectoderme est spécifié en neuroectoderme par des signaux venants d'un centre organisateur. Dans ce chapitre, je fais d'abord une synthèse des connaissances actuelles sur l'induction neurale chez divers organismes, puis j'aborde de manière plus approfondie la spécification des destins neuraux au cours de l'embryogenèse d'ascidie.

1) MODELE PAR DEFAULT

L'induction neurale est un sujet qui fait l'objet de nombreuses recherches. En 1924, les premiers travaux de Hans Spemann et Hilde Mangold ont mis en évidence l'induction du système nerveux au moment de la gastrulation chez le triton, grâce à une expérience basée sur la construction de chimères. Cette expérience a consisté à greffer la lèvre dorsale du blastopore d'un embryon donneur (pigmenté) sur la face ventrale d'un embryon receveur (non pigmenté). Cette greffe entraîne la formation d'un embryon siamois avec notamment deux systèmes nerveux. Il faut noter que les cellules formant l'axe embryonnaire secondaire dérivent majoritairement de l'embryon, hôte alors que la majeure partie du système nerveux dérive de l'embryon receveur. La lèvre dorsale du blastopore apparaît comme un centre organisateur (Fig. 2.1 A). Des structures similaires ont été trouvées chez d'autres Vertébrés. Ainsi, la greffe du « shield » chez le poisson zèbre, et du nœud de Hensen (situé à l'extrémité distale de la ligne primitive) chez le poulet, produisent également la formation d'embryons siamois (Gilbert, 2004). Le mécanisme d'induction du destin neural semble conservé chez les Vertébrés puisque la xénogreffe du nœud de Hensen chez le xénope (Kintner and Dodd, 1991) ou le poisson zèbre induit la formation de tissus neuraux (Hatta and Takahashi, 1996).

L'isolation d'explants appelés « calottes animales » chez des embryons de xénope au stade blastula ne génère que des cellules épidermiques, alors que ces cellules sont compétentes pour adopter un destin neural. Cependant, la dissociation des cellules de l'explant provoque la génération de cellules neurales (Fig. 2.1B) (Sato and Sargent, 1989). Cela s'explique par le fait que les cellules des calottes animales expriment les gènes BMP2/4/7 (Bone Morphogenetic Protein) et que le signal transmis par les protéines BMP induit le destin épidermique et inhibe le destin neural. Ainsi, les explants dissociés et traités en présence de protéines BMP ne génèrent aucune cellules neurales (Fig. 2.1B)(Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995). La lèvre dorsale de blastopore peut induire le tissu neural, car elle possède la capacité d'inhiber le signal BMP par l'expression d'inhibiteurs des BMP comme Follistatin, Chordin et Noggin (Fig. 2.1C)(Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Sasai et al., 1995; Smith and Harland, 1992). L'ensemble de ces travaux sont à l'origine du « modèle par défaut » de l'induction neurale. Dans ce modèle, les cellules de l'ectoderme de xénope effectuent un

choix entre épiderme et neuroectoderme. Le destin neural est par défaut le destin des cellules de l'ectoderme, sauf s'il est inhibé par le signal BMP (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1997). Seules les cellules proches du centre organisateur adoptent le destin neural, car elles sont protégées de la signalisation BMP, par les inhibiteurs des BMP sécrétés par le centre organisateur (Fig. 2.1 C).

Chez *Drosophila melanogaster*, le gradient généré par le morphogène *dorsal* induit dans le syncytium, l'expression différentielle de gènes le long de l'axe dorso-ventral. *Dorsal* code pour un facteur de transcription de la famille Rel. Il forme un gradient du côté ventral vers le côté dorsal. Il génère différents territoires en fonction de sa concentration. A forte concentration, il induit le futur mésoderme dans la région la plus ventrale. Les régions latérales reçoivent une concentration intermédiaire de *Dorsal*. Cette concentration induit l'expression de *short gastrulation (sog)*, qui est un homologue de l'inhibiteur des BMP *chordin*. Cette région deviendra le neuroectoderme. Enfin, les plus faibles concentrations de *Dorsal* se trouvent du côté dorsal. A ces concentrations, il se produit l'induction du futur ectoderme. Cette région est caractérisée par l'expression de *decapentaplegic (dpp)* qui est un homologue de *BMP2/4* (Fig. 2.2). Le signal *Dpp* possède, lors de l'induction neurale, des capacités similaires aux signaux BMP des Vertébrés (Holley et al., 1995). La perte de fonction de *dpp* induit l'expansion du neuroectoderme dans le territoire épidermique. A l'inverse, un gain de fonction de *dpp* induit la conversion du neuroectoderme en épiderme (Ferguson and Anderson, 1992; Wharton et al., 1993). L'expression de *sog* dans les structures latérales inhibe l'expression de *dpp* (Ferguson and Anderson, 1992). Les capacités d'inhibition de *sog* et *chordin* semblent conservées, car les gènes *sog* et *chordin* peuvent être intervertis chez la drosophile et le xénope (Holley et al., 1995). L'ensemble de ces résultats démontre que l'antagonisme *sog/dpp* permet, chez la drosophile, la spécification du neuroectoderme et de l'épiderme (Fig. 2.2). Le mécanisme de la formation du neuroectoderme chez la drosophile montre une grande similarité avec celui des Vertébrés, dépendant d'un rôle clef des inhibiteurs de la signalisation BMP.

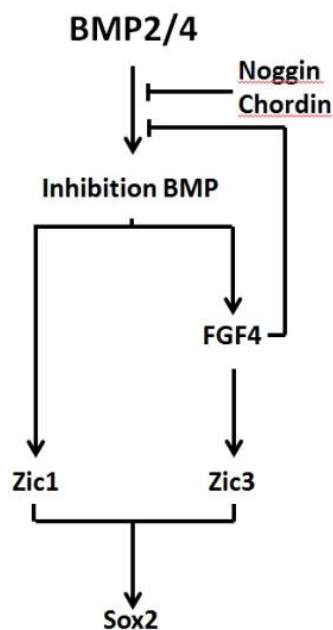
Cependant, le modèle par défaut ne peut expliquer certains résultats expérimentaux obtenus chez les Vertébrés. Par exemple, les inhibiteurs des BMP, *Chordin* et *Noggin*, ne peuvent pas induire le destin neural dans des embryons de xénope, injectés avec un dominant négatif du récepteur au FGF (Fibroblast Growth Factor)(Launay et al., 1996). Chez le poulet, l'expression ectopique d'inhibiteurs de BMP dans des cellules compétentes pour adopter le destin neural, suite à une greffe du nœud de Hensen, ne permet pas l'expression de tous les marqueurs neuraux (Streit et al., 1998). Ces résultats suggèrent que d'autres mécanismes sont impliqués dans l'induction des destins neuraux.

2) ROLE DE LA SIGNALISATION FGF

La voie FGF est nécessaire à l'induction neurale avant la gastrulation chez le poulet (Streit et al., 2000), l'ascidie (Bertrand et al., 2003) et le xénope (Delaune et al., 2005).

Chez le xénope, la greffe de la lèvre dorsale du blastopore avec un explant ectodermique compétent ne permet pas l'induction neurale, lorsque que ce dernier est pré-traité avec un inhibiteur des récepteurs au FGF (FGFR). Cela suggère que le signal FGF induit, dans l'ectoderme, la capacité à répondre aux signaux du centre organisateur (Delaune et al., 2005). Le modèle par défaut de l'induction neurale ne semble pas être compatible avec ces résultats expérimentaux.

La signalisation FGF agit en synergie avec les inhibiteurs BMP par deux mécanismes. Premièrement, l'activation des MAPK par FGF induit l'inhibition du signal BMP par une phosphorylation inhibitrice sur Smad1. Cela démontre que la signalisation FGF agit en synergie avec les inhibiteurs de BMP pour induire le destin neural (Pera et al., 2003). Le



signal FGF active de manière spécifique le facteur de transcription *Zic3*, qui est nécessaire, avec *Zic1*, à la différenciation neurale et à l'expression du marqueur neural définitif *Sox2*. Or, *Zic1* est spécifiquement activé par l'inhibition du signal BMP (Marchal et al., 2009). L'induction de l'expression de *Zic3* par le signal FGF est indépendante de la régulation de Smad1, car *Zic3* est induit par FGF4 malgré l'expression d'une protéine Smad1 résistante à l'inhibition du signal FGF (Marchal et al., 2009). Ce résultat suggère que l'inhibition du signal BMP et la signalisation FGF agit en synergie pour induire l'activation du programme neural. Enfin, il a été montré que l'inhibition de la signalisation BMP induit l'expression de FGF4 et qu'elle est nécessaire à l'induction neurale (Marchal et al., 2009). Ces résultats démontrent pourquoi l'inhibition du signal FGF bloque l'induction neurale et valident le modèle par défaut chez le xénope.

Si l'identification d'une hiérarchie entre les voies de signalisations a permis de mettre en évidence le mode d'induction neurale chez le xénope, c'est l'étude de la chronologie d'action qui a permis de comprendre le rôle de la signalisation FGF chez le poulet (Fig. 2.3) (revue par Stern, 2005). De manière analogue au xénope, l'induction neurale, initiée par la greffe du nœud de Hensen, est abolie chez le poulet par l'inhibition du signal FGF. Une heure après la greffe, l'expression de *ERN1* (Early Response to Neural Induction) est détectée (Streit et al., 2000), suivie par celle de *Churchill*, 4 à 5 heures après la greffe (Sheng et al., 2003). Ces deux gènes sont exprimés dans la future plaque neurale (épiblaste) et sont uniquement induits par FGF8, qui est exprimé dans le tissu sous-jacent (hypoblaste) (Fig. 2.3 A/B).

Churchill induit l'arrêt de la progression de la ligne primitive et la sensibilisation des cellules de l'ectoderme aux inhibiteurs de BMP émis par le centre organisateur (Fig. 2.3 C/D) (Sheng et al., 2003). Chez le poulet, contrairement au modèle par défaut, le signal FGF agit en aval des inhibiteurs BMP et il est nécessaire à l'induction neurale.

3) PLUSIEURS CENTRES ORGANISATEURS ?

L'idée de plusieurs centres organisateurs provient des travaux sur le triton d'Otto Mangold (1933). Il préleva quatre régions successives de l'archantéron (issu de l'endoderme) le long de l'axe antéro-postérieur sur des gastrula tardives, qu'il greffa dans le blastocœle de gastrula précoce (Fig. 2.4). Plus la structure greffée était d'origine postérieure, plus les structures qui se développaient à partir du greffon possédaient une identité postérieure (Gilbert, 2004; Stern, 2001). Ces expériences suggèrent que différentes régions de l'endoderme possèdent différentes capacités d'organisation antéro-postérieure du tissu neural.

Chez le poulet et la souris, certaines cellules de la plaque neurale antérieure (correspondant au futur cerveau) n'ont pas été à proximité immédiates du centre organisateur. Cela suggère que certaines structures neurales soient induites indépendamment du nœud de Hensen (Stern, 2005). Chez la souris, la formation du cerveau nécessite la présence de l'endoderme viscéral antérieur (AVE) (Thomas and Beddington, 1996). Cette structure est l'équivalent de l'hypoblaste du poulet. Ces observations suggèrent que, chez la souris et le poulet, les structures neurales les plus antérieures ne sont pas induites par le nœud de Hensen, mais par un centre organisateur de la tête. L'AVE et l'hypoblaste induisent de manière transitoire l'expression de *Sox3*, qui est un marqueur pan-neural, et d'*Otx2*, qui est un marqueur caractéristique du cerveau et du mésencéphale antérieur. Cependant, ni l'AVE ni l'hypoblaste n'induisent une expression stable de marqueurs neuraux et leurs greffes ne permettent pas d'induire le destin neural. Ces caractéristiques indiquent que l'AVE et l'hypoblaste ne constituent pas les inducteurs de la tête (revue par Stern and Downs, 2012).

SPECIFICATION DES DESTINS NEURaux CHEZ L'ASCIDIE

Chez *Ciona intestinalis*, le tissu neural est composé de trois lignées neurales (« A », « a » et « b ») qui sont spécifiées séparément (voir ci-dessous). Située dans l'hémisphère végétatif, la lignée neurale « A » est issue de la cellule A4.1 de l'embryon au stade 8-cellules (Fig. 1.3). Les cellules neurales de cette lignée généreront les deux rangées les plus postérieures de la plaque neurale (Fig. 2.5 en jaune et orange). Ce lignage est appelé lignage neural caudal. Cependant, ce nom est quelque peu trompeur puisque le lignage « A » forme à la fois des structures antérieures (comme la partie postérieure de la vésicule sensorielle) et des structures postérieures (comme le cou et les parties ventrales et latérales du ganglion viscéral (VG) et de la corde nerveuse). Les lignées « a » et « b » sont situées dans

l'hémisphère animal et spécifiées par un mécanisme commun. Le lignage « a » est issu de la cellule a4.2 de l'embryon au stade 8-cellules (Fig. 1.3). Il est appelé lignage rostral car il génère les cellules antérieures de la plaque neurale (Fig. 2.5 en rouge), qui formeront la partie antérieure de la vésicule sensorielle. Enfin, le lignage « b » est issu de la cellule b4.2 et formera, chez le têtard, les cellules dorsales de la corde nerveuse (Fig. 2.5 en vert), d'où son nom de lignage dorsal.

Comme décrit ci-dessus, chez de nombreuses espèces, le rôle de la voie BMP et de ses inhibiteurs est un élément clef de l'induction neurale. D'abord étudiée chez *H. roretzi*, l'induction neurale chez les ascidies ne semble pas impliquer la signalisation BMP et ses inhibiteurs (Darras and Nishida, 2001).

1) LE LIGNAGE CAUDAL (LIGNEE « A »)

La spécification du destin neural caudal résulte d'une division asymétrique qui génère un précurseur neural et un précurseur de la notochorde au stade 44-cellules (Fig2.6). Cette division cellulaire se passe le long de l'axe animal-végétatif. La cellule fille localisée côté animal devient le précurseur neural, alors que la cellule fille se formant côté végétatif devient le précurseur de la notochorde. Cette division est caractérisée par l'activation d'ERK1/2 uniquement dans les précurseurs de la notochorde, ce qui contrôle l'expression différentielle de gènes entre les cellules sœurs (Yasuo & Hudson, 2007). Les précurseurs neuraux exprimeront *ETR* au stade 110-cellules alors que les précurseurs de la notochorde exprimeront *Brachyury*.

Chez *H. roretzi*, les deux cellules filles adoptent le destin neural si la cellule mère notochorde/neurale est isolée avant sa division. En revanche, le traitement de la cellule mère notochorde/neurale par bFGF induit le destin notochorde dans les deux cellules filles. De plus, le traitement par un inhibiteur pharmacologique de MEK (protéine kinase de la cascade MEK/ERK) ou l'injection d'une forme dominante-négative de FGFR (DN-FGFR), induit l'expression ectopique de marqueurs neuraux dans les précurseurs de la notochorde (Minokawa et al., 2001). De manière similaire, l'inhibition de MEK avant la division de la cellule mère notochorde/neurale induit, chez *C. intestinalis*, l'expression ectopique d'*ETR* dans les précurseurs de la notochorde, et la perte d'expression de *Brachyury* (Yasuo and Hudson, 2007). Chez les deux espèces, le choix binaire notochorde-neural est contrôlé par un signal FGF/MEK, qui induit la notochorde en réprimant le destin neural. L'immunomarquage de la forme doublement phosphorylée d'ERK1/2 (= forme active - dpERK) montre que cette MAP kinase est active dans la cellule mère notochorde/neurale et, après sa division cellulaire, elle ne reste active que dans le précurseur de la notochorde (Yasuo and Hudson, 2007).

Chez *C. intestinalis*, l'injection d'un morpholino spécifique du ligand FGF9/16/20 phénocopie l'inhibition de MEK. Cela démontre que ce ligand active la cascade MEK/ERK1/2 chez *C. intestinalis*, et qu'il est nécessaire au choix entre les destins notochorde et neural (Fig. 2.6) (Yasuo and Hudson, 2007). Les expériences menées par Minokawa et al. (2001) montrent que les précurseurs neuraux caudaux sont compétents pour répondre au signal FGF. De plus, les cellules mères notochorde/neurale expriment elles-mêmes le gène *FGF9/16/20* chez *C. intestinalis* (Bertrand et al., 2003). Dans ces conditions, comment expliquer que certaines cellules, pouvant répondre au FGF et exprimant elles-même FGF9/16/20, n'activent pas ERK1/2 ?

La signalisation éphrine est une voie de signalisation impliquant une famille de ligands liés aux membranes, et des récepteurs de type tyrosine kinase. Elle agit en transmettant son signal entre deux membranes directement en contact. Elle possède la capacité de transmettre son signal dans le sens du ligand vers le récepteur (signal vers l'avant), mais aussi du récepteur vers le ligand (signal inversé). Dans le chapitre Introduction IV, je détaille plus largement les caractéristiques de cette voie de signalisation. Afin de préserver la clarté de cette section, je présente dans ce paragraphe uniquement le rôle de la signalisation éphrine/Eph lors de l'induction neurale chez *C. intestinalis*. Le gène *éphrine-Ad* est exprimé dans les cellules ectodermiques à partir du stade 16-cellules. Au stade 32-cellules, les membranes des cellules ectodermiques antérieures sont en contact direct avec les cellules mères notochorde-neurales (Tassy et al., 2006). Ce contact est localisé sur le côté où vont se former les précurseurs neuraux. La surexpression de l'éphrine-Ad par l'injection d'ARNm induit la perte d'expression de *Brachyury*, et l'expression ectopique du marqueur neural *ETR*, dans les précurseurs de la notochorde. A l'inverse, le knock-down d'*éphrine-Ad* induit l'expression ectopique de *Brachyury* et la perte d'expression d'*ETR* dans les précurseurs neuraux (Fig. 2.6) (Picco et al., 2007). Ces expériences montrent que la signalisation éphrine contrôle la spécification du destin neural caudal et du destin notochorde. L'emploi d'une forme tronquée du récepteur Eph3 (Eph3ΔC - retrait du domaine cytoplasmique) induit l'activation ectopique d'ERK1/2 dans les précurseurs neuraux. Cela démontre que la signalisation éphrine implique, dans ce processus, une transmission du signal vers l'avant qui régule l'activation de la cascade MEK/ERK (Picco et al., 2007).

Une explication simple du mode d'action de la signalisation éphrine-Ad est qu'elle agirait directement sur les précurseurs neuraux, et en inhibant l'activation d'ERK1/2 (Fig. 2.7 A). Cependant, il a été montré que les cellules mères notochorde/neurales sont polarisées juste avant leurs divisions (stade 32 tardif), et peuvent se diviser de façon asymétrique même lorsqu'elles sont isolées (Fig. 2.7 B). Lorsque la cellule mère neurale/notochorde est isolée à partir d'un embryon au stade 32-cellules tardif, dans lequel éphrine-Ad a été inhibé, elle se divise de façon symétrique en donnant deux précurseurs de la notochorde (Picco et al.,

2007). Cela démontre que le ligand éphrine-Ad agit avant la division de la cellule mère neurale/notochorde. L'hypothèse retenue par les auteurs est que la signalisation éphrine polarise les membranes de la cellule mère neurale/notochorde par le recrutement de p120-RasGAP. Cette protéine constitue un excellent candidat, car il s'agit d'une protéine appartenant à la famille des GTPase-activating protein (GAP) et possédant la capacité de lier différents récepteurs Eph activés (cf. Introduction IV). Lors de la division de la cellule bipotentielle notochorde/neurale, le précurseur neural hériterait de la majorité des membranes polarisées enrichies en protéines RasGAP (Fig. 2.7 C). La liaison de RasGAP n'est qu'une possibilité parmi d'autres et reste à démontrer ; d'autant plus que les récepteurs à l'éphrine possèdent plusieurs domaines de liaisons, qui ont été décrits comme pouvant lier de nombreuses autres protéines cytoplasmiques (Pitulescu and Adams, 2010). Par ailleurs, les récepteurs Eph possèdent la capacité de lier en *cis* le récepteur au FGF, par interaction de leurs domaines cytoplasmiques (revue par Arvanitis and Davy, 2008).

Le premier but de ma thèse a été d'étudier le mécanisme moléculaire qui transmet le signal éphrine-Ad/Eph3 lors de l'atténuation de la voie FGF/ERK, dans les embryons de *C. intestinalis*. Cette partie de mon projet de thèse sera décrit dans le chapitre « Projet I ».

2) INDUCTION DU LIGNAGE NEURAL ROSTRAL (LIGNEE « A ») ET DORSAL (LIGNEE « B »)

Les lignages neuraux « a » et « b » sont spécifiés dans l'hémisphère animal en effectuant un choix binaire entre les destins neural ou épidermique au stade 32-cellules. Parmi les 16 cellules de l'ectoderme, les deux paires de cellules appelées a6.5 et b6.5 adoptent le destin neural (Fig 2.8 A). Il a été démontré que l'acquisition du destin neural par des cellules de l'ectoderme nécessite une interaction avec les cellules de l'hémisphère végétatif et dépend de la signalisation de la voie FGF/MEK (Hudson and Lemaire, 2001; Hudson et al., 2003). En effet, les quatre cellules à destinée neurale montrent l'activation d'ERK1/2 et l'expression d'*Otx* (Fig.2.8 B-C) (Hudson and Lemaire, 2001). Ce processus est donc considéré comme étant équivalent à l'induction neurale observée chez les Vertébrés. Il est important de noter que les cellules de l'ectoderme ont toutes la capacité à répondre au signal FGF et à acquérir le destin neural. Elles font un choix binaire entre le destin neural et le destin épidermique, selon la signalisation FGF (Hudson and Lemaire, 2001; Hudson et al., 2003).

FGF9/16/20 est exprimé dans l'hémisphère végétatif au stade 16 et 32-cellules (Bertrand et al., 2003). Dans les calottes animales, sa surexpression induit l'expression d'*Otx*, ainsi que la perte du marqueur épidermique *Epi1*. A l'inverse, l'injection d'un morpholino spécifique de *FGF/16/20* induit la perte d'expression d'*Otx* au stade 44-cellules et l'expression ectopique d'*Epi1* au stade neurula dans les lignages neuraux « a » et « b ». Ces expériences démontrent que *FGF9/16/20* est l'inducteur neural dans les embryons d'ascidie (Bertrand et al., 2003). Cependant, cela n'explique pas pourquoi seules les cellules a6.5 et b6.5 répondent au signal

FGF. En reconstruisant des embryons virtualisés en 3D, Tassy et al (2006) ont quantifié les surfaces de contacts entre les cellules de l'ectoderme et celles de l'hémisphère végétatif. Cette approche a mis en évidence que (1) l'embryon d'ascidie au stade 32-cellules ne possède pas de blastocœle et donc que toutes les cellules de l'ectoderme sont en contact direct avec les cellules de l'hémisphère végétatif ; (2) les cellules a6.5 et b6.5 possèdent une surface de contact avec l'hémisphère végétatif supérieure aux autres cellules de l'ectoderme (Fig 2.8 D) (Tassy et al., 2006). Tassy et al (2006) ont donc proposé l'existence d'un mécanisme de seuillage qui contrôlerait l'induction neurale chez les embryons d'ascidie. Dans le chapitre consacré au rôle de la voie de signalisation éphrine/RasGAP, lors de l'induction des lignages neuraux rostral et dorsal (cf. projet II), je montre nos résultats qui suggèrent que l'antagonisme entre les voies éphrine et FGF est à la base du mécanisme de seuillage.

**INTRODUCTION III :REGIONALISATION
ANTERO-POSTERIEURE DU SYSTEME NERVEUX**

REGIONALISATION ANTERO-POSTERIEURE DU SYSTEME NERVEUX

L'induction neurale et la régionalisation précoce du système nerveux sont deux processus se déroulant relativement simultanément. Néanmoins, j'ai opté pour une présentation séparée de ces deux processus afin de faciliter la lecture.

Le système nerveux est organisé en plusieurs structures réparties le long de l'axe antéro-postérieur (cerveau, mésencéphale, rhombencéphale et moelle épinière). Comme évoquées dans la section précédente, ces structures pourraient être induites par plusieurs organisateurs ayant chacun la capacité d'induire une partie du système nerveux. Cependant, un modèle alternatif proposé par le Dr. Pieter Dirk Nieuwkoop soutient que le système nerveux se forme en deux étapes. La première étape implique l'induction du destin neural avec un caractère antérieur. La deuxième étape, dite de transformation (également appelée étape de postériorisation), implique que certaines cellules reçoivent des signaux transformants provenant du mésoderme et acquièrent un caractère plus postérieur. Dans cette section, je vais décrire plusieurs mécanismes impliqués dans la régionalisation antéro-postérieure du système nerveux.

Après son induction, le neuroectoderme est progressivement régionalisé le long de l'axe antéro-postérieur en plusieurs structures (Fig. 3.1). Suivant le modèle de Nieuwkoop, le tissu neural est d'abord induit en tissu neural rostral avant que des signaux caudalisants transforment les cellules les plus postérieures. Il a été démontré que les signaux tels que FGF (Cox and Hemmati-Brivanlou, 1995), Wnt (McGrew et al., 1995) et RA (acide rétinoïque) (Durst et al., 1989) peuvent caudaliser le neuroectoderme, et sont considérés comme étant les signaux caudalisants proposés par Nieuwkoop (Stern et al., 2006). Ils induisent la première régionalisation de la plaque neurale en deux régions : caudale et rostrale (Fig. 3.1). Des signaux protecteurs des destins antérieurs ont également été identifiés. Parmi eux, *Cerberus* est sécrété à l'extrémité antérieure de la plaque neurale du xénope (Fig. 3.1) (Bouwmeester et al., 1996; Piccolo et al., 1999). L'injection de l'ARNm *Cerberus* induit la formation de structures neurales de type antérieure dans les calottes animales des embryons injectés (Bouwmeester et al., 1996). Il agit en inhibant plusieurs signaux caudalisants tels que BMP et Wnt (Piccolo et al., 1999). Un antagonisme réciproque entre les voies de signalisation BMP et FGF a également été rapporté. Le signal FGF induit l'inactivation du signal BMP, par rétention dans le cytoplasme de SMAD-1 suite à sa phosphorylation, alors que la signalisation BMP induit la répression d'un régulateur positif de la signalisation FGF. Cet antagonisme permet la formation de deux gradients BMP et FGF opposés, qui maintiennent la frontière entre les territoires antérieur et postérieur (Fig. 3.1) (Cho et al., 2013).

Ces signaux de régionalisation permettent l'expression de différents facteurs de transcription le long de l'axe antéro-postérieur (Fig. 3.2) (Price et al., 2011). Par exemple, *Gbx2* est exprimé dans les structures postérieures car il est induit par l'acide rétinoïque (Bouillet et al., 1995). À l'inverse, *Otx2* est exprimé dans les structures antérieures. Son expression est stabilisée par un signal positif provenant du mésoderme antérieur, alors que le mésoderme postérieur réprime l'expression d'*Otx2*. Un traitement à l'acide rétinoïque exogène réprime l'expression d'*Otx2* (Ang et al., 1994). Ces facteurs de transcription agissent par couple. Par exemple, chez la souris, la perte de fonction de *Gbx2* induit l'extension postérieure d'*Otx2*. À l'inverse, l'expression ectopique de *Gbx2*, dans le territoire d'*Otx2* induit une diminution du territoire d'expression d'*Otx2* vers le côté antérieur (Millet et al., 1999). De manière similaire, l'expression ectopique d'*Otx2*, dans le rhombencéphale, induit un recul du domaine d'expression de *Gbx2* vers le côté postérieur (Broccoli et al., 1999). La relation antagoniste entre *Otx2* et *Gbx2* établit une frontière d'expression entre les deux facteurs de transcription. Un mécanisme similaire est également démontré entre les couples de facteurs de transcription *Six3/Irx3* et *Pax6/engrailed* (Araki and Nakamura, 1999; Kobayashi et al., 2002; Matsunaga et al., 2000). Les frontières créées par ces facteurs de transcription correspondent aux frontières des futurs télencéphale (*Six/Irx*), diencéphale, mésencéphale (*Pax/En*) et rhombencéphale (*Otx/Gbx*) (Fig. 3.2) (Kobayashi et al., 2002).

Des organisateurs secondaires se forment à la frontière de ces territoires (Fig. 3.2). Ils organisent localement la formation du système nerveux en induisant l'expression de gènes spécifiques (Vieira et al., 2010). Par exemple, la frontière *Otx2/Gbx2* définit le site d'expression de *FGF8*, caractéristique de l'isthme. La diffusion de FGF, à partir de l'isthme, établit la limite antérieure d'expression des gènes Hox (Irving and Mason, 2000). La zone limitans intrathalamica (ZLI) est un autre inducteur secondaire qui se forme dans le diencéphale, où il établit la frontière entre le pré-thalamus et le thalamus. Cette frontière est matérialisée par l'expression de *sonic hedgehog* (SHH). À partir de la ZLI, SHH diffuse de manière bidirectionnelle et induit l'expression de *Dlx2* (distal-less homeobox 2) du côté antérieur, alors qu'il induit l'expression de *Gbx2* (gastrulation brain homeobox 2) du côté postérieur (Fig. 3.3). Cette réponse différentielle du tissu neural est due au facteur de transcription *Irx3* (Iroquois-related homeobox 3), qui est exprimé uniquement dans les structures postérieures à la ZLI (Fig. 3.2). *Irx3* agit comme un facteur permissif nécessaire à l'expression *Gbx2*. L'expression ectopique d'*Irx3*, du côté antérieur de la ZLI, change la compétence des précurseurs pré-thalamiques. Dans ce cas, ces cellules perdent l'expression de *Dlx2* et expriment *Gbx2*. Ces organisateurs secondaires ne sont pas conservés (ou fortement divergents) chez les ascidies et l'amphioxus. Cependant, des structures similaires (de par leur position et le réseau de gènes impliqués) à la ZLI, ANR et Isthmus ont été identifiées chez l'Hémichordé *S.kowalevskii* (Pani et al., 2012). Cela démontre que

l'apparition de ces structures est antérieure à l'émergence des Vertébrés, et que ces structures ont été partiellement perdues chez l'amphioxus et les ascidies.

Enfin, la régionalisation des structures les plus postérieures (rhombencéphale et moelle épinière) implique les gènes *Hox*. Il s'agit d'une famille de régulateurs transcriptionnels qui contrôlent le développement de différentes structures le long de l'axe antéro-postérieur. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une règle universelle, les gènes *Hox* sont connus pour être exprimés le long de l'axe antéro-postérieur, en miroir de leur organisation sur le génome (notion de colinéarité) (Fig. 3.4 A-B). Chez les Vertébrés, les gènes *Hox* sont d'abord maintenus sous silence lors du développement précoce, puis leur expression antéro-postérieure commence progressivement suivant la direction 3'-5' de l'organisation des gènes sur le génome (notion de colinéarité temporelle). Cela proviendrait d'une modification coordonnée des méthylations présentes sur les gènes *Hox* permettant le passage d'une signature inactivant le gène à une signature activant le gène (revue par Mallo and Alonso, 2013). Dans les futurs rhombomères, les premiers gènes *Hox* sont induits par RA et FGF (revue par Alexander et al., 2009). Cette première activation va permettre l'induction de facteurs de transcription. Par exemple, le gène *Hoxb1* induit l'expression du facteur de transcription Krox20, lequel va dans un second temps restreindre les domaines d'expression d'*Hoxb1* et induire l'expression d'autres gènes *Hox* dans d'autres domaines. L'identité de chaque rhombomère provient de l'expression d'une combinaison de gènes *Hox* (Fig. 3.4 C) (Price et al., 2011). Par exemple, la perte de fonction du gène *Hoxb1* induit la conversion du rhombomère 4 (R4) en rhombomère 2 (R2) (Studer et al., 1996). A l'inverse, l'expression ectopique d'*Hoxb1* induit la conversion de R2 en R4.

REGIONALISATION ANTERO-POSTERIEURE DU SYSTEME NERVEUX CHEZ

L'ASCIDIE

1) FORMATION DE LA PLAQUE NEURALE

Les précurseurs neuraux des trois lignages se divisent pour former la plaque neurale. Les précurseurs neuraux végétatifs (lignage « A ») et animaux (lignages « a » et « b ») sont tous localisés à la marge (frontière entre les pôles animal et végétatif). Les cellules a6.5, b6.5, A7.4 et A7.8 se divisent le long de l'axe médio-latéral et génèrent des cellules filles positionnées à la marge (Fig. 3.5 A-C). La cellule a6.7, qui n'est pas induite vers la destinée neurale au stade 32-cellules, génère un précurseur neural à la marge et un précurseur épidermique (Fig. 3.5 A-C) au stade 64-cellules. Au stade 110-cellules, les précurseurs neuraux antérieurs (lignée a) et postérieurs (lignée A) sont alignés à la marge. Les précurseurs neuraux antérieurs se divisent le long de l'axe antéro-postérieur et la plaque neurale est composée de trois rangées de cellules (stade 3-rangées (3R)) (Fig. 3.5 D). Une division des cellules de chaque rangée selon l'axe antéro-postérieur permet de générer une

plaque neurale composée de 6 rangées (6R) avec 6 cellules (et 8 pour les deux rangées postérieures) (Fig. 3.5 E). La division des différentes rangées n'est pas synchrone. Les cellules de la R1/2 se divisent en premier, suivies des cellules de la R4/6 puis celles de la R3/4 (Nicol and Meinertzhagen, 1988a). Une nouvelle série de divisions le long de l'axe antéro-postérieur génère une plaque neurale composée de 12 rangées (12R) (Fig. 3.5 F-G). La R2 se divise en premier, suivie de la R1. Les cellules des R3 et R5 se divisent de manière quasi synchrone, puis la R5 se divise avant la R6. D'une manière générale, les cellules latérales de chaque rangée se divisent après la division des cellules centrales. Par exemple, les cellules latérales de la R3 (a9.49) se divisent après les cellules centrales de la R3 (a9.33 et a9.37), mais en même temps que les cellules centrales de la R4 (a9.34 et a9.38) (Nicol and Meinertzhagen, 1988a).

Au stade plaque neurale à 6R, les rangées sont appelées rangées 1, 2, 3,4, 5 et 6 ; avec 1 pour la rangée la plus postérieure. Au stade plaque neurale à 3R, la rangée qui donne les rangées 1 et 2 est appelée « rangée 1/2 ». De même, celles qui donnent les rangées 3 et 4 et les rangées 5 et 6 sont appelées « rangée 3/4 » et « rangée 5/6 » respectivement. Les R1 et R2 dérivent de la lignée « A » et vont former les parties ventrale et latérale de la corde nerveuse et du ganglion cérébral (VG), ainsi que la partie postérieure de la vésicule sensorielle (PSV) (Fig. 3.5 H). Les R3 et R4 dérivent de la lignée « a ». La R3 forme la partie intermédiaire de la vésicule sensorielle, comprenant notamment les cellules pigmentaires. La R4 forme la partie antérieure de la vésicule sensorielle (Fig. 3.5 H). Les cellules issues des R5 et R6 n'intègrent pas le système nerveux central de la larve et participent à la formation du système nerveux périphérique. Les cellules de la lignée « b » se situent de chaque côté de la plaque neurale et participent à la formation du système nerveux central, en tant que structure dorsale de la moelle épinière (Fig. 3.5 H).

2) REGIONALISATION DU SYSTEME NERVEUX

Les différents lignages neuraux sont spécifiés différemment dans les embryons chez *C. intestinalis* (cf. Introduction II). Les cellules du lignage « A » ont, dans la plaque neurale, une position plus postérieure que les cellules neurales animales (lignées « a » et « b »). Cela pourrait suggérer que les différents mécanismes d'induction permettent d'attribuer aux cellules leurs caractéristiques antérieure ou postérieure, en même temps que l'induction. Cependant, les cellules issues du précurseur neural A7.4 participent à la formation de la PSV (structure antérieure) et à la partie ventrale du tube neural (structure postérieure). L'identité postérieure ou antérieure du lignage A n'est donc pas attribuée au moment de l'induction. A l'inverse, il semble que cela soit le cas pour les lignages neuraux animaux. Les lignées « a » et « b » adoptent respectivement un destin neural antérieur ou postérieur, qui est caractérisé par l'expression de gènes différents dans ces deux lignages. Cette différence est induite par l'expression différentielle de *FoxA* dans l'embryon précoce (Fig. 1.5). *FoxA* est

présent dans le neuroectoderme antérieur au stade 32-cellules (pendant lequel l'induction neurale se passe), mais absent du neuroectoderme postérieur (lignée « b »). Sous son influence, les cellules de la lignée « a » répriment le programme neural postérieur pour exprimer, au stade plaque neurale, des marqueurs spécifiques du programme antérieur (exemple : *Otx*, *FoxC* ou *Ror-a*). L'expression ectopique de *FoxA* dans le lignage « b » induit la perte d'expression, au stade plaque neurale, de marqueurs postérieurs comme *Msx*, et l'expression ectopique des marqueurs postérieurs cités précédemment (Lamy et al., 2006). Lors de l'induction neurale des lignages animaux, un seul inducteur (FGF9/16/20) est interprété différemment par les cellules en fonction de l'expression de *FoxA*.

Les divisions successives de la plaque neurale le long de l'axe antéro-postérieur (2R→3R→6R→12R) coïncident avec une régionalisation progressive de la plaque neurale et la restriction de la compétence des cellules. Dans ce paragraphe, je présente plusieurs exemples illustrant la régionalisation de la plaque neurale.

La première division (2R→3R) induit la séparation des territoires de *FoxC* (exprimé dans les R5 et R6) et de *ZicL* (exprimé dans les R3 et R4) (Fig. 3.6 A). Cela est dû à l'activation d'ERK1/2 uniquement dans les deux rangées les plus postérieures (R1/2 et R3/4) (Fig. 3.6 B), plus probablement par FGF9/16/20 qui est exprimé dans la R1/2 (Fig. 3.6 A). L'inhibition de la signalisation FGF9/ERK, par l'expression d'une forme tronquée du FGFR (DN-FGFR : FGFR plus probablement par FGF9/16/20 qui est exprimé dans la R1/2 (Fig. 3.6 A). L'inhibition de la signalisation FGF9/ERK, par l'expression d'une forme tronquée du FGFR (DN-FGFR : FGFR sans son domaine intracellulaire), dans les R3 à R6 (utilisation du promoteur du gène *DMRT* qui s'exprime dans la lignée neurale « a » à partir du stade 64-cellules), induit l'expression ectopique de *FoxC* dans les R3 et R4, ainsi que la perte d'expression de *ZicL* (Fig 3.6 C) (Wagner and Levine, 2012). L'utilisation d'un inhibiteur de MEK (UO126) produit les mêmes phénotypes (Wagner and Levine, 2012). Lors de cette division, le signal FGF/ERK est donc responsable de l'expression différentielle de gènes dans les R3/4 et R5/6, en induisant *ZicL* ou en réprimant *FoxC* dans la R3/4 (rangée animale la plus postérieure).

Le passage du stade 3R à 6R implique également une régionalisation antéro-postérieure contrôlée par un signal FGF. Au stade 6R, ERK1/2 est activé uniquement dans la R1 et la R3 (Fig. 3.7 A). L'analyse de marqueurs moléculaires a démontré que l'inhibition de MEK, par un traitement UO126, induit la perte des marqueurs de la R1 et l'expression de marqueurs spécifiques de la R2 dans la R1 (Fig. 3.7 B/C) (Hudson et al., 2007). L'utilisation du DN-FGFR produit les mêmes phénotypes (Fig 3.7 D). Lors de la séparation des R3 et R4, les conséquences de l'inhibition du signal FGF ne sont pas encore décrites.

Enfin, lors de la dernière division 6R→12R, chaque rangée se divise selon l'axe antéro-postérieur. Par exemple, la division de la R3 donne deux rangées, que j'appellerai pour plus

de clarté R3 postérieure (R3p) et R3 antérieure (R3a) (Fig. 3.8 A). Le lignage des cellules pigmentaires est un bon exemple de la régionalisation antéro-postérieure au stade 12R. Les cellules pigmentaires sont deux cellules qui se trouvent dans la vésicule sensorielle du têtard. Ces cellules font parties de deux organes sensoriels : l'otolith et l'ocellus. L'otolith est un organe composé d'une cellule pigmentaire qui mesure la pression. Il est situé dans la vésicule sensorielle en position antérieure par rapport à l'ocellus. L'ocellus est un organe photosensible, composé de plusieurs cellules photoréceptrices et d'une grande cellule pigmentaire (Fig 3.8 A) (Satoh, 1994). Les cellules pigmentaires dérivent des cellules a9.49 (Fig. 3.8 A). Il s'agit des cellules latérales de la R3 de la plaque neurale à 6R. Cette paire de cellules génère au total quatre cellules dans la larve, dont seules les deux cellules plus postérieures deviendront les cellules pigmentaires (Fig 3.8 A - lignage vert clair). Chez *C. intestinalis*, les précurseurs a9.49 expriment dès le stade 6R, le facteur de transcription *MITF* (Microphthalmia-associated transcription factor), qui est un facteur de transcription de la famille bHLH, et trois gènes de la famille tyrosinase, qui sont impliqués dans le métabolisme des pigments (*Tyr* codent pour tyrosinase, *Tyrp1/2a* et *TyrpA/2b* codent pour Tyrosinase related protein) (Esposito et al., 2012). Le patron d'expression de ces gènes est restreint au stade 12R, uniquement dans les cellules pigmentaires (a10.97). Les cellules pigmentaires sont induites par un signal provenant de la lignée neurale « A » (R1 et R2) (Nishida, 1991; Nishida and Satoh, 1989). Dans la lignée des cellules pigmentaires, l'expression d'une forme dominante négative du FGFR, à l'aide du promoteur de *Tyrp1/2a* ou *Tyr*, induit une diminution du nombre de cellules pigmentées ou leur absence, ainsi qu'une mauvaise localisation des cellules dépigmentées. (Squarzoni et al., 2011). Cependant, la nature du signal FGF n'est pas connu car deux ligands FGF (FGF8/17/18 et FGF9/16/20) sont exprimés dans la R2. Au stade 6R, le traitement des embryons avec l'UO126 (inhibiteur de MEK) induit le même phénotype que le DN-FGFR. Cela suggère que le signal FGF agit en activant la cascade MEK/ERK (Squarzoni et al., 2011).

L'activation de la cascade MEK/ERK dans la R3, au stade 6R, induit l'activation transcriptionnelle du gène codant pour un facteur de transcription *ETS1/2*. *ETS1/2* appartient à un sous-groupe de la famille des facteurs de transcription Ets, dont l'activité est contrôlée par une phosphorylation sur thréonine par la voie RAS/MAPK (Wasylyk et al., 1998). La surexpression d'une forme constitutivement inactive *ETS1/2*, dans le lignage pigmentaire (utilisation du promoteur de *Tyrp1/2a*), induit un phénotype similaire au DN-FGFR. A l'inverse, l'expression de la forme constitutivement active de *ETS1/2* (*ETS::VP16*), dans la cellule a9.49, induit des cellules pigmentaires excédentaires (Squarzoni et al., 2011). Ensemble, ces expériences montrent que l'activation du signal FGF/ERK permet d'induire le lignage pigmentaire par *ETS1/2*. Elles démontrent également que, le contrôle de l'activation *ETS1/2* permet de restreindre le nombre de cellules pigmentaire induites (Squarzoni et al.,

2011). Squarzoni et al (2011) ont proposé que seules deux cellules pigmentaires soient induites, car les cellules pigmentaires (a10.97) adoptent, pendant la neurulation, une position plus postérieure que leurs cellules sœur (a10.98). De ce fait, seules les cellules pigmentaires reçoivent, en continu, le signal FGF durant la neurulation. Cela maintient l'expression de *TCF* dans les cellules pigmentaires, ce qui leur permet d'être compétentes pour répondre au signal Wnt, qui assurera la différenciation finale en otolith et ocellus (Squarzoni et al., 2011). Les cellules pigmentaires vont ensuite s'intercaler, le long de l'axe antéro-postérieur, parmi les cellules dorsales du tube neurale (Nakamura et al., 2012). La différenciation finale de l'otolith et de l'ocellus est induite par *Wnt7*, qui est exprimé par dans les cellules de la région du cou (en position immédiatement postérieure par rapport aux cellules a10.97) (Fig. 3.8 A). L'intercalation des cellules pigmentaires, le long de l'axe antéro-postérieur fait que, seule la cellule a10.97 la plus postérieure est instruite par le signal Wnt, pour devenir la cellule pigmentaire de l'ocellus (Abitua et al., 2012). Dans la partie consacré au troisième projet de recherche, je présente comment la signalisation éphrine est impliquée dans le contrôle du lignage pigmentaire. Comme la régionalisation de la plaque neurale implique la signalisation FGF, nous avons cherché à évaluer le rôle de la signalisation éphrine/RasGAP, à chaque étape de la régionalisation antéro-postérieure.

La spécification du lignage des motoneurones est un autre exemple de régionalisation antéro-postérieure au stade 12R. Les cinq paires de motoneurones identifiées chez *C. intestinalis* sont situées en position ventro-latérale, dans le ganglion cérébral, et se projettent en direction des muscles de la larve (Hudson et al., 2011). Les motoneurones proviennent du précurseur neural A8.15 de la R1/2, au stade plaque neurale 3R (qui est à l'origine des lignages vert et rouge sur la Fig. 3.8 B). La spécification du lignage des motoneurones implique deux divisions successives, présentant un patron d'activation d'ERK1/2 différentiel (Fig. 3.8 B, lignage rouge) (Stolfi et al., 2011). Le précurseur du lignage motoneurone A9.30 exprime *FGF8/17/18*, et il est en contact avec la cellule A9.29 qui exprime *éphrine-Ab*. Lors de la division 6R→12R, le précurseur A9.30 génère les cellules A10.60 (où ERK1/2 est activé) et la cellule A10.59 (où ERK1/2 est inactif) (Fig. 3.8 C). Lors de la division suivante, la cellule A10.59 génère les cellules A11.118 (où ERK1/2 est activé) et la cellule A11.117 (où ERK1/2 est inactif) (Fig. 3.8 C). Les auteurs ont émis l'hypothèse que, l'activation différentielle d'ERK1/2 s'explique par le fait que les cellules qui héritent des contacts cellulaires avec l'éphrine-Ab (A10.59 pour la première division et A11.117 pour la deuxième division), sont les cellules dans lesquelles l'activation d'ERK1/2 est inhibée (Fig. 3.8 C) (stolfi et al. 2011). L'étude de ce lignage constitue un nouvel exemple d'inhibition du signal FGF/ERK par la voie éphrine chez *C. intestinalis*. La surexpression de *éphrine-Ab*, dans la cellule A9.30, induit une modification des choix ayant lieu lors de la deuxième division, en inversant le patron d'activation d'ERK1/2 dans les cellules A11.118 et A11.117 (Fig. 3.8 C). Ce

résultat s'explique par le fait que, lors de cette expérience, les membranes les plus fortement exposées à la signalisation éphrine sont héritées par la cellule A11.118. Cette expérience supporte l'hypothèse d'une ségrégation asymétrique de RasGAP, lors d'une division asymétrique induite par l'éphrine chez *C. intestinalis*.

3) ROLE DES GENES *Hox* ?

Le génome de *C. intestinalis* contient neuf gènes *Hox* (Dehal et al., 2002) répartis sur deux chromosomes (Ikuta et al., 2004). Les huit gènes *Hox 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12* et *13* commencent à s'exprimer au stade larve précoce. Les quatre gènes *Hox 1, 3, 5, et 10* présentent une coordination spatiale limitée le long de l'axe antéro-postérieur du tube neural (Ikuta et al., 2004). L'injection de morpholino ne provoque pas de perturbation morphologique de la larve, exceptée pour le morpholino spécifique de *Hox 12* qui cause une malformation de l'extrémité de la queue (ikuta 2010). L'expression colinéaire des gènes *Hox 1, 3, 5, 10* dans le système nerveux suggère qu'ils pourraient être impliqués dans la régionalisation du CNS de la larve. Les gènes *Hox 1, 3, 5* et *10* sont exprimés dans le ganglion cérébral et la partie antérieure de la moelle épinière (fig. 3.9). L'injection de morpholino spécifiques de ces gènes *Hox* n'induit pas de perturbation dans la formation des neurones originaires du ganglion cérébral, ou de la partie antérieure de la moelle épinière, sauf pour le morpholino spécifique de *Hox 10* (Ikuta et al., 2010). L'ensemble de ces résultats indiquent que le rôle des gènes *Hox*, dans l'organisation antéro-postérieure, ne semble pas conservée chez *C. intestinalis*.

**INTRODUCTION IV : LA VOIE DE
SIGNALISATION EPHRINE-EPH**

1) INTRODUCTION

Les récepteurs Eph sont les récepteurs de la voie éphrine. Ils appartiennent à la famille des RTK (Receptor Tyrosine Kinase) et peuvent être divisés en deux catégories, qui reflètent la similarité de leurs séquences et leurs affinités pour les différents ligands (Eph Nomenclature Committee, 1997). Les récepteurs Eph de type A (EphA) se lient préférentiellement aux ligands éphrine de type A (éphrine-A). Ces ligands sont caractérisés par une ancre GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) les retenant attachés à la membrane des cellules qui les expriment (Fig. 4.1 A). Les récepteurs Eph de type B (EphB) se lient préférentiellement aux ligands éphrine de type B (éphrine-B). Ces ligands se différencient des ligands éphrine-A par une absence d'ancre GPI, remplacée par un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Fig. 4.1 A). Les deux formes de ligands restent, sauf exception (Wykosky et al., 2008), liés à la membrane et ne sont pas sécrétés. Le signal éphrine-Eph n'est donc transmis qu'entre des cellules possédant un contact membranaire.

La formation du complexe éphrine-Eph permet la transmission du signal dans le sens du ligand vers le récepteur (signal vers l'avant), mais aussi du récepteur vers le ligand (signal inversé) (Fig. 4.1 B). La transmission vers l'avant implique l'autophosphorylation du récepteur (Fig. 4.1 A), puis le recrutement de protéines sur ses domaines de liaisons, ou la phosphorylation d'autres protéines. La transmission inversée par l'éphrine-B implique la phosphorylation de son domaine cytoplasmique (Fig. 4.1 A) et le recrutement de protéines. Enfin, la transmission inversée par l'éphrine-A (qui ne possède pas de domaine intracellulaire) implique vraisemblablement des co-récepteurs recrutés en cis par son domaine RBD (Receptor-Binding Domain) (Fig. 4.1 A) (Klein, 2012).

2) HISTOIRE EVOLUTIVE

Une analyse phylogénétique indique que les ligands éphrine et les récepteurs Eph n'ont pas divergé en classe A et B simultanément au cours de l'évolution (Mellott and Burke, 2008). Les deux classes de ligands existent chez les Urochordés et les Vertébrés, mais seule la classe éphrine-B est retrouvée chez les non-Chordés et les Céphalochordés (Fig. 4.2 A). Cependant, les récepteurs Eph de *C. intestinalis* ne sont pas divisés en sous-classe A et B comme chez les Vertébrés (Fig. 4.2 B). Cela révèle que les ligands ont divergé en deux sous-classes avant les récepteurs et suggère qu'initialement les récepteurs Eph pouvaient lier les deux classes de ligands (Mellott and Burke, 2008). En effet, les récepteurs EphA4 et EphB2 sont connus pour lier les ligands de la classe opposée (Himanen et al., 2004; Kullander and Klein, 2002).

Le génome de *C. intestinalis* contient quatre gènes codant pour un ligand éphrine-A, un gène codant pour un ligand éphrine-B, ainsi que six gènes codant pour un récepteur Eph (Fig. 4.2) (Mellott and Burke, 2008).

3) FONCTIONS BIOLOGIQUES DE LA SIGNALISATION EPHRINE

La signalisation éphrine est impliquée dans de nombreux processus biologiques pendant le développement, tels que l'angiogenèse, le développement neural, la migration des cellules ou la différenciation des cellules souches (revue par Klein, 2012). Sa dérégulation dans de nombreux cancers est également bien documentée (Pasquale, 2010).

La signalisation éphrine est notamment impliquée dans l'organisation des tissus. Par exemple, lors du développement neural, les segments des rhombomères sont composés de cellules ayant différentes propriétés d'adhésion (Cooke et al., 2005). Chez le poisson zèbre, les rhombomères R3 et R5 expriment EphA4 et les rhombomères R1, R4 et R7 expriment l'éphrine-B2 (Fig. 4.3 A). L'interaction éphrine-Eph induit la répulsion des deux populations de cellules et l'établissement d'une frontière entre les rhombomères. Le renouvellement des cellules de l'épithélium de l'intestin grêle des mammifères est un autre exemple bien décrit, impliquant la signalisation éphrine dans le positionnement des cellules. Cet épithélium est organisé le long d'un axe lumière (ou villus)-crypte. Les cellules différenciées au niveau du villus expriment le ligand éphrine-B1, et les cellules souches situées dans la crypte expriment EphB2 (Fig. 4.3 B). Au cours de la différenciation des cellules de la crypte vers le villus, l'expression du récepteur EphB2 diminue, alors que celle de l'éphrine-B1 augmente (Fig. 4.3 B) (Batlle et al., 2002). La perte de fonction d'EphB2 induit un mauvais positionnement des cellules le long de l'axe de la crypte. Cela suggère que l'expression complémentaire d'EphB2 et d'éphrine-B1 permettent l'organisation du tissu (Batlle et al., 2002).

La signalisation éphrine est également impliquée dans le contrôle de la croissance des axones. Par exemple, lors de la projection des neurones de la rétine vers les colliculus supérieurs (ou tectum optique), des gradients opposés de ligands éphrines et de récepteurs Eph permettent le positionnement précis des axones (Fig. 4.3 C) (revue par Lackmann and Boyd, 2008). Les neurones de la rétine expriment un double gradient éphrine/Eph. Les noyaux de la rétine présentent un gradient d'expression d'EphA dans l'axe nasal-temporal (NT), et un gradient d'expression d'EphB dans l'axe dorso-ventral (Fig. 4.3 C). Il existe également un double gradient éphrine/Eph dans le tectum optique. Un gradient d'expression d'éphrine-A dans l'axe antéro-postérieur, et un gradient d'éphrine-B dans l'axe médio-latéral (Fig. 4.3 C). Des analyses *in vitro* ont révélé que, le gradient d'éphrine-A repousse les axones provenant de la partie temporale de la rétine (forte expression d'EphA), mais n'a pas d'effet sur les axones localisés dans la partie nasale de la rétine (faible expression d'EphA). Cela suggère que le positionnement des axones le long de l'axe antéro-postérieur du tectum optique (Fig. 4.3 C) soit initié par un phénomène de répulsion entre les ligands éphrine-A et les récepteurs EphA (Frisén et al., 1998). A l'inverse, l'organisation médio-latérale du tectum optique suggère qu'un phénomène d'attraction organise les projections axonales. En effet, les neurones de la partie ventrale de la rétine (forte

expression d'EphB) se projettent vers le tectum optique médian (forte expression d'éphrine-B), et que les neurones de la partie dorsale de la rétine (faible expression d'EphB) se projettent vers le tectum optique latéral (faible expression d'éphrine-B) (Fig 4.3 C) (McLaughlin et al., 2003).

4) FONCTIONNEMENT DE LA VOIE EPHRINE

Les récepteurs Eph sont activés par la formation d'un tétramère constitué de deux ligands et de deux récepteurs (Fig. 4.1 B). Cela induit la transphosphorylation des tyrosines du domaine juxta-membranaire d'Eph et un changement de sa conformation (Holland et al., 1997; Pasquale, 2005). Sous sa forme tétramérique, ce complexe ne possède qu'une faible capacité à transmettre le signal. L'activation optimale de la voie de signalisation ne sera obtenue que par la formation de larges plateformes de signalisations à la membrane, également appelées « cluster » en anglais (Fig. 4.1 B) (Klein, 2012). Ces plateformes sont composées d'agrégats de récepteurs Eph recrutés en cis, ainsi que d'autres protéines impliquées dans la transmission du signal éphrine ou dans sa régulation (revue par Janes et al., 2012). La formation de cette plateforme est initiée par la formation du complexe éphrine-Eph, suivie du recrutement en cis du récepteur par une contraction actine-myosine (Salaita et al., 2010). Ce recrutement peut s'étendre de manière indépendante du ligand, au-delà de la zone d'interaction avec l'éphrine (Fig. 4.1 B) (Wimmer-Kleikamp et al., 2004). Le signal transmis à partir des clusters peut être perturbé par un phénomène d'inhibition latérale, créée par l'interaction *en cis* entre ligand et récepteur. Cette inhibition survient lorsque le ligand et le récepteur sont co-exprimés dans la même cellule (Carvalho et al., 2006). Cependant, la co-expression du ligand et du récepteur, dans une même cellule, ne produit pas toujours une inhibition latérale, puisqu'ils peuvent être physiquement séparés sur des domaines membranaires distincts (Marquardt et al., 2005).

Les récepteurs Eph (transmission du signal vers l'avant) agissent par le recrutement de protéines adaptatrices. Certaines de ces protéines régulent les Rho GTPases (RhoA, Cdc42 ou Rac) pour remodeler le cytosquelette d'actine. Par exemple, le guanine nucleotide exchange factor (GEF) ephrexin1 interagit avec le récepteur EphA4. Ephrexin1 est phosphorylée lors de cette interaction et agit sur l'activité de RhoA. Cela provoque des modifications du cytosquelette d'actine et la rétractation des axones (Sahin et al., 2005). Les récepteurs Eph possèdent également la capacité de réguler les GTPases de la famille Ras (voir ci-dessous). Les ligands éphrine-B (transmission du signal inversé) sont activés lors de la formation des plateformes membranaires par phosphorylation. Les ligands éphrine-B activés recrutent sur leurs domaines SH2 et PDZ, des protéines qui vont transmettre le signal éphrine inversé. Par exemple, Grb4 se fixe sur les ligands éphrine activés et agit en modifiant le cytosquelette d'actine et les adhésions focales (Cowan and Henkemeyer, 2001). La transmission du signal inversé par les ligands éphrine-A ne peut se faire directement car ils ne possèdent pas de

domaine intracellulaire. La transmission du signal se fait par le recrutement en cis de co-récepteurs (Fig 4.1 A). Par exemple, dans les neurones de la rétine, les ligands éphrine-A recrutent p75 neurotrophin receptor (NTR). Chez la souris, la perte de fonction de NTR, dans les neurones de rétine, induit une localisation trop antérieure des projections axonales dans le tectum optique. Cela démontre que NTR est nécessaire à la répulsion des axones de la rétine (Lim et al., 2008).

La répulsion des cellules est induite par la séparation physique des cellules. Cette séparation est induite lors du clivage du complexe éphrine-Eph par une metalloprotéase (ADAM10). ADAM10 agit en clivant le ligand uniquement après la formation d'un complexe éphrine-Eph actif ce qui permet la séparation des deux cellules (Fig. 4.4 A) (Janes et al., 2009). L'expression d'un ligand résistant à la protéolyse par ADAM10 réduit la répulsion d'axones en croissance, suggérant que la protéolyse par ADAM10 soit nécessaire à l'arrêt du signal (Hattori et al., 2000). L'endocytose du complexe éphrine-Eph est également impliquée lors du processus de répulsion. Il apparaît que l'endocytose peut avoir lieu dans la cellule qui exprime le ligand, ou dans celle qui exprime le récepteur (Fig. 4.4 B/C). Des essais, utilisant des formes tronquées des ligands et des récepteurs, suggèrent que le sens d'internalisation dépend de la direction du signal. Un récepteur EphB2 tronqué, sans domaine cytoplasmique, sera internalisé dans la cellule qui exprime un ligand éphrine-B1 fonctionnel (Fig 4.4 C). A l'inverse, l'endocytose se fera dans la cellule qui exprime le récepteur, si le récepteur est intact et que le ligand est tronqué de son domaine cytoplasmique (Fig 4.4 B). Enfin, un complexe formé de ligands et de récepteurs tronqués n'est pas internalisé et induit le maintien de l'adhésion entre les cellules (Zimmer et al., 2003). L'internalisation de l'éphrine-B2 dans les cellules qui expriment EphB4, induit le transfert de la protéine éphrine-B2 intacte, dans la cellule qui exprime le récepteur (Marston et al., 2003). Cela suggère que le complexe reste fonctionnel après l'endocytose. Plusieurs voies d'endocytoses peuvent être impliquées dans ce processus. Par exemple, le traitement par EphB1 soluble, sur des cellules en culture exprimant éphrine-B1, induit l'internalisation de l'éphrine-B1 et sa co-localisation avec un marqueur d'endosomes précoces (ex : EEA1 - Early Endosome Antigen 1). Cette internalisation peut être bloquée par un dominant négatif de la Dynamin, suggérant un mécanisme dépendant des clathrines (Parker et al., 2004). D'autre part, le récepteur EphB1 (Vihanto et al., 2006), les ligands éphrine-A5 (Davy and Robbins, 2000) et éphrine-B1 (Parker et al., 2004), sont retrouvés accumulés dans des structures membranaires appelées radeaux lipidiques (lipids rafts ou caveolae). Les caveolae sont impliquées dans la régulation des protéines qui s'y trouvent et dans un processus d'internalisation indépendant des clathrines. De plus, les récepteurs EphB1 et EphA2 interagissent avec Caveolin-1. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'endocytose du complexe éphrine-Eph peut également être indépendante des clathrines.

5) INTERACTIONS AVEC LES MAPK

Les récepteurs de l'éphrine possèdent la capacité d'interagir avec de nombreuses voies de signalisation, en contrôlant directement des seconds messagers (ex : PI3K, MAPK, Rho, Rac et CDC42), ou en interagissant en cis avec d'autres récepteurs (ex : le FGFR ou les Intégrines). L'interaction entre la signalisation éphrine et la cascade MEK/ERK a été démontrée *in vitro* dans de nombreuses lignées cellulaires d'espèces animales variées (Fig. 4.5). Parmi les lignées cellulaires utilisées, on retrouve fréquemment des lignées endothéliales, neuronales ou cancéreuses, qui expriment de manière constitutive un ou plusieurs récepteurs Eph. La stimulation d'EphA2 par l'éphrine-A1 induit l'activation d'ERK, par recrutement de la protéine adaptatrice Grb2, dans la lignée PC-3 et diverses lignées MDA (Pratt and Kinch, 2002). De même, le couple éphrine-A1/EphA2 peut également induire une inhibition d'ERK dans les cellules pRNS1-1, PC-3, MEF, BAEC, NIH3T3, HEK293 (Miao et al., 2001), Cos-7 (Dail et al., 2006), NG-108 et HEK293 (Tong et al., 2003). La stimulation des récepteurs de type B montre également une régulation d'ERK. La stimulation par l'éphrine-B2 induit l'inhibition d'ERK en aval des récepteurs EphB2, dans les cellules NG-108, COS (Elowe et al., 2001), NG-108 (Holland et al., 1997), HUVEC (Kim et al., 2002). Le même effet est observé en aval d'EphB4 dans les cellules HUVEC (Kim et al., 2002) et HEK293 (Poliakov et al., 2008). Le récepteur EphB4 peut également activer ERK, après stimulation par l'éphrine-A5 dans les cellules PC-12 (Shin et al., 2008). Ensemble, ces études montrent que l'activation ou l'inactivation d'ERK dépend du type cellulaire et/ou du couple éphrine-Eph. Ces études montrent également que dans la majorité des essais pratiqués, il apparaît que la signalisation éphrine-Eph agit en inhibant l'activation d'ERK.

Dans certains cas, la signalisation éphrine permet de réguler l'activation d'ERK initiée par d'autres voies de signalisation. (Elowe et al., 2001; Kim et al., 2002; Miao et al., 2001). Par exemple, les cellules HUVECs répondent au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et à l'angiopoïétin-1 (Ang1) par une augmentation de l'activité de Ras, provoquant la migration des cellules. Ces cellules expriment également les récepteurs EphB2, EphB3 et EphB4. En réponse à l'éphrine-B2, les récepteurs EphB2 et EphB4 sont phosphorylés et recrutent RasGAP. Cela se traduit par l'inhibition de l'activation de Ras induite par VEGF et Ang1, et une inhibition de la migration des cellules (Kim et al., 2002). L'inhibition d'ERK par les récepteurs EphA2/B2/B4 est liée au recrutement de RasGAP, sur deux domaines SH2 conservés « pY-X-X-P » (Dail et al., 2006; Elowe et al., 2001; Holland et al., 1997; Kim et al., 2002; Miao et al., 2001; Tong et al., 2003). Il semble que l'effet biologique produit par l'activation du récepteur Eph dépend des protéines cytoplasmiques venant se fixer sur le récepteur. Par exemple, le remplacement d'un site de liaison de RasGAP par un site de liaison de Grb2, sur le récepteur EphB2, permet de modifier la réponse d'une inhibition d'ERK vers une activation d'ERK (Tong et al., 2003).

Des études *in vivo* ont démontré que la signalisation éphrine régule négativement la signalisation MEK/ERK, notamment chez *C. intestinalis* (Picco et al., 2007; Stolfi et al., 2011) et *C. elegans*. Dans les chapitres introduction II et III, j'ai présenté le rôle de la signalisation éphrine dans la régulation de l'activation d'ERK1/2 chez *C. intestinalis*. Chez *C. elegans*, le gène *vab-1* code pour le seul récepteur Eph présent dans le génome. Chez *C. elegans*, la maturation des ovocytes commence après la fécondation, par l'activation de la cascade MAPK/ERK via un « facteur sperme » inconnu. Le récepteur *vab-1* est impliqué dans la régulation de la maturation ovocytaire en inhibant l'activation d'ERK. Une perte de fonction du récepteur *vab-1*, ou de l'éphrine, induit l'activation ectopique d'ERK et une augmentation de la maturation des ovocytes en absence de sperme (Miller et al., 2003). Chez *C. elegans*, les gènes *gap-1* et *gap-2* codent pour deux protéines RasGAP. La double perte de fonction *gap-1/gap-2* phénocopie une perte de fonction *vab-1*, en induisant une augmentation de la maturation des ovocytes (Yang et al., 2010). Cela suggère que RasGAP soit impliqué dans l'inhibition des MAPK, induite par Vab-1.

RÉSULTATS & DISCUSSIONS

**PROJET I : ROLE DE P120-RASGAP DANS
L'ATTENUATION DE LA VOIE FGF PAR LA VOIE
EPHRINE/EPH DANS LES EMBRYONS D'ASCIDIE**

QUESTIONS ET BUTS DE L'ETUDE

La signalisation éphrine/Eph est impliquée dans la migration des neurones, le développement vasculaire, l'organisation des tissus ou encore le cancer (Klein, 2012; Pasquale, 2010). Le signal éphrine agit en recrutant des protéines guanine nucleotide exchange factors (GEFs) et GTPase activating protein (GAPs). Ces protéines permettent de moduler l'activité des petites protéines G de la famille de Rho et Rac (Noren and Pasquale, 2004), afin de réguler l'organisation du cytosquelette et l'adhésion cellulaire. Plusieurs études utilisant des modèles cellulaires ont mis en évidence que la signalisation éphrine atténue l'activation d'ERK, initié par d'autres RTK. Certaines de ces études ont pu mettre en évidence que cette atténuation est liée au recrutement de P120-RasGAP sur le récepteur Eph activé (Elowe et al., 2001; Kim et al., 2002).

Au cours de l'embryogenèse de l'ascidie *C. intestinalis*, la signalisation éphrine joue un rôle clé dans la spécification des lignages neuraux (Picco et al., 2007; Stolfi et al., 2011). Lors de l'induction neurale, les précurseurs notochorde-neural se divisent de façon asymétrique pour générer un précurseur de la notochorde (ERK+) et un précurseur neural (ERK-). L'inhibition de l'activation d'ERK dans les précurseurs neuraux est éphrine dépendant (Picco et al., 2007). Lors de la neurulation, les précurseurs des motoneurons commencent leurs spécifications par deux divisions asymétriques, impliquant une atténuation d'ERK dépendante du signal éphrine/Eph (Stolfi et al., 2011). Dans les deux cas, il s'agit d'une transmission du signal vers l'avant, car l'expression d'un dominant négatif d'Eph3, sans domaine cytoplasmique (Eph3ΔC), induit l'activation ectopique d'ERK (Picco et al., 2007; Stolfi et al., 2011). Notre laboratoire a proposé un modèle dans lequel RasGAP agit comme médiateur cytoplasmique de la voie de signalisation éphrine/Eph, lors de l'atténuation de la voie FGF/ERK (Fig. 2.7 et 3.8 C)(Picco et al., 2007). Dans cette partie, je présente les deux axes de recherches développés pour tester cette hypothèse.

DONNEES PRELIMINAIRES

A mon arrivée en thèse, le laboratoire avait déjà entrepris la caractérisation de RasGAP en utilisant à la fois un morpholino et un dominant négatif de RasGAP. Cette approche phénocopie l'inhibition de la voie éphrine/Eph (*éphrinAd* ou *Eph3*), puisque l'expression de *ETR* est perdue et que celle de *Brachyury* est exprimée de manière ectopique dans le lignage neural « A ». Ce résultat indique que RasGAP est impliqué dans la signalisation éphrine-Ad/Eph3 lors de la spécification neurale du lignage « A ».

MANUSCRITS DE L'ARTICLE

Diffusion non autorisée

Development 2013 Nov;140(21):4347-52

**p120RasGAP mediates ephrin/EPH-dependant attenuation
of FGF/ERK signals during cell fate specification in ascidian embryos**

Diffusion non autorisée

Development 2013 Nov;140(21):4347-52

**p120RasGAP mediates ephrin/EPH-dependant attenuation
of FGF/ERK signals during cell fate specification in ascidian embryos**

Diffusion non autorisée

Development 2013 Nov;140(21):4347-52

**p120RasGAP mediates ephrin/EPH-dependant attenuation
of FGF/ERK signals during cell fate specification in ascidian embryos**

Diffusion non autorisée

Development 2013 Nov;140(21):4347-52

**p120RasGAP mediates ephrin/EPH-dependant attenuation
of FGF/ERK signals during cell fate specification in ascidian embryos**

Diffusion non autorisée

Development 2013 Nov;140(21):4347-52

**p120RasGAP mediates ephrin/EPH-dependant attenuation
of FGF/ERK signals during cell fate specification in ascidian embryos**

Diffusion non autorisée

Development 2013 Nov;140(21):4347-52

**p120RasGAP mediates ephrin/EPH-dependant attenuation
of FGF/ERK signals during cell fate specification in ascidian embryos**

ANNEXE 1 : LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE P120-RASGAP DANS LES EMBRYONS D'ASCIDIE

Les études précédentes (Picco et al., 2007; Stolfi et al., 2011) ont proposé un modèle pour l'atténuation de la voie de FGF/ERK1/2, par celle de l'éphrine/Eph, lors de divisions cellulaires asymétriques dans les embryons d'ascidie. Dans ce modèle, la localisation polarisée de p120-RasGAP dans le cortex est induite par un signal éphrine directionnel dans les cellules mères. Le premier objectif de ma thèse a été de visualiser la localisation subcellulaire de RasGAP dans les embryons de *C. intestinalis*, afin de tester ce modèle. L'utilisation d'anticorps commerciaux ciblant différents épitopes de RasGAP avait déjà été entreprise, mais n'avait pas fourni de résultats probants. J'ai entrepris la génération d'un anticorps dirigé contre la forme entière de RasGAP. Afin de faciliter la production de la protéine RasGAP, notamment sa solubilisation, nous avons opté pour la production de demies protéines RasGap N-terminal de 60KDa (Rg-Nter), et RasGAP C-terminal de 50KDa (Rg-Cter). Afin de produire les anticorps spécifiques des différentes versions de RasGap, chaque protéine a été inoculée dans des souris par une compagnie spécialisée (Proteogenix, France), suivant un protocole de production de 3 mois.

Pour réaliser mon étude, j'ai seulement pu tester la spécificité de l'anticorps Rg-Cter, car le titre de l'anticorps Rg-Nter était trop faible pour permettre la détection de la protéine par immunoblot. La spécificité de Rg-ter a été analysée par western blot à la fois contre la protéine ayant servi à immuniser les souris (contrôle positif) et contre des lysats d'embryons de *C. intestinalis* dans différents tampons de lyse plus ou moins dénaturants. L'anticorps reconnaît la protéine utilisée pour l'immunisation (Rg-Cter), mais ne reconnaît aucune protéine issue des embryons lysés (Fig. I.1 A).

J'ai par la suite procédé à différents essais d'immunomarquages avec l'anticorps Rg-Cter. L'immunomarquage sur des embryons, au stade 32-cellules, montre un signal situé au niveau des membranes ou du cortex, ainsi qu'un marquage important autour des noyaux (Fig. I.1 B). Afin de tester la spécificité du signal, j'ai électroporé le plasmide *pFOG>RasGAP*, dans des ovocytes fécondés de *C. intestinalis*, afin de surexprimer RasGAP dans les embryons. Le promoteur du gène *Fog* (Friend of GATA) est actif à partir du stade 16-cellules, dans l'hémisphère animal de l'embryon de cione (Rothbächer et al., 2007). Dans ces conditions, je n'ai pas observé d'augmentation du signal (Fig. I.1 B). Afin de tester si la localisation observée aux membranes était induite par l'activation de la voie de signalisation éphrine/Eph, nous avons injecté le MO éphrine-Ad. Cela n'induit pas de modification du signal à la membrane (Fig. I.1 B). Enfin l'électroporation de *pFOG>Venus-RasGAP* présente un signal mosaïque. Le signal RasGAP, détecté par immunomarquage, n'est pas supérieur

dans les cellules surexprimant Venus-RasGAP (Fig.I.1 B). Ensemble, ces expériences montrent que le signal observé avec l'anticorps Rg-Cter n'est pas spécifique de RasGAP.

BILAN ET PERSPECTIVES

Cette étude sur RasGAP a permis d'élucider de nombreux points sur le fonctionnement de la signalisation éphrine/Eph chez *C. intestinalis*. Parmi les questions posées au début de cette étude, mes travaux ont permis de mettre en évidence que, RasGAP est l'effecteur principal de la signalisation éphrine/Eph lors de l'atténuation de la voie FGF/ERK et d'élucider, en partie, le mécanisme d'action.

L'implication de RasGAP, en aval de la signalisation éphrine, n'est pas une particularité des ascidies, puisque lors de la maturation des ovocytes chez *C. elegans*, l'analyse de mutants RasGAP suggère que le récepteur Vab-1 et les protéines RasGAP (Gap-1 et Gap-2) agissent dans la même voie de signalisation (cf. introduction IV). Cependant, nos résultats sont la première démonstration *in vivo* du recrutement de RasGAP, lors de la transmission vers l'avant du signal éphrine. Ces résultats supportent l'hypothèse initialement proposée de la ségrégation asymétrique de RasGAP, lors des divisions des cellules mères notochorde/neural (Fig 2.6) et du lignage des motoneurones (Fig 3.8 C). Lors de cette étude, j'ai tenté de tester ce modèle par la visualisation directe de RasGAP, sans pour autant réussir à valider ou à infirmer ce modèle (cf. annexe 1). La visualisation de la dynamique de localisation subcellulaire de RasGAP est une étape importante, qui permettrait de démontrer le mode d'action de la signalisation éphrine/RasGAP, couplée avec des divisions asymétriques.

L'approche biochimique utilisée au cours de ma thèse souligne que les ascidies possèdent un grand potentiel pour cette approche. L'application combinée de techniques telles que l'électroporation, la cytométrie de flux et l'immunoprécipitation sur quelques milliers d'embryons synchrones permet d'envisager une analyse rapide des interactions protéiques par une approche protéomique. Ces avantages, couplés à celui du au lignage invariant de l'ascidie font de ce modèle, un modèle un modèle de choix pour l'étude des mécanismes subtils utilisés par les voies de signalisation pour générer une multitude de réponses différentes.

**PROJET II : ROLE DE L'ANTAGONISME ENTRE
LES VOIES FGF ET EPHRINE DANS LA REPONSE
BINAIRE LORS DE L'INDUCTION NEURALE DANS
LES EMBRYONS D'ASCIDIE**

INTRODUCTION

Chez *C. intestinalis*, les cellules de l'ectoderme effectuent, au stade 32-cellules, un choix binaire entre le destin neural et le destin épidermique (Hudson and Lemaire, 2001). Parmi les 16 cellules de l'ectoderme, seules quatre cellules appelées a6.5 et b6.5 deviennent les précurseurs neuraux. De précédentes études ont démontré que le ligand FGF9/16/20, exprimé dans des cellules de l'hémisphère végétatif, était l'inducteur neural chez la cône. Il agit en activant la cascade MEK/ERK et l'expression d'*Otx* dans les précurseurs neuraux (Bertrand et al., 2003; Hudson et al., 2003). Parmi les cellules de l'ectoderme, l'activation d'ERK1/2 et l'expression d'*Otx* sont observés « quasi » uniquement dans les précurseurs neuraux parmi les cellules de l'ectoderme (Hudson et al., 2003), ce qui indique que l'induction neurale dans l'embryon d'ascidie est une réponse binaire, de type « tout ou rien ». L'analyse des embryons reconstruits en trois dimensions (3D) a permis de mesurer la surface des contacts cellulaires, entre chaque cellule de l'ectoderme et les cellules exprimant *FGF9/16/20* (Tassy et al., 2006). Cette étude a révélé que les précurseurs neuraux sont les cellules qui possèdent les plus grandes surfaces de contact avec les cellules exprimant l'inducteur neural (Tassy et al., 2006). Cependant, toutes les cellules de l'ectoderme possèdent des surfaces de contact plus ou moins étendues avec les cellules qui expriment le FGF. L'activation d'ERK1/2 restreinte uniquement aux précurseurs neuraux, suggère que cette activation ne soit pas proportionnelle aux surfaces de contact. Cela suggère l'existence d'un mécanisme de seuillage en réponse au signal FGF. Cette étude vise à étudier cet effet seuil.

Un signal antagoniste peut générer un effet seuil, comme celui observé lors de l'induction neurale des cellules animales. En effet, si un signal antagoniste inhibe le signal activateur, alors un fort signal activateur sera suffisant pour induire les cellules. La signalisation éphrine/RasGAP a immédiatement été considérée comme une piste de recherche particulièrement sérieuse. Premièrement, au moment de la spécification des cellules de l'hémisphère animal, le ligand *éphrine-Ad* est exprimé par les cellules animales (Fig. II.1 A) (Imai et al., 2004; Picco et al., 2007). Deuxièmement, la signalisation éphrine/Eph3 contrôle l'activation d'ERK1/2 dans les cellules végétatives à ce stade du développement (Picco et al., 2007; Shi and Levine, 2008). Enfin, dans le chapitre précédent, j'ai démontré que la signalisation éphrine recrute RasGAP afin d'inhiber l'activation d'ERK1/2, initiée par la voie FGF. Dans cette partie, je présente mes résultats concernant le rôle de la signalisation éphrine/RasGAP lors de l'induction neurale des cellules animales.

RESULTATS

1) LA SIGNALISATION EPHRINE/RASGAP EST REQUISE DE FAÇON CELLULAIRE-AUTONOME POUR LE CONTROLE DE L'EXPRESSION D'Otx DANS LES CELLULES DE L'ECTODERME

Nous avons testé le rôle de la signalisation éphrine/RasGAP dans l'induction neurale en la bloquant aux niveaux du ligand (éphrine-Ad), du récepteur (Eph3) et du médiateur cytoplasmique (RasGAP). L'injection d'un morpholino dirigé contre *éphrine-Ad* (ephrinAd-MO) ou d'une forme dominante négative d'*Eph3* (*Eph3ΔC*) ou de *RasGAP* (*RGΔGAP*), induit le même phénotype (Fig. II.1 D-F). Nous avons analysé l'expression d'*Otx* au stade 44-cellules. Dans l'hémisphère animal, *Otx* est exprimé de façon spécifique dans les deux paires de cellules de l'ectoderme, a6.5 et b6.5 (Fig. II.1 C). Lorsque ces molécules sont injectées, nous observons une expression ectopique d'*Otx* dans d'autres cellules de l'ectoderme (Fig. II.1 D-F). Il faut noter que les cellules a6.7 expriment *Otx* de manière ectopique avec une fréquence bien plus importante que les autres cellules de l'ectoderme. Les cellules a6.7 possèdent la troisième plus grande surface de contact avec les cellules végétatives, après celles des précurseurs neuraux (a6.5 et b6.5) (Tassy et al., 2006). Ce résultat montre que la signalisation éphrine/RasGAP est nécessaire pour confiner l'expression d'*Otx* dans les cellules a6.5 et b6.5. Afin de tester si cette signalisation serait directement nécessaire dans les cellules de l'ectoderme, nous avons exprimé *RGΔGAP* dans la lignée a4.2 en injectant l'ARNm dans une des deux cellules a4.2 de l'embryon au stade 8-cellules. Dans ces embryons, l'expression ectopique d'*Otx* est observée dans les cellules du lignage épidermique (Fig. II.1 F), ce qui suggère que la signalisation éphrine/RasGAP agit de façon cellulaire-autonome dans les cellules de l'ectoderme.

2) LA SIGNALISATION EPHRINE/RASGAP CONTROLE LA REPONSE AU SIGNAL FGF DANS LES CELLULES DE L'ECTODERME

Afin de tester si la signalisation éphrine/RasGAP est impliquée dans l'induction neurale, en contrôlant la réponse des cellules de l'ectoderme au signal FGF/ERK, nous avons analysé l'effet des modifications de cette voie de signalisation sur l'activation d'ERK1/2. Pour cela, nous avons injecté le MO dirigé contre *éphrine-Ad*, ou l'ARNm codant pour *RGΔGAP*, dans une cellule au stade 2-cellules. Dans les deux cas, l'inactivation de la signalisation éphrine induit l'activation ectopique d'ERK1/2 dans les cellules de l'ectoderme du côté injecté (Fig. II.1 H-I). Inversement, une surexpression d'*éphrine-Ad* dans la moitié de l'embryon, par l'injection de l'ARNm codant pour *éphrine-Ad* au stade 2-cellules, induit une perte de l'activation d'ERK1/2 dans les précurseurs neuraux a6.5 et b6.5 du côté injecté (Fig. II.1 G). L'activation d'ERK1/2 dans les cellules non injectées reste inchangée (Fig. II.1 G). Ces expériences montrent que la signalisation éphrine/RasGAP contrôle la réponse des cellules

de l'ectoderme au signal FGF. Dans cette expérience, j'ai effectué l'immunomarquage des embryons, l'acquisition des images au microscope confocale ainsi que l'analyse statistique.

3) L'INHIBITION DE LA SIGNALISATION EPHRINE N'INFLUENCE PAS LES SURFACES DE CONTACT ENTRE LES CELLULES DE L'ECTODERME ET CELLES DE L'HEMISPHERE VEGETATIF

Les résultats ci-dessus suggèrent fortement que la signalisation éphrine contrôle la réponse des cellules de l'ectoderme au signal FGF, en agissant directement sur la voie de signalisation FGF/ERK. Nous pensons qu'elle définit le niveau du seuil d'activation d'ERK en réponse au signal FGF, contrôlant le destin neural (Fig II.2 A). L'inhibition de la signalisation éphrine induit une diminution de ce seuil d'activation d'ERK1/2 et l'expression d'*Otx*, de façon ectopique dans les précurseurs ectodermiques qui reçoivent un signal FGF inférieur aux précurseurs neuraux (Fig. II.2 B). Cependant, une autre hypothèse peut être envisagée. La signalisation éphrine est impliquée dans l'adhérence des cellules et dans le contrôle de la morphologie cellulaire, par son action sur le cytosquelette (Klein, 2012). Ainsi, l'inhibition de la signalisation éphrine pourrait induire un dérèglement de ces deux processus. Cela pourrait générer des modifications des surfaces de contact entre les blastomères, ce qui induirait l'activation ectopique d'ERK1/2 (Fig. II.2 C).

Afin de tester cette possibilité, nous avons élaboré une expérience qui consiste à mesurer les surfaces de contact entre les cellules, à partir de reconstructions en 3D d'embryons au stade 32-cellules. Dans ces embryons, la signalisation éphrine est bloquée. Pour cela, nous avons injecté les embryons avec l'ARNm codant pour *Eph3ΔC* dans une cellule a4.2 au stade 8-cellules. Au stade 32-cellules, les descendants de la cellule a4.2 sont les quatre cellules a6.5, a6.6, a6.7 et a6.8. Les embryons injectés ont été fixés en vue d'un immunomarquage avec l'anticorps anti-dpERK1/2. Afin de reconstruire ces embryons en 3D, l'immunomarquage dpERK1/2 a été couplé avec un marquage phalloïdine pour marquer les membranes cellulaires (Fig. II.3 A). Puis, des acquisitions d'images ont été réalisées au microscope confocal de façon à obtenir des coupes optiques sur toute l'épaisseur de l'embryon. Nous avons reconstruit uniquement les embryons qui montraient une activation ectopique d'ERK1/2 dans le clone d'injection (Fig. II.3 A). Pour chaque embryon reconstruit, nous avons quantifié les surfaces de contact des cellules issues du clone d'injection, ainsi que celles issues de la cellule a4.2 non injectée (Fig. II.3 B). Cette approche révèle que la modification de la voie éphrine n'a pas d'effet sur les surfaces de contact entre les cellules de l'ectoderme et les cellules exprimant *FGF9/16/20*. Ce résultat supporte notre hypothèse selon laquelle, l'antagonisme entre les voies éphrine et FGF est la base moléculaire de la réponse binaire qui contrôle l'induction neurale chez les embryons d'ascidie. J'ai réalisé l'ensemble des étapes de cette expérience, excepté l'injection de l'ARNm *Eph3ΔC*.

DISCUSSION

Chez *C. intestinalis*, la signalisation éphrine/Eph agit en régulant l'activité de la cascade MEK/ERK, lors de l'induction neurale des cellules animales au stade 32-cellules et, lors de la spécification de plusieurs autres lignages cellulaires (Picco et al., 2007; Shi and Levine, 2008; Stolfi et al., 2011). Dans l'ensemble de ces cas, le signal éphrine antagonise l'activation de la cascade MEK/ERK initiée par FGF. Nos résultats montrent que RasGAP agit en aval de la signalisation éphrine lors de l'induction neurale des cellules animales. Ces données indiquent que les signalisations FGF et éphrines convergent au niveau de Ras. La position d'intermédiaires communs de Ras suggère qu'il peut agir comme un centre d'intégration des signaux entrants (FGF et éphrine). En fonction de l'état d'activation de la protéine Ras, la cascade MEK/ERK sera activée ou non, ce qui scellera le destin des cellules (Fig. II.4 A).

La mesure des surfaces de contact entre les cellules pourrait permettre d'estimer les quantités de signaux reçus par les cellules; en considérant que plus la surface de contact est grande, plus la quantité de ligand se fixant sur les récepteurs est importante (Tassy et al., 2006). Un premier modèle propose que le choix binaire épiderme/neural pourrait être contrôlé par la quantité de signal FGF reçue par les cellules épidermiques. Ce modèle prédit que seules les deux paires de précurseurs neuraux seraient induits, car ces cellules possèdent de larges surfaces de contact avec l'inducteur neural (FGF), à la différence des autres cellules ectodermiques (Fig. II.5 A)(Tassy et al., 2006). Dans ce modèle, le contact entre les cellules compétentes et les cellules inductrices est l'élément clef du processus d'induction. Cependant, les cellules ne répondent pas de manière linéaire à la quantité de signal inducteur, suggérant l'existence d'un effet seuil (Tassy et al., 2006).

Dans cette étude, nous avons démontré que la voie éphrine-Ad/Eph antagonise le signal FGF9/16/20 et, que cette interaction définit le seuil de réponse des cellules ectodermiques à l'inducteur neural (FGF). En utilisant le même raisonnement, j'ai mesuré les surfaces de contact qu'il existe entre chacune des cellules de l'ectoderme qui expriment le ligand éphrine-Ad. Pour cela, j'ai utilisé les embryons reconstruits en 3D, publiés sur la base de données ANISEED (Fig. II.4 B) (www.aniseed.cnrs.fr/aniseed/download/download_data). Cette approche montre que les précurseurs neuraux a6.5 et b6.5 possèdent non seulement les plus grandes surfaces de contact avec les cellules exprimant FGF9/16/20, mais aussi les plus petites surfaces de contact avec les cellules de l'ectoderme qui exprime éphrine-Ad. A l'inverse, les précurseurs épidermiques possèdent les plus petites surfaces de contact avec les cellules exprimant FGF9/16/20 et, les plus grandes surfaces de contact avec les cellules de l'ectoderme qui exprime *éphrine-Ad*. En considérant les surfaces de contact comme un moyen d'estimer l'intensité des signaux reçus, j'ai calculé le ratio FGF/éphrine (Fig. II.4 C). Ce ratio révèle l'existence de deux populations de cellules : celles avec un fort ratio correspondent aux précurseurs neuraux alors que, celle avec un faible ratio correspondent aux précurseurs épidermiques. Ces observations supportent le modèle dans lequel

l'interaction entre les voies de signalisation FGF et éphrine est à l'origine de la réponse binaire (épiderme/neural) des cellules ectodermiques.

Toutes les cellules de l'ectoderme sont compétentes pour adopter le destin neural (Hudson & Lemaire, 2001; Bertrand et al., 2003). Nous posons l'hypothèse dans laquelle la réponse binaire serait initiée au niveau de Ras, par l'antagonisme FGF/éphrine (Fig. II.5 B). En fonction de l'état d'activation de Ras, les cellules adopteraient le destin neural (Ras actif) ou le destin épidermique (Ras inactif). Nos résultats montrent que la signalisation éphrine/RasGAP antagonise le signal FGF. Cela crée un effet seuil permettant d'inhiber l'action du FGF, si l'intensité du signal FGF est inférieure au seuil. La création d'un seuil est un mécanisme permettant aux cellules de générer une réponse de type « tout ou rien », qui est particulièrement adaptée aux processus d'induction et de spécification. Les cellules disposent de plusieurs outils moléculaires permettant de créer un seuil tels que, les boucles de rétrocontrôles (Ferrell, 2002), les réactions enzymatiques non-processives (cf : Annexe 2 - exemple 1) (Ferrell and Bhatt, 1997) et les cycles de modifications covalentes (cf : ci-dessous et Annexe 2- exemple 2) (Goldbeter and Koshland, 1981). Dans la section suivante, je développe une discussion sur le thème du rôle de l'utrasensibilité lors de l'induction neurale chez l'ascidie.

1) L'INDUCTION NEURALE CHEZ *CIONA INTESTINALIS* EST-ELLE UNE REPONSE ULTRASENSIBLE ?

Nos résultats montrent que la signalisation éphrine est impliquée dans le contrôle de l'activation d'ERK1/2 lors du choix binaire neural/épiderme chez *C. intestinalis*. Ce contrôle se fait plus probablement au niveau de Ras, car RasGAP agit comme médiateur cytoplasmique de la signalisation éphrine lors de l'induction neurale. Je propose que la régulation de l'activité de Ras par deux signaux antagonistes (éphrine et FGF) augmenterait la sensibilité de la réponse produite par l'utrasensibilité intrinsèque de la cascade MEK/ERK, ce qui générerait la réponse binaire robuste, observée lors de l'induction neurale chez l'ascidie. Dans cette section, je présente pourquoi cette hypothèse me semble envisageable, ainsi qu'une approche simple permettant de la tester.

L'activité des petites protéines G comme Ras dépend des GEFs (Guanine nucléotide Exchange Factor) qui activent les petites protéines G par fixation du GTP, et des GAPs (GTPase Activating Protein) qui se lient aux petites protéines G et accélèrent l'hydrolyse de l'ATP en ADP, en stimulant l'activité GTPase des petites protéines G. Cela forme un cycle de régulation de Ras, contrôlé par deux enzymes antagonistes GEF et GAP (Fig. II.6 A) (revue par Kholodenko, 2006). Ce cycle de modifications covalentes correspond au modèle enzymatique établi par Goldbeter et Koshland (Fig. II.6 B) (Goldbeter and Koshland, 1981). Ce modèle prédit que l'état de transformation du substrat (ici Ras sous forme GDP ou GTP)

est directement contrôlé par le ratio des vitesses cinétiques GEF/GAP, si les enzymes sont saturées en substrat (réaction d'ordre 0). Dans ces conditions, tant que la GEF possède une vitesse inférieure à la GAP, alors les protéines Ras restent inactives. A l'inverse, quand la GEF possède une vitesse supérieure à celle de la GAP, l'ensemble des protéines Ras disponibles sont alors converties sous forme active. Proche de l'équilibre, une faible variation des signaux entrants peut générer une large réponse enzymatique (Fig. II.6 C). Le modèle de Goldbeter et Koshland, appelé en anglais « zero-order ultrasensitivity », correspond bien à l'induction neurale chez l'ascidie. Le signal inducteur neural, FGF, induit la formation de Ras-GTP par l'activité de la GEF Sos (son of sevenless), alors que la signalisation éphrine induit la formation de Ras-GDP par l'activité de RasGAP. L'antagonisme des voies FGF et éphrine pourrait donc générer une cinétique d'activation ultrasensible de Ras, si Ras est saturant. Néanmoins, le signal immunofluorescent anti-dpERK1/2 dans la cellule a6.5 d'un clone d'injection Eph3ΔC est supérieur à celui observé dans la cellule a6.5 sauvage du même embryon (Fig II.3 A). Le modèle de Goldbeter et Koshland prévoit que si le seuil d'activation est dépassé, alors l'ensemble du pool de substrat est converti sous forme active. Notre observation suggère que l'ensemble des protéines Ras de la cellule a6.5 ne sont pas activées lors de l'induction neurale, ce qui ne correspond pas au modèle de Goldbeter et Koshland. Cependant, une cellule n'est pas un tube à essai dans lequel tous les composants d'une réaction chimique sont parfaitement homogénéisés. Ici, les voies de signalisation FGF et éphrine sont séparées dans l'espace puisqu'elles sont activées par des ligands exprimés sur différents domaines membranaires : basal pour FGF et latéral pour éphrine (j'aborde ce sujet en détail dans la section suivante). Un tel système possède des caractéristiques qui n'ont pas été prises en compte dans le modèle établi par Goldbeter et Koshland. Dans un système non homogène, l'effet maximum qu'il est possible d'obtenir est inférieur à celui d'un système homogène (van Albada and ten Wolde, 2007). Ceci pourrait expliquer que toutes les protéines Ras ne peuvent être activées et ce, même si l'activité de la GEF est très supérieure à celle de RasGAP.

Le modèle que je propose présente deux systèmes enzymatiques possédant la capacité à générer une réponse ultrasensible en tandem : 1) le cycle de régulation de Ras par les voies de signalisation FGF et éphrine et 2) la cascade MEK/ERK qui, comme détaillée dans l'Annexe 2, transmet de manière ultrasensible le signal par son mode d'activation, impliquant des réactions enzymatiques « non-processives ». Lors de cette étude, les différentes conditions expérimentales entraînent des modifications d'activation d'ERK1/2, qui sont compatibles avec ce modèle. Dans les trois paragraphes suivants, le niveau d'activation de Ras est hypothétique car je ne possède pas les outils moléculaires permettant de le quantifier.

- Dans les précurseurs épidermiques, la séparation physique des voies de signalisation FGF et éphrine suggère une activation basale de Ras au niveau des membranes

recevant le signal FGF. Dans ces cellules, le tandem cycle de régulation de Ras-cascade MEK/ERK permet la filtration de l'activation basale de Ras par l'ultrasensibilité intrinsèque de la cascade MEK/ERK.

- Dans les précurseurs neuraux, l'augmentation du ratio des surfaces de contact FGF/éphrine se traduit par une activation plus forte de Ras, liée à une augmentation du signal activateur (FGF) et, une diminution du signal inhibiteur (éphrine). Le signal transmis par l'activation ultrasensible de Ras est transmis par la cascade MEK/ERK car le signal [Ras-GTP] est suffisamment élevé (au-dessus du seuil).

- Enfin, l'injection d'un dominant négatif du récepteur Eph3 sans domaine cytoplasmique (Eph3ΔC) induit plusieurs variations de l'activation d'ERK1/2. Certains précurseurs ectodermiques présentent une activation d'ERK1/2 équivalente à celle observée dans les précurseurs neuraux (ex : cellule a6.7). L'inhibition de la signalisation éphrine modifie uniquement le cycle de régulation de Ras, sans modifier les paramètres cinétiques influençant la réponse ultrasensible de la cascade MEK/ERK. Cette modification de l'activation d'ERK1/2 ne démontre pas, d'un point de vue enzymologique, que le cycle de régulation de Ras est ultrasensible. Cependant, il démontre que le cycle de régulation de Ras est impliqué dans le mécanisme de choix des cellules, et que la perte de l'organisation enzymatique nécessaire à l'ultrasensibilité de ce cycle implique une modification du choix binaire des cellules. L'injection d'Eph3ΔC induit également dans certains précurseurs épidermiques une faible augmentation d'ERK1/2. Si l'on considère la cellule a6.6, on constate que cette augmentation est parfois importante, car un faible pourcentage des embryons injectés avec Eph3ΔC présente une conversion de la cellule a6.6 vers le destin neural. Cette variation de la réponse s'explique par le fait que l'inhibition de la signalisation éphrine induit une augmentation de l'activation de Ras. Or, cette augmentation de l'activation de Ras présente une légère variabilité d'un embryon à l'autre, car les surfaces de contact peuvent varier d'un embryon à l'autre. Ces variations sont amplifiées par la cascade MEK/ERK qui, malgré son ultrasensibilité, peut répondre de manière graduée si le signal Ras se trouve proche du seuil (cf. Annexe 2 –exemple 1).

L'inhibition de la signalisation éphrine/RasGAP démontre que le contrôle de l'activité de Ras est suffisant pour modifier la réponse binaire de certaines cellules proches du seuil (ex : a6.7). La question actuelle consiste à déterminer si l'ultrasensibilité générée au niveau de Ras est suffisamment forte pour induire, en association avec la cascade MEK/ERK, la réponse binaire observée. Afin de tester cette hypothèse, nous avons besoin de comparer les cinétiques d'activation de Ras et d'ERK1/2, dans des embryons sauvages et dans des embryons où la voie éphrine/RasGAP est inhibée. Pour cela, il est souhaitable d'établir des méthodes pour quantifier l'activité de Ras et d'ERK1/2 *in vivo* par imagerie. Cela permettrait, à l'inverse d'un western blot, d'analyser leurs activations dans chaque blastomère.

La réponse binaire des cellules peut également faire intervenir d'autres processus biologiques. Par exemple, un rétrocontrôle positif ou un double rétrocontrôle négatif peuvent également générer une réponse ultrasensible (cf : Annexe 2 - exemple 1) (Ferrell et al., 2009). Chez *C. intestinalis*, le facteur de transcription ETS1/2, qui est activé par la cascade MEK/ERK, active dans les précurseurs cardiaques (TVC primaire), un rétrocontrôle positif sur lui-même et l'expression de gènes impliqués dans des rétrocontrôles des RTK (par exemple : *Sprouty* (Reich et al., 1999), *Dusp6* (Li et al., 2007) ou *Odin* (Tong et al., 2013)) (Woznica et al., 2012). Récemment, une étude a démontré que l'expression du marqueur neural *Otx* est négativement régulé par deux voies de signalisation impliquant des ligands de type TGF- β (*Admp* et *Gdf1/3_like*), exprimés dans l'hémisphère animal. Ils agissent par les facteurs de transcription de la famille SMAD2/3b et SMAD1/5 (Ohta and Satou, 2013). Ces signalisations inhibent l'expression d'*Otx* par la liaison des SMAD sur des éléments de réponses présents sur la séquence promotrice d'*Otx*. Ce mécanisme permet d'inhiber l'activation *Otx* induite par une faible activation d'ERK1/2.

2) ROLE DE L'ENDOCYTOSE DANS LA REGULATION ANTAGONISTE DE RAS PAR LES VOIES DE SIGNALISATIONS FGF ET EPHRINE

Les ligands *FGF9/16/20* et *éphrine-Ad* sont exprimés dans des territoires distincts : *FGF9/16/20* se situe dans les cellules végétatives alors qu'*éphrine-Ad* est exprimé dans les cellules de l'ectoderme. Une cellule ectodermique recevant les signaux de ces deux ligands les reçoit donc forcément sur différents domaines membranaires. La voie de signalisation FGF est présente au niveau de la membrane basale, alors que celle de l'éphrine se situe au niveau de la membrane latérale (Fig. II.7). Cette observation soulève une question fondamentale : comment ces deux voies de signalisation convergent pour réguler Ras ? Je propose un rôle potentiel de l'endocytose pour faire converger ces deux voies de signalisation au niveau Ras. En effet, Ras-GTP se retrouve dans différents compartiments cellulaires (membrane plasmique, endosomes, réticulum endoplasmique et appareil de Golgi) (revue par Omerovic and Prior, 2009). La localisation de Ras est observée par l'expression de Ras fusionnée avec des protéines fluorescentes (Laude and Prior, 2008; Peyker et al., 2005).

Le rôle de l'endocytose est un paramètre important dans la régulation des voies de signalisation. Une étude récente, utilisant un biosenseur conformationnel (nanoanticorps couplé avec la GFP) démontre qu'un récepteur, le β 2-adrénorécepteur (GPCR) dans cette étude, se présentait sous forme active dans les endosomes précoces après son endocytose. (Irannejad et al., 2013). De plus, les auteurs démontrent que l'endocytose est nécessaire à l'activation maximale de la voie de signalisation, car l'inhibition de l'endocytose réduit le signal transmis. Chez le xénope, l'inhibition de l'endocytose par les clathrines inhibe l'activation d'ERK par le FGF lors de l'embryogénèse et, empêche l'induction du mésoderme

et l'expression de Xbra (Jean et al., 2010). Une autre étude montre que la séquestration du récepteur à l'EGF dans les endosomes induit une augmentation de l'activation d'ERK (Taub et al., 2007). Enfin, le signal transmis à partir des membranes peut être différent de celui transmis à partir des endosomes. L'inhibition de l'endocytose du récepteur de l'EGF dans des cellules de mammifères induit une augmentation de la phosphorylation de PLC- γ et de SHC (SRC homology 2 domain containing) ainsi qu'une diminution de la phosphorylation d'ERK et de PI3K (Vieira et al., 2010). Ces différentes études montrent que l'endocytose n'est pas uniquement destinée à éteindre la transmission du signal. Les récepteurs peuvent rester dans une conformation active après leur endocytose et activer des voies de signalisation différentes de celles activées à la membrane.

Les endosomes sont actuellement considérés comme un lieu d'interactions entre différentes voies de signalisation (Pálffy et al., 2012). Les vésicules d'endocytose sont régulièrement citées comme moyen de transport du signal jusqu'au noyau, afin de faciliter sa transmission (Casaletto and McClatchey, 2012). Dans notre cas, le signal reçu au noyau pourrait être transmis depuis la membrane plasmique et depuis les vésicules d'endocytose, où Ras pourrait être soumis à une régulation par la rencontre de deux voies de signalisation antagonistes, telles que les voies FGF et éphrine. Des expériences complémentaires sont nécessaires et permettraient de clarifier l'implication des endosomes dans l'intégration des signaux FGF et éphrine. Une possibilité intéressante serait d'inhiber l'endocytose d'une des deux voies, sans perturber l'endocytose de la deuxième voie. Cependant, les récepteurs Eph et les FGFR peuvent être internalisés à la fois de manière dépendante et indépendante des clathrines (Belleudi et al., 2007; Pitulescu and Adams, 2010). Il est donc nécessaire de déterminer les voies d'endocytose empruntées par le FGFR et le récepteur Eph3 lors de l'induction neurale animale chez *C. intestinalis*, afin de déterminer si cette approche est réalisable. L'inhibition de la métalloprotéase ADAM10, qui clive spécifiquement les complexes éphrine/Eph activés avant d'induire leur endocytose, est également un candidat intéressant pour inhiber spécifiquement l'endocytose de la signalisation éphrine.

3) LA GEOMETRIE CELLULAIRE MODIFIE-T-ELLE LA CAPACITE A TRANSMETTRE UN SIGNAL ?

L'analyse du ratio des surfaces de contact FGF/éphrine des cellules a6.6 et a6.7 montre que ces cellules possèdent un ratio relativement similaire (Fig. II.4 C). Or, lors de l'inhibition de la voie éphrine, la cellule a6.7 montre une activation d'ERK1/2 et exprime *Otx*, alors que la cellule a6.6 ne répond que rarement au signal inducteur neural. Cette différence est difficile à expliquer si l'on considère les surfaces de contact, comme paramètre déterminant dans la réponse binaire observée lors de l'induction neurale. Bien qu'ayant un ratio de surfaces de contact FGF/éphrine similaire, ces deux cellules possèdent une position très différente dans l'embryon. L'analyse de la forme cellulaire de ces deux cellules, en utilisant le logiciel « 3D

Virtual Embryo » (Tassy et al., 2006), montre que leurs surfaces de contact avec les cellules végétatives diffèrent par leurs localisations (Fig. II.8 A-B) Les cellules a6.6 possèdent au niveau de leur membrane basale des contacts avec les cellules qui expriment le FGF. A l'inverse, les cellules a6.7 possèdent des contacts avec les cellules qui expriment le FGF au niveau des membranes latérales. Des approches mathématiques suggèrent que la forme des cellules constitue un élément capital lors de la transmission du signal (Meyers et al., 2006). Dans un système non homogène, où le signal est activé aux membranes et désactivé dans le cytoplasme, la concentration de la forme active du second messager diminue exponentiellement en s'éloignant des membranes (Fig. II.8 C) (Kholodenko and Birtwistle, 2009). La distance entre la membrane, où la cellule reçoit la signalisation de FGF, et le noyau, est bien plus importante pour la cellule a6.6 que pour la cellule a6.7. Cette différence expliquerait pourquoi la cellule a6.7 est plus facilement convertible vers le destin neural.

MATERIELS ET METHODES

1) IMMUNOMARQUAGE dpERK COUPLE A UN MARQUAGE PHALLOÏDINE :

Le protocole d'immunomarquage dpERK1/2 a été adapté par Cathy Sirour, (assistant ingénieur dans l'équipe du Dr Yasuo) à partir de (Stolfi et al., 2011). Les embryons sont fixés dans une solution PIPES-Sucrose-Formaldéhyde (0.1M PIPES pH=6.9, 0.4M sucrose, 50mM EGTA et 4% formaldéhyde) pendant 45 min à température ambiante (TA), puis lavés 2 fois 5 minutes (min) en tampon PBSTr (buffer Phosphate-Buffered Saline avec 0.1% de triton X-100). Les embryons sont traités en tampon PBS/H2O2 (PBSTr, 3% H2O2) pendant 10 min à TA, puis lavés 3 fois 10 min en tampon PBSTr. La saturation est réalisée en incubant les embryons 1 heure (H) en PBSTr/BR (PBSTr, 0.5% Blocking Reagent (Roche)) puis sur la nuit avec l'anticorps anti-dpERK (souris – Sigma #M9692) au 1/500 dans la solution de saturation. Les embryons sont lavés en tampon PBST (PBS, 0.1% Tween-20) 3 fois 20 min, puis 2 fois 5 min en tampon TNT (0.1M Tris pH=7.5, 0.15M NaCl, 0.1% Tween 20). Les embryons sont incubés 1H dans une solution de saturation TNT/BR (TNT, 0.5% BR), puis incubés 1H30 avec un anticorps secondaire au 1/20 en solution de saturation (Histofine® Multistain MAXPO (Nichirei Biosciences Inc.)). Les embryons sont lavés 3 fois 20 min en buffer TNT, puis le signal est amplifié par l'utilisation du kit TSA (Perkin Elmer) (TSA-Cy3 au 1/200 dans le buffer d'amplification pendant 10 min à l'obscurité).

La modification du protocole permettant le couplage phalloïdine commence à cette étape. Les embryons sont lavés 3 fois 5 min en tampon PBSTr, puis incubés 2H à l'obscurité sous agitation avec de la phalloïdine couplée au fluorochrome Alexa 488. Les embryons sont ensuite lavés 3 fois 5 min en tampon PBSTr. Les embryons sont déposés individuellement sur des lamelles coatées avec la poly-L-lysine. La lamelle est plongée dans des bains croissant d'isopropanol (25% 5min – 50% 5min – 75% 5min – 3x100% 2min) afin de déshydrater les embryons. La lamelle est ensuite plongée dans un bain BA:BB pour rendre les embryons

transparents (benzyl alcohol (sigma) : benzyl benzoate (sigma) avec un ratio de 1 : 2) pendant quelques secondes. Le montage est réalisé avec une lame et une petite goutte de BA:BB entre la lame et la lamelle. Les images sont acquises par microscopie confocale sur un microscope Leica SP5 inversé équipé d'un laser Argon, HeNe, GreenNe et d'une diode laser UV. L'acquisition est réalisée avec un objectif HCX PL APO 40X/1.25-0.75 à huile.

2) RECONSTRUCTION 3D ET MESURE DES SURFACES DE CONTACT :

La virtualisation des embryons est réalisée à l'aide du logiciel Avizo®6, édité par la société Visualization Science Group (VSG), en suivant le protocole original de Robin et al. (Robin et al., 2011). A l'aide d'une tablette graphique (Wacom intuos®), les contours de chaque cellule marquée avec la phalloïdine sont dessinés à la manière d'un papier calque pour chaque plan d'acquisition. Par ce processus, le logiciel est capable d'établir la géométrie 3D de chaque cellule. La géométrie des objets 3D obtenus est améliorée par l'utilisation des fonctions « remove islands » et « smooth labels ». Les cellules virtualisées sont générées par les fonctions « interpolate labels » et « surfaceGen ». L'objet 3D obtenu est exporté au format VRML (Virtual Reality Markup Language) pour être importé dans le logiciel 3D studio MAX® qui est édité par la société Autodesk. Dans ce logiciel des corrections supplémentaires sont apportées aux formes 3D par des options de simplification du maillage de polygone (fonction lissage et relâcher), et par la correction de l'orientation des normales (fonction unifier les normales). L'embryon 3D est exporté au format .obj puis analysé dans le logiciel 3D virtual Embryo (3DVE) disponible sur le site ANISEED (Tassy et al., 2006). Ce logiciel permet de mesurer de manière quantitative les surfaces de contact entre les cellules.

3) TEST STATISTIQUE :

La comparaison des surfaces de contact entre le clone d'injection Eph3ΔC et les cellules sauvages (fig. II.3) a été testée statistiquement avec la fonction « wilcox.test() » du logiciel R, qui permet d'effectuer une comparaison des moyennes par un test des signes de Wilcoxon.

ANNEXE 2 REPONSES BINAIRES : UNE ANALYSE LITTERAIRE

La conversion d'un signal analogique (ex : un ligand sécrété formant un gradient) en une décision binaire (choix entre deux destins) nécessite que les cellules mettent en place un processus permettant :

- (1) d'intégrer les différents signaux reçus
- (2) de répondre de manière à s'adapter aux signaux reçus.

La cascade MEK/ERK réunit ces deux caractéristiques. De nombreuses voies de signalisation utilisent les kinases MEK/ERK. Cela place la cascade MEK/ERK dans une position idéale pour transmettre les signaux reçus par plusieurs voies de signalisation. Dans cette section, je

présente les mécanismes enzymologiques employés par la cascade MEK/ERK permettant d'induire une réponse binaire.

1) EXEMPLE 1 : LA MATURATION DE L'OVOCYTE DE XENOPE

Les ovocytes immatures de xénope restent en phase G₂ du cycle cellulaire. L'exposition à une hormone, la progestérone, induit les ovocytes à reprendre le cycle cellulaire et à terminer le premier cycle de la méiose, avant de s'arrêter de nouveau en métaphase du second cycle de la méiose. Ce processus est irréversible et peut être considéré comme un choix de destin binaire (immature ou mature) (Fig. II.9 A). L'exposition à la progestérone stimule la phosphorylation de la MAPKKK Mos et l'activation de la cascade MEK/ERK. L'activation de p42-MAPK (ERK) induit l'activation de la cycline B-CDK1, qui permet la progression du cycle cellulaire et la maturation de l'ovocyte (Fig. II.9 B) (Ferrell et al., 2009).

L'analyse de l'activation d'ERK par la progestérone révèle que les ovocytes répondent par un phénomène de « tout ou rien », puisque les ovocytes traités avec des doses intermédiaires de progestérone et analysés individuellement, montrent soit une activation complète d'ERK, soit une absence d'activation (Fig. II.10 D). La conclusion qui s'impose est qu'entre le récepteur à la progestérone et ERK, il existe un processus qui convertit l'augmentation graduée du stimulus (progestérone) en un signal digital.

Les auteurs ont étudié le rôle de la cascade MEK/ERK dans la conversion du signal en une décision binaire puisque la position de la cascade se trouve entre le récepteur et ERK. L'activité des kinases dépend de leur état de phosphorylation qui est contrôlé par l'activité de la kinase du niveau précédant (Fig. II.11 B). La MAPKKK Mos est activée par phosphorylation sur ces résidus sérines. Une fois activée, elle phosphoryle la MAPKK MEK sur deux résidus sérine. A son tour, la MAPKK activée phosphoryle ERK sur une thréonine et une sérine (Huang and Ferrell, 1996). L'inactivation est induite par les phosphatases, qui peuvent agir à chaque niveau de la cascade. Cette organisation en cascade confère plusieurs propriétés que je vais présenter ci-dessous (Fig. II.11 B).

Premièrement, l'organisation en cascade est régulièrement associée à l'amplification du signal. Dans des cellules de mammifères (CHO, NIH 3T3, PC12), il est estimé qu'il y a, dans une cellule, 20,000 protéines Ras pour 1,000,000 de protéines ERK. Une activation de 10,000 protéines Ras conduit à l'activation du million de protéines ERK. Cela génère un signal sortant de 100 à 500 fois plus important que le signal entrant (Ferrell Jr, 1996). Deuxièmement, la cinétique d'activation de la cascade MEK/ERK révèle une courbe sigmoïdale en réponse à l'augmentation de la concentration du stimulus dans des extraits cytoplasmiques d'œufs de xénope (Fig. II.11 A). Cette cinétique d'activation est caractéristique des enzymes ultrasensibles. Une enzyme présentant une cinétique Michaelienne (cinétique d'activation hyperbolique) nécessite une augmentation du signal

inducteur de 81 fois pour augmenter sa réponse de 10 à 90 % de la réponse maximale. Une enzyme ultrasensible nécessite une augmentation du signal inducteur inférieur à 81 fois pour effectuer la même modification de sa réponse (Fig. II.11 A) (Huang and Ferrell, 1996). La sensibilité d'une enzyme peut être estimée par le nombre de Hill (n_H). Si ce nombre est supérieur à 1, alors l'enzyme est considéré comme ultrasensible. Dans la cascade MEK/ERK, l'origine de l'ultrasensibilité provient des réactions enzymatiques qui activent MEK et ERK. Ces deux kinases sont activées par une double phosphorylation « non processive ». Par exemple dans le cas de MEK, cela signifie que Mos activé lie MEK, puis la phosphoryle et libère la forme monophosphorylée p-MEK. Dans un second temps, p-Mos lie p-MEK pour phosphoryler le deuxième résidu sérine (Fig. II.11 B). La compétition entre MEK et p-MEK pour lier Mos activé fait que la deuxième phosphorylation n'apparaît qu'après que la concentration de p-MEK soit suffisante. Cela génère une période de latence expliquant la première partie de la courbe d'activation sigmoïdale (Fig. II.11 A). L'apparition de dp-MEK suit une cinétique égale au carré de l'augmentation du signal activateur (Huang and Ferrell, 1996). Cela explique l'augmentation rapide de la fraction activée après le passage de la période de latence (Fig. II.11 A). La même régulation se passe au niveau d'ERK. Il faut noter que ces conversions de la forme inactive vers la forme active se font avec une faible variation de la concentration du signal activateur. L'ultrasensibilité de la cascade MEK/ERK est augmentée par la mise en tandem de l'activation de MEK et d'ERK par double phosphorylation non processive. Cela génère une ultrasensibilité supérieure à celle générée par une simple réaction non processive. A titre de comparaison, l'ultrasensibilité de la cascade MEK/ERK dans les extraits d'ovocytes de xénope ($n_H=4.9$) est supérieure à la coopérativité de l'hémoglobine pour la fixation de l'oxygène ($n_H=2.9$) (Huang and Ferrell, 1996).

L'analyse de l'ultrasensibilité de la cascade MEK/ERK a été réalisée *in vitro* à partir d'extraits d'ovocytes de xénope. Or, l'analyse de la cinétique d'activation de la cascade MEK/ERK dans des ovocytes de xénope intacts montre une ultrasensibilité supérieure à la même mesure réalisée dans les extraits d'ovocytes (Ferrell and Machleder, 1998). Cela suggère que l'activation de la cascade MEK/ERK dans les ovocytes intacts induit un mécanisme permettant d'augmenter la sensibilité du système. Afin d'évaluer si ce mécanisme implique une boucle de rétrocontrôle, les ovocytes ont été traités avec un inhibiteur de la traduction (cycloheximide). Le traitement induit une diminution de l'ultrasensibilité de plus de 50% (Fig. II.10 E). La diminution de l'ultrasensibilité induit la perte de la réponse binaire des ovocytes suite à l'injection de concentration intermédiaire de Mos (proche du seuil). La réponse binaire est conservée lorsque Mos est injecté à faible ou forte concentration (Fig. II.10 F). Ainsi, l'ultrasensibilité intrinsèque de la cascade MEK/ERK est suffisante pour générer un effet seuil qui génère une réponse de type « tout ou rien ». Cependant, quand le stimulus est proche du seuil, la réponse binaire ne peut être induite uniquement par la cascade

MEK/ERK, car l'ultrasensibilité qu'elle génère ($nH=2.3$) n'est pas suffisante (Fig. II.10 F – rectangle rouge). La boucle de rétrocontrôle positif permet d'augmenter l'ultrasensibilité du système ($nH=5.1$) et d'induire un effet seuil, même à des concentrations intermédiaires de Mos. La résolution mathématique des différents modèles enzymatiques confirme que la boucle de rétrocontrôle positif permet d'empêcher que des ovocytes exhibent une activation graduée d'ERK avec un signal situé proche du seuil (Fig. II.10G).

2) EXEMPLE 2 : L'INDUCTION DE L'ECTODERME VENTRAL CHEZ *DROSOPHILA*

MELANOGASTER.

Chez la drosophile, la spécification de l'ectoderme ventral est induite par l'activation graduée du récepteur EGF (Epidermal Growth Factor) (EGFR) (Gabay et al., 1996). A partir du stade 10, la rangée de cellules la plus ventrale exprime *spitz*, qui code pour un homologue au TGF- α . Ce ligand se fixe à l'EGFR et induit l'activation d'ERK. L'activation d'ERK s'étend jusqu'à trois rangées, de part et d'autre de la rangée qui exprime *spitz*, avec une diminution progressive du signal ((Fig. II.12) (Melen et al., 2005). Les auteurs soulignent que l'activité graduée d'ERK qu'ils observent révèle un mode d'activation d'ERK différent de l'ultrasensibilité, généralement attribué au MAPK. Cependant, dans l'exemple précédant, l'absence de rétrocontrôle permet à la cascade MEK/ERK d'exhiber une réponse graduée si la quantité de signal activateur est proche du seuil d'activation (Ferrell and Machleder, 1998). L'activation d'ERK observée par Melen et al. n'est donc pas incompatible avec l'ultrasensibilité de la cascade MEK/ERK, puisqu'une l'absence d'une réponse binaire ne signifie pas qu'il n'y a pas d'ultrasensibilité.

La phosphorylation de Yan sur son résidu sérine S127 par ERK induit la dégradation de Yan. Yan est un facteur de transcription à domaine ETS de type répresseur (O'Neill et al., 1994). Il se forme deux domaines distincts dans l'ectoderme ventral et sont caractérisés par l'expression ou non de Yan (proche du site d'expression de Spitz). La frontière des deux domaines Yan-positif et Yan-négatif est localisée dans le domaine ERK activé. Cela suggère qu'il existe un mécanisme permettant de convertir l'activation graduée d'ERK en une décision binaire. Melen et al. (2005) ont abordé le mécanisme de cette réponse binaire de l'état de Yan (Yan-positif et Yan-négatif), en fonction du niveau d'activité d'ERK. Les auteurs démontrent que l'état de phosphorylation de Yan est régulé, de manière similaire à Ras, par un cycle de modification covalente qui correspond au modèle proposé par Goldbeter et Koshland. Les auteurs assument l'hypothèse que la phosphorylation de Yan est réversible par des phosphatases et que la déphosphorylation a lieu à vitesse constante. Le cycle de régulation de Yan par deux enzymes antagonistes (ERK/phosphatases) permet la création d'une frontière nette entre les territoires Yan-positif et Yan-négatif. La réaction la plus rapide domine et permet de maintenir l'ensemble des protéines Yan dans l'état de phosphorylation qu'elle contrôle.

Ainsi, le cycle de régulation ultrasensible de Yan permet de convertir le signal ERK gradué en une réponse binaire. Cependant, les auteurs n'ont pas pris en compte l'ultrasensibilité intrinsèque des MAPK, comme un élément permettant d'établir la frontière entre les territoires Yan-positif et Yan-négatif. Or, dans cet exemple, le seul paramètre qui varie est l'activité d'ERK, qui décroît en s'éloignant du site d'expression de Spitz. La différence entre une activation d'ERK linéaire ou ultrasensible peut se traduire par une modification de la position de la frontière entre les territoires Yan-positif et Yan-négatif. Je pose l'hypothèse que la combinaison de l'ultrasensibilité de la cascade MEK/ERK agit en synergie avec le cycle de régulation de Yan pour générer la frontière entre les territoires Yan-positif et Yan-négatif. Tout d'abord, la transmission ultrasensible d'ERK induirait une diminution de la réponse d'ERK loin du ligand Spitz, et une augmentation plus rapide du signal ERK quand le signal Spitz augmente. Cela permet de générer une zone action du signal ERK, plus mince qu'avec une activation linéaire d'ERK. Cependant, la cascade MEK/ERK ne présente pas de réponse binaire en réponse à Spitz et ne permet donc pas la création d'une frontière nette Yan-positif et Yan-négatif. Le cycle de régulation de Yan permet cela, en éteignant l'action du signal ERK sur Yan (phosphorylation) dans les cellules présentant une activation d'ERK trop faible.

3) FORMALISATION

L'ultrasensibilité de la cascade MEK/ERK est impliquée dans la génération d'une réponse biologique de type « tout ou rien ». Elle fonctionne comme un interrupteur biologique et participe activement aux mécanismes décisionnels employés par les cellules.

Initialement proposé par Tony Hunter, ce type de réponse est parfaitement transposable au système binaire utilisé dans les ordinateurs (Hunter, 1987) car dans les deux cas, la prise de décision repose sur un langage binaire. L'environnement de la cellule envoie des signaux qui sont d'abord reçus, puis intégrés pour fournir une réponse adaptée à l'environnement (Fig. II.13 A). En outre, les MAPK peuvent interagir avec différentes voies de transduction du signal et être activées par différentes voies de signalisation. Dans ces conditions, un circuit basé sur les MAPK peut intégrer une multitude de signaux entrant en une réponse biologique adaptée.

Dans les deux exemples précédents, le signal gradué est converti en une réponse binaire avec la participation des MAPK. A la différence du modèle théorique (Fig. II.13 A), ces exemples ne concernent pas l'intégration de plusieurs signaux entrants, mais la conversion d'un signal en une réponse binaire. Les deux exemples ont en commun que l'ultrasensibilité de la cascade MEK/ERK n'est pas suffisante pour induire une réponse biologique binaire. Un mécanisme complémentaire aux MAPK (phosphatases ou boucles de rétrocontrôle) permet d'augmenter l'ultrasensibilité afin d'obtenir une réponse binaire Fig. II.13 B/C).

**PROJET III : REGIONALISATION ANTERO-
POSTERIEURE DE LA PLAQUE NEURALE DANS LES
EMBRYONS D'ASCIDIE**

INTRODUCTION

La MAP kinase ERK1/2 présente un patron d'activation dynamique lors de la régionalisation antéro-postérieure de la plaque neurale, dans les embryons de cione. ERK1/2 est d'abord activé en gradient au stade plaque neurale 3R, puis forme deux bandes d'activation dans les R1 et R3, au stade plaque neurale 6R (Fig. 3.6B et 3.7A) (Hudson et al., 2007; Wagner and Levine, 2012). Cette dynamique a été démontrée comme étant un élément déterminant de la régionalisation antéro-postérieure du système nerveux.

Ce projet a commencé suite aux observations de Philip Albitua, durant sa thèse effectuée dans le laboratoire du Dr. Mike Levine, dans l'université de Californie à Berkeley. Phillip a utilisé le promoteur de *DMRT*, afin d'exprimer par électroporation, les formes dominantes-négatives d'*Eph3* (*Eph3ΔC*), d'*Eph1* (*Eph1ΔC*) et de *RasGAP* (*RGΔGAP*), dans les embryons de *C. intestinalis*. Le gène *DMRT* s'exprime à partir du stade 64-cellules dans le lignage neural « a ». La région promotrice de *DMRT* utilisée par Philip récapitule l'expression endogène de ce gène. Dans la vésicule sensorielle de la larve de cione, on retrouve deux cellules pigmentaires : l'otolith et l'ocellus (Fig 3.8 A). Lorsque les plasmides *DMRT>Eph3ΔC* ou *DMRT>RGΔGAP* ont été électroporés, une formation de cellules pigmentaires excédentaires a été observée. Par contre, il n'y avait pas de phénotype visible avec *DMRT>Eph1ΔC* (Fig. III.1 B-D). Le nombre maximum de cellules pigmentaires induites par *DMRT>Eph1ΔC* ou *DMRT>RGΔGAP* est impossible à compter avec précision, car ces cellules forment des agrégats. Cependant Philip a réussi à compter avec précision jusqu'à 4 cellules et a pu trouvé des cas où il y avait plus de 4 cellules pigmentaires (Fig. III.1 E). Les cellules pigmentaires proviennent de la R3, de la plaque neurale au stade 6R (Fig. III.3), dans laquelle on observe l'activation d'ERK1/2. Le lignage cellulaire montre que chacun des deux précurseurs de la R3, appelés a9.49, se divisent une fois le long de l'axe antéro-postérieur et les cellules qui se retrouvent côté postérieur adoptent le destin pigmentaire (Fig. III.3) (Nishida, 1987). Cependant, en utilisant des marqueurs fluorescents, exprimés spécifiquement dans les cellules de la plaque neurale, Philip a réussi à démontrer que les précurseurs pigmentaires a9.49 se divisent, non pas une fois mais deux fois, le long de l'axe antéro-postérieur, avant de s'intercaler en position dorsale du tube neural (Fig. III.2). Cette découverte montre que le lignage de référence contient une erreur (Fig. III.3), qu'il convient de prendre en compte afin de réinterpréter les résultats déjà publiés. Le résultat de Philip démontre pour la première fois l'implication de la signalisation éphrine lors de la spécification des cellules pigmentaire. Les études précédentes ont indiqué qu'un signal FGF, provenant du lignage neurale A (R1 et R2), induit la spécification du destin pigmentaires (Nishida, 1991; Squarzoni et al., 2011). Le signal FGF est relayé par la cascade MEK/ERK et le facteur de transcription ETS1/2 (Squarzoni et al., 2011). La suractivation de la cascade MEK/ERK induit la formation de cellules pigmentaires excédentaires (Squarzoni et al., 2011). L'ensemble de ces résultats indiquent

que le contrôle de l'activation de la cascade MEK/ERK est un élément essentiel du mécanisme de spécification des destins pigmentaires. Le but de ce projet est de démontrer le rôle potentiel de l'antagonisme entre les voies de signalisations FGF/ERK et éphrine/Eph/RasGAP, dans la spécification du lignage cellulaire pigmentaire, et plus globalement, dans la régionalisation le long de l'axe antéro-postérieur de la plaque neurale chez *C. intestinalis*.

RESULTATS

1) LA CASCADE MEK/ERK EST NECESSAIRE JUSQU'À LA DERNIERE DIVISION CELLULAIRE DES PRECURSEURS PIGMENTAIRES

En prenant en compte les derniers résultats sur le lignage des cellules pigmentaires, nous avons analysé la période pendant laquelle la cascade MEK/ERK est nécessaire pour la formation des cellules pigmentaires. Nous avons traité des embryons avec un inhibiteur pharmacologique de la MAPKK (MEK), UO126, toutes les 30 minutes à partir de 6h00 après la fécondation ; ce qui correspond au stade 110-cellules, au début de la gastrulation (Fig. 3.5). A chaque traitement avec l'inhibiteur UO126, nous avons prélevé une partie des embryons afin de vérifier leur stade embryonnaire, en marquant les noyaux avec du DAPI. Nous avons continué l'expérience jusqu'à 10h00 post-fécondation, et nous avons analysé la présence de cellules pigmentaires dans les larves (Fig. III.4). Dans cette expérience (n=2), la dernière division cellulaire du lignage pigmentaire a lieu environ 9h15 après la fécondation. Dans les embryons traités 9h00 après la fécondation avec UO126, aucune cellule pigmentaire ne se forme, alors que si le traitement est effectué 9h30 après la fécondation, il n'y a pas d'effet sur la formation des cellules pigmentaires. Cette expérience confirme donc que, la cascade MEK/ERK est nécessaire pour la formation des cellules pigmentaires jusqu'à la dernière division cellulaire, et démontre qu'elle n'est plus nécessaire pour leur différenciation finale (en otolith ou ocellus) après la dernière division.

2) PATRON SPATIAL DE L'ACTIVATION D'ERK1/2 DANS LA PLAQUE NEURALE

Comme le traitement UO126 est irréversible, le résultat décrit ci-dessus ne permet pas d'identifier précisément les différents stades du développement où l'activation de la cascade MEK/ERK est requise. Le patron d'activation d'ERK1/2 a été analysé pour les stades 3R et 6R, alors que ce dernier au stade 12R reste inconnu. L'activation d'ERK1/2 au stade 3R est observée de façon graduée, avec un fort signal dans la R1/2, un signal inférieur dans la R3/4 et un signal basal dans la R5/6 (fig. 3.6 B) (Wagner and Levine, 2012). Au stade 6R, ERK1/2 est activé dans les R1 et R3 (Fig. 3.7 A) (Hudson et al., 2007). J'ai analysé par immunomarquage le patron d'activation d'ERK1/2 dans les embryons au stade 12R, et j'ai trouvé qu'ERK1/2 est actif dans les R3p et R4p (Fig. III.5 F). Le lignage des cellules pigmentaires est originaire de la R3/4 au stade 3R, puis de la R3 au stade 6R, et enfin de la

R3p au stade 12R (Fig. III.2). Le patron d'activation d'ERK1/2 dans la plaque neurale indique donc que la cascade MEK/ERK reste active dans le lignage des cellules pigmentaires, au cours de ces trois cycles cellulaires.

3) CONTROLE DE LA REGIONALISATION A/P DE LA PLAQUE NEURALE PAR LA CASCADE MEK/ERK

Afin d'étudier l'effet du traitement UO126 à chaque stade du développement de la plaque neurale, j'ai analysé l'expression de gènes qui s'expriment de façon différentielle dans les rangées de la plaque neurale aux stades 3R, 6R et 12R. En parallèle, j'ai aussi analysé l'effet de l'inhibition de la voie éphrine sur l'expression du même ensemble de gènes, dans les embryons électroporés avec *DMRT>Eph3ΔC*.

Au stade 6R, les cellules des R5 et R6 expriment *FoxC*, alors que celles des R3 et R4 expriment *ZicL* (Fig. III.6 A-B). Le traitement UO126 juste avant le stade 3R induit l'expansion de *FoxC* dans les R3 et R4 (Fig. III.6 C). Cette expansion s'accompagne de la perte d'expression de *ZicL* (Fig. III.6 D). Si le traitement est effectué après la formation du stade 3R, alors le patron d'expression de ces gènes n'est pas affecté (Fig. III.6 E-F). Ces résultats suggèrent que l'expression spécifique de *FoxD* et *ZicL*, au stade 6-rangées, serait contrôlée par l'activation différentielle d'ERK1/2 entre les R3/4 et R5/6, au stade 3R. Dans les embryons électroporés avec *DMRT>Eph3ΔC*, l'expression de *FoxD* et *ZicL* reste inchangée (Fig. III.6 G-H). Cette observation suggère que la voie de signalisation éphrine n'est pas impliquée dans le contrôle de l'activation d'ERK1/2, au stade 3R.

Au stade 6R, les cellules de la R3 expriment *MITF*, qui code pour un facteur de transcription en hélice-boucle-hélice, alors que celles de la R4 expriment *Six3/6*, codant pour un facteur de transcription caractérisé par la présence d'un domaine Six et d'un homéodomaine (Fig. III.7 A-B). A ce stade, les précurseurs des cellules pigmentaires (a9.49) dans la R3 commencent à exprimer le gène *Trp* codant pour une « tyrosinase-related protein » (Fig. III.7 C). Le traitement UO126 avant le stade 3R induit la perte des marqueurs de la R3 (*MITF* et *Trp*). Cependant le marqueur spécifique de la R4 (*Six3/6*) n'est pas perdu (Fig. III.7 D-F). Lors de cette expérience, nous nous attendions à observer une perte complète des marqueurs des R3 et R4 car, lors d'un traitement UO126 avant le stade 3R, la R3/4 est convertie en R5/6 (Fig. III.6). La perte du marqueur *Six3/6*, après un traitement UO126, a déjà été rapportée, si le traitement commence au stade 76-cellules (Wagner and Levine, 2012). Nous avons répété cette expérience et nous avons également constaté la perte d'expression de *Six3/6*. L'expression de *Six3/6* semble être régulée par la voie de signalisation FGF, entre les stades 76-cellules et 3R. Le traitement UO126, juste avant le stade 6R, révèle une perte de l'expression de *MITF* et de *Trp* dans la R3, et une extension de *Six3/6* dans cette même rangée (Fig III.7 G-I). Cela signifie que la R3 est convertie en R4. La cascade MEK/ERK est spécifiquement activée dans la R3 à ce stade (Fig. 3.7 A). Il semble donc que la cascade

MEK/ERK contrôle le choix binaire entre les lignages R3 (*MITF*-positive) et R4 (*Six3/6*-positive), en induisant l'expression de *MITF* dans la R3, tout en y réprimant l'expression de *Six3/6*. J'ai analysé l'effet de l'inhibition de la voie éphrine sur l'expression de ces deux gènes et j'ai trouvé qu'ils sont exprimés normalement au stade 6R (Fig. III.7 J-K). Cela suggère que la voie de signalisation éphrine n'est pas impliquée dans le contrôle de l'activation d'ERK1/2 au stade 6R.

Afin d'analyser le rôle de la cascade MEK/ERK et de la voie de signalisation éphrine au stade 12R, j'ai utilisé le gène *Trp* comme marqueur du lignage des cellules pigmentaires. Au stade 12R, le gène *Trp* est exprimé plus fortement dans les précurseurs des cellules pigmentaires (a10.97) de la R3p et, plus faiblement dans leurs cellules sœurs de la R3a (Fig. III.8 A). Comme décrit ci-dessus, l'activation d'ERK1/2 est observée dans la R3p mais pas dans la R3a. J'ai traité des embryons avec UO126 juste avant le stade 12R et j'ai analysé l'expression de *Trp* au stade 12R. Les embryons traités n'expriment pas ce gène (Fig. III.8 D). Cette expérience démontre que la cascade MEK/ERK est nécessaire au maintien de l'expression de *Trp* au stade 12R dans la R3p. Ce résultat est en accord avec la perte de la formation des cellules pigmentaires par le même traitement (Fig. III.8 D). A l'inverse, l'inhibition de la voie éphrine par électroporation de *DMRT>Eph3ΔC*, induit l'expression ectopique de *Trp* dans les cellules sœurs (a10.98) des précurseurs des cellules pigmentaires dans la R3a, et l'apparition de cellules pigmentaires ectopiques (Fig. III.8 E). Cette expérience suggère que la signalisation éphrine est nécessaire pour réprimer l'expression de gènes spécifiques de la R3, dans la R3a. Finalement, j'ai analysé l'effet de l'inhibition de la voie éphrine sur l'expression de *Trp* après la dernière division du lignage pigmentaire, en utilisant les embryons de l'expérience précédente, fixés tardivement (Fig. III.8 F-H). Après la dernière division du lignage pigmentaire, les cellules pigmentaires (a11.193) s'intercalent en position dorsale du tube neural (Fig. III.2 F). A ce stade du développement, le gène *Trp* n'est exprimé que par les cellules pigmentaires a11.193, dans les embryons contrôle. (Squarzoni et al., 2011). L'inhibition de la voie éphrine par l'électroporation de *DMRT>Eph3ΔC* induit le maintien de l'expression de *Trp*, dans la cellule sœur des cellules pigmentaires (a11.194) (Fig III.8 H). Ce résultat suggère que la signalisation éphrine est nécessaire après la dernière division du lignage pigmentaire, afin d'éteindre l'expression de *Trp* dans les cellules a11.194. Il ne s'agit toutefois que de résultats préliminaires car je n'ai analysé que 9 embryons.

4) REGULATION DE L'ACTIVATION D'ERK1/2 DANS LA PLAQUE NEURALE PAR LA VOIE DE SIGNALISATION EPHRINE/RASGAP

Afin d'évaluer le rôle de la voie de signalisation éphrine dans le patron d'activation d'ERK1/2 au niveau de la plaque neurale, j'ai co-électroporé la construction *DMRT>Eph3ΔC* ou *DMRT>RGΔGAP*, pour inhiber la transmission du signal éphrine/RasGAP avec une construction rapportrice des lignages (*DMRT>GFP* ou *Msx>GFP*). Puis j'ai analysé les patrons

d'activation d'ERK1/2 aux stades 6R et 12R. Les deux constructions utilisées ne modifient pas le patron d'activation d'ERK1/2 au stade 6R (Fig. III.5 C et E). Ce résultat est concordant avec l'absence de modification de l'expression des gènes au stade 6R, dans les embryons électroporés avec *DMRT>Eph3ΔC* (Fig. III.7). Dans la plaque neurale au stade 12R, ERK1/2 est activé dans les rangées R3p et R4p (Fig. III.5 B). L'inhibition de la voie éphrine induit l'activation ectopique d'ERK1/2 dans les rangées R3a et R4a (Fig. III.5 D et F). Ce résultat montre que la signalisation éphrine est nécessaire pour l'atténuation d'ERK1/2, spécifiquement dans ces deux rangées de la plaque neurale au stade 12R.

L'ensemble de ces résultats suggère que, la voie de signalisation éphrine/Eph/RasGAP atténue l'activation d'ERK1/2, dans la plaque neurale dans les R3a et R4a, au stade 12R. L'inhibition de cette signalisation induit une transformation de la R3a en R3p et donc une duplication du nombre de précurseurs des cellules pigmentaires de deux à quatre. Ces quatre précurseurs se divisent encore une fois, ce qui potentiellement peut générer jusqu'à huit cellules pigmentaires. Cela pourrait expliquer le fait que l'inhibition de la voie éphrine induit dans environ 30 % des cas, une formation de plus de cinq cellules pigmentaires (Fig. III.1 E).

5) QUELLE EST L'EPHRINE RESPONSABLE DE L'ATTENUATION D'ERK1/2 DANS LA R3A AU STADE 12R ?

J'ai voulu identifier l'origine des signaux FGF et éphrine impliqués dans le patron d'activation d'ERK1/2 au stade 12R. A ce stade, j'ai analysé l'expression d'*éphrine-Ad*, *éphrine-Ac* et *éphrine-Ab*. Le patron d'expression d'*éphrine-Ad* indique qu'il n'est pas un bon candidat, car il est exprimé dans des territoires plus antérieurs à la R5p (Fig. III.9 A). *éphrine-Ac* est exprimée dans les R4a et R4p ainsi que dans la R3a, mais avec un signal généralement moins intense que dans les R4a et R4p (Fig III.9 B). Le ligand *éphrine-Ab* est exprimé dans les cellules centrales de la R3p (Fig. III.9 C). Le patron d'expression d'*éphrine-Ac* suggère qu'il pourrait être impliqué dans l'inhibition d'ERK1/2 dans les R3a et R4a. Le patron d'expression d'*éphrine-Ab* suggère qu'il pourrait agir en synergie avec l'éphrine-Ac pour inhiber ERK1/2 dans la R3a. *FGF8/17/18* possède un patron d'expression restreint aux précurseurs du ganglion viscéral (Fig. III.9 D). *FGF9/16/20* est exprimé dans les cellules centrales de la R4p et dans des cellules appartenant à la R2 (R2p et R2a) (Fig. III.9 E). Ces patrons d'expression indiquent que *FGF9/16/20* est probablement le signal inducteur à l'origine de l'activation d'ERK1/2 au stade 12R.

J'ai testé l'hypothèse que la modification du patron d'activation d'ERK par la signalisation éphrine serait, non pas due à un effet direct, mais à une modification du patron d'expression des gènes *FGF9/16/20* ou *FGF8/17/18*. J'ai donc analysé les patrons d'expressions de ces deux gènes dans les embryons électroporés avec *DMRT>Eph3ΔC*. J'ai trouvé que leur

expression était normale (Fig. III.9 F-G). Cela suggère que la voie de signalisation éphrine a un effet antagoniste direct sur la cascade MEK/ERK dans la plaque neurale au stade 12R.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons analysé le mécanisme de la régionalisation A/P de la plaque neurale des embryons de *C. intestinalis*, en se focalisant en particulier sur le lignage des cellules pigmentaires. Cette étude, ainsi que les précédentes, montrent que la régionalisation A/P de la plaque neurale est largement contrôlée par l'activation différentielle de la cascade MEK/ERK (Hudson et al., 2007; Wagner and Levine, 2012). Il semble que cette régionalisation est principalement contrôlée par un mode de « décisions binaires ». Ces décisions binaires se passent **1)** entre les R3/4 et R5/6 au stade 3R, **2)** entre les R3 et R4 au stade 6R et **3)** entre les R3a et R3p au stade 12R. Dans toutes ces étapes, la cascade MEK/ERK est activée, ou plus fortement activée (stade 3R) dans la rangée postérieure. Nous avons démontré que le patron d'activation d'ERK1/2, au stade 12R, dépend de la relation antagoniste entre les cascades MEK/ERK et Eph/RasGAP, alors que nous n'avons pas encore identifié les ligands (FGF et éphrine) impliqués dans l'activation de ces deux cascades. Cependant, le patron spécifique d'activation d'ERK1/2 au stade 6R ne dépend pas de cet antagonisme. Nous ne savons pas actuellement quel est le mécanisme qui le génère.

Le mécanisme de spécification des cellules pigmentaires apparaît comme étant un mécanisme séquentiel impliquant plusieurs phases. D'abord FGF active la cascade MEK/ERK et induit la compétence des cellules à adopter le destin pigmentaire. Puis, l'activation d'ERK1/2 est nécessaire pendant la gastrulation et la neurulation pour maintenir la capacité des précurseurs pigmentaires à se différencier en cellules pigmentaires. Parallèlement, la signalisation éphrine/Eph3/RasGAP commence à inhiber l'activation d'ERK1/2 au stade 12R et peut-être au-delà, afin d'inhiber le destin pigmentaire dans les cellules localisées plus antérieurement que les cellules pigmentaires. Il faut noter qu'au stade 12R, le précurseur pigmentaire a10.97 adopte une position beaucoup plus postérieure que les autres cellules issues de la R3 (Fig III.2 C-D). Cette position permettait d'augmenter l'exposition au signal FGF (exprimé postérieurement dans la R3p), tout en réduisant l'exposition au signal éphrine (exprimé antérieurement dans la R3a). Le maintien de l'activité d'ERK1/2, uniquement dans les précurseurs pigmentaires fait que seuls les précurseurs pigmentaires expriment *Tcf* et donc eux seuls peuvent répondre au signal Wnt/ β -caténine (Squarzoni et al., 2011). La différenciation finale des cellules pigmentaires, se fait lors de l'intercalation des cellules dans le tube neural. La cellule a11.193 la plus postérieure reçoit un signal Wnt provenant de la cellule adjacente postérieure (Fig. III.3). Cela induit sa différenciation en ocellus. L'autre précurseur pigmentaire, n'ayant pas reçu le signal Wnt, se différencie en otolith (Abitua et al., 2012). Le rôle du signal Wnt se limite uniquement à induire la différenciation terminale

des précurseurs pigmentaires, car l'expression du ligand Wnt7 dans le lignage pigmentaire par l'électroporation de *MITF>Wnt7* (expression dans la R3, cf. fig III.7 B) induit la formation de deux ocellus, mais pas de modification du nombre de cellules pigmentaires.

Le patron d'expression de *Trp*, avant et après la dernière division des précurseurs pigmentaires, qui génèrent une cellule a11.193 et une cellule a11.194, suggère qu'un mécanisme inhibe l'expression de *Trp* dans les cellules a11.194. L'étude portant sur la voie Wnt exclue que le signal Wnt soit à l'origine de ce mécanisme (Abitua et al., 2012). Certains résultats préliminaires indiquent que la signalisation éphrine/Eph pourrait être impliquée dans l'inhibition de l'expression de *Trp* dans les cellules a11.194. J'ai utilisé les reconstructions 3D d'embryons au stade bourgeon caudal (Nakamura et al., 2012), afin de visualiser la position des cellules A11.194 et A11.193 dans le tube neural par rapport aux autres lignages neuraux (Fig. III.10 A). Comme la dernière division intervient juste avant l'intercalation des précurseurs pigmentaires, j'ai supposé que l'agencement des différents lignages, au stade bourgeon caudal, sont représentatifs des contacts cellulaires ayant lieu après la dernière division des précurseurs pigmentaires. La mesure des surfaces de contact révèle que les cellules A11.194 possèdent de larges surfaces de contact avec les cellules qui expriment l'éphrine au stade 12R, contrairement aux cellules a11.193, situées à l'opposé, qui présentent des faibles contacts (Fig. III. 10 B). Je propose que ce contact avec les cellules qui expriment l'éphrine soit à l'origine de l'inhibition du destin pigmentaire dans les cellules a11.194.

MATERIELS ET METHODES

1) EMBRYONS

Les ascidies adultes (*C. intestinalis*) proviennent de la station biologique de Roscoff (France). Les embryons sont déchorionés par un traitement avec des protéases et du sodium thyoglycolate (0.5g sodium thyoglycolate, 0.025g protéases, 3µl NaOH 1M, dilué dans 50ml d'eau de mer artificielle (ASW)) pendant quelques minutes. Les embryons sont cultivés sur boîte pétri à 1% d'agarose/ASW. La fécondation se fait par ajout de 0.2µl de sperme activé pendant 10 minutes. L'électroporation des embryons est réalisée selon le protocole décrit par Corbo et al. (Corbo et al., 1997).

2) IMMUNOMARQUAGE DE DPERK

L'immunomarquage est réalisé de la même que celui décrit dans le matériels et méthodes du projet II mais n'est pas couplé à un marquage phalloïdine. Seules les étapes de montage et d'imagerie diffère de ce derniers. Après l'amplification, les embryons sont lavés 3 fois 5 min en tampon PBST, puis montés entre lame et lamelle avec du Vectashield®/Dapi. Les images sont réalisées sur un microscope Olympus BX51 équipé d'une lampe à mercure HBO 50W et d'une caméra Leica DFC310 Fx.

3) HYBRIDATION *IN SITU*

Les embryons sont fixés sur la nuit à 4°C en solution PFA/MOPS (4% paraformaldehyde, 0.5M NaCl, 0.1M MOPS pH=7.5). Ils sont ensuite déshydratés par lavages en solution d'éthanol en concentration croissante de 10 min chacun (2x25% éthanol, 2x50% éthanol, 2x75% éthanol, 2x100% éthanol), puis conservés à -20°C. Les embryons sont réhydratés par lavages en solution d'éthanol en concentration décroissante de 10 min chacun (1x75% éthanol, 1x50% éthanol, 1x25% éthanol), puis lavés 3 fois en tampon PBST. Les embryons sont traités à la protéinase K (PBST, 2µg/ml protéinase K) pendant 25 min à TA puis lavés 3 fois 10 min en PBST. Les embryons sont fixés en solution PBS/PFA (PBS, 4% paraformaldehyde) puis incubés 1H à 55°C dans le tampon HYB (50% formamide, 5x SSC, 5X solution Denhards, 1mg/ml ARNT de la levure *C. utilis* (Torula), 0.1% tween-20), puis incubés sur la nuit à 55°C avec les sondes (0.5µg/ml de sonde anti-sens marquée par la digoxygénin (DIG)) en tampon HYB. Les embryons sont lavés 2 fois 20 min à 55°C en solution de formamide-5X SSC (50% formamide, 5X SSC, 1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)) puis 2 fois 20 min à 55°C en solution formamide-2x SSC (50% formamide, 5X SSC, 1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)) puis 2 fois 20 min à 55°C en solution 2X SSC (2X SSC, 0.1% tween-20), puis 0.5X SSC (0.5X SSC, 0.1% tween-20). Les embryons sont ensuite incubés en tampon Tris/BR (0.1M tris pH=7.5, 0.15M NaCl, 0.5% BBR) pendant 1H à TA, puis incubés dans la même solution avec un anticorps anti DIG au 1/2000 à 4°C sur la nuit. Les embryons sont lavés 4 fois 1H en tampon PBST, puis lavés en tampon TMN tween (0.1M NaCl, 50mM MgCl₂, 0.1M Tris pH=8.0) 3 fois pendant 10 min à TA. Les sondes sont révélées par un traitement NBT/BCIP (6.6 µl NBT, 3.5µl BCIP pour 1ml TMN) à l'obscurité. L'arrêt de la coloration est réalisé par une solution de PFA à 4% dans du PBST. Les embryons sont montés entre lame et lamelle pour être orientés dans du Vectashield®/dapi. Les images sont réalisées sur un microscope Olympus BX51 équipé d'une lampe à mercure HBO 50W et d'une caméra Leica DFC310Fx.

FIGURES

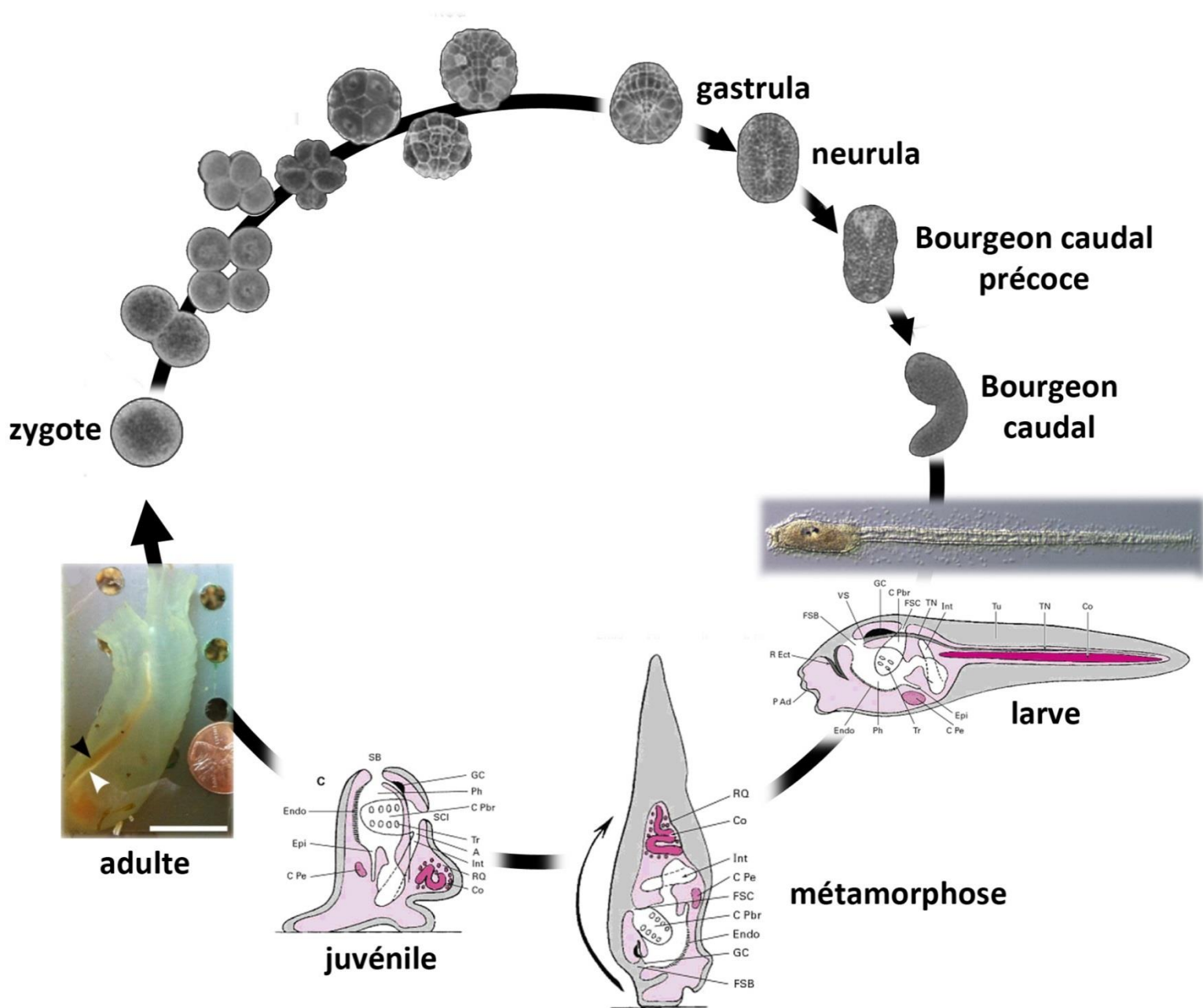


FIGURE 1.1 CYCLE DE VIE DES ASCIDIES SOLITAIRES

Partie supérieure : projections 3D d'embryons de *C.intestinalis* (vue végétative) obtenues par un marquage phalloïdine couplé avec Alexa 546. Le développement embryonnaire de *C.intestinalis* est invariant. Chaque stade du développement présente une géométrie fixe. Adapté de Hotta et al., 2007

Partie inférieure : photographie d'une larve de *C.intestinalis* (emprunté à Munro et al., 2006) et d'un animal adulte (emprunté à Christiaen et al., 2009). Entre les deux, schéma d'une larve d'ascidie solitaire et de sa métamorphose (emprunté à Richard et al., 2009). Sur la photographie de l'adulte, la tête de flèche noire indique les ovocytes (couleur jaune/orange) et la tête de flèche blanche indique les spermatozoïdes.

Liste des abréviations : A : Anus ; C Pbr : Cavité péribranchiale ; Co : Chorde ; C Pe : Cardio-péricarde ; Endo : Endostyle ; Epi : Epicarde ; FSB/FSC : Futurs siphons buccal/cloacal ; GC : Ganglion cérébral ; Int : Intestin ; P Ad : Papilles adhésives ; Ph : Pharynx ; R Ect : Repli ectoblastique ; RQ : Reste de queue ; SB : Siphon buccal ; S Cl : Siphon cloacal ; TN : Tube nerveux ; Tr : Tréma ; Tu : Tunique ; VS : Vésicule sensorielle.

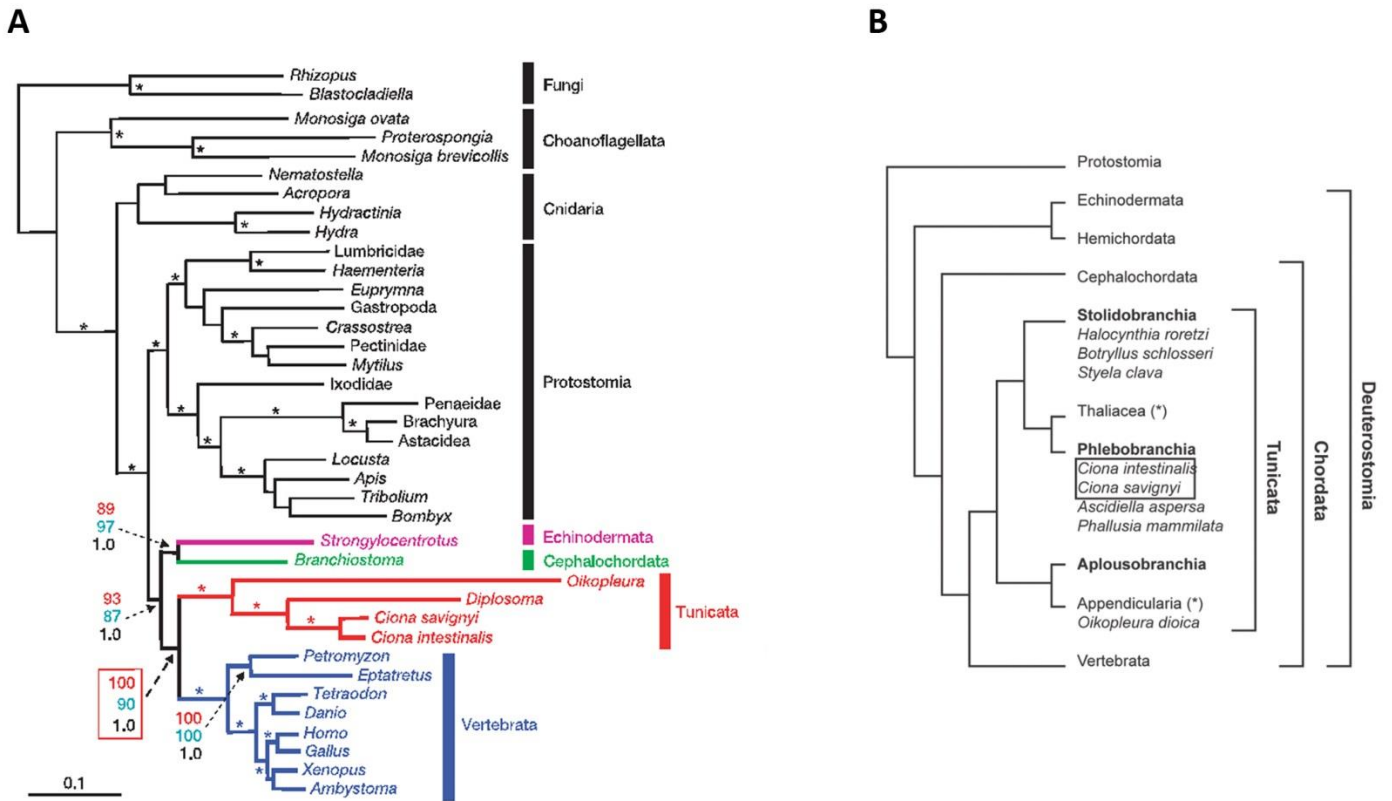


FIGURE 1.2 PHYLOGENIE DES ASCIDIES

A) Nouvelle phylogénie des chordés.

L'analyse phylogénétique basée sur des données génomiques (alignement de 33800 acides aminés) a permis de replacer les Tuniciers comme groupe sœur des Vertébrés. Les chiffres représentent les valeurs des distances génétiques calculées à partir de différents algorithmes.

Emprunté à Delsuc et al., 2006

B) Phylogénie détaillée des Urochordés.

Emprunté à Christiaen et al., 2009

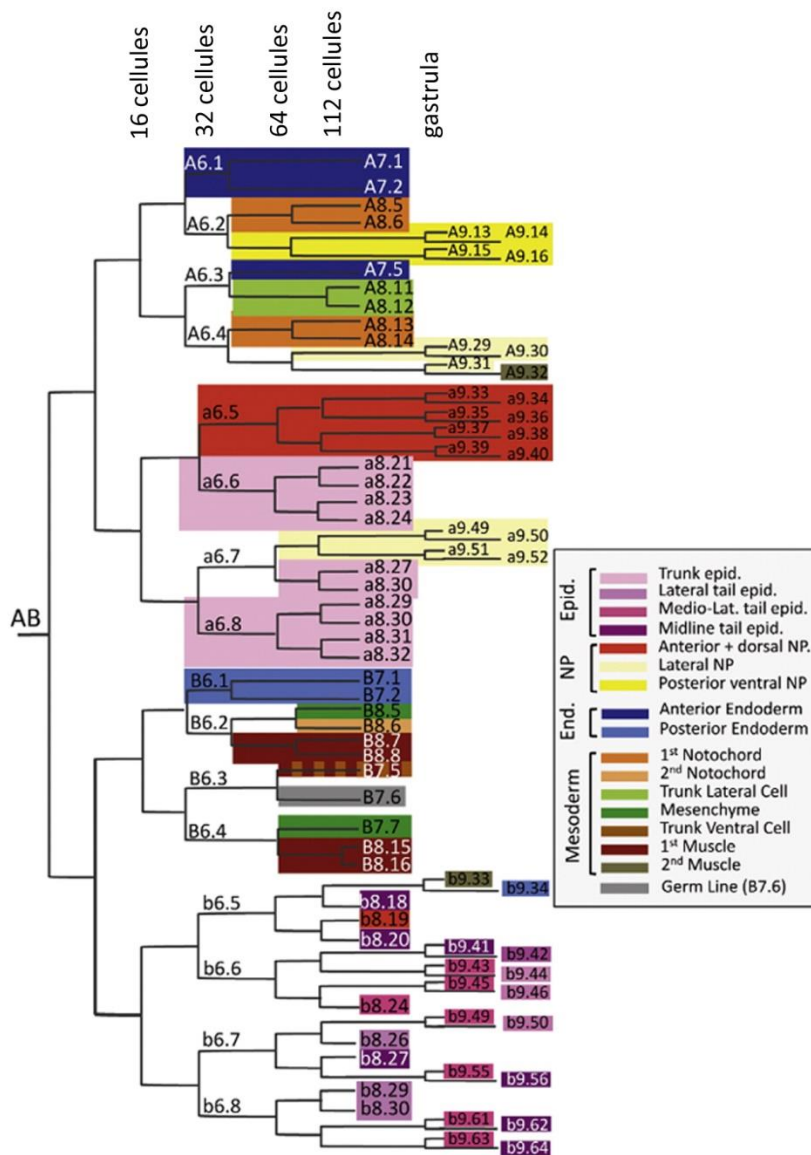


FIGURE 1.3 LIGNAGE CELLULAIRE CHEZ *C. INTESTINALIS*

Emprunté à Lemaire, 2009

Lignage chez l'ascidie *C. intestinalis* du stade 2-cellules jusqu'à la gastrulation. La couleur des branches reflète le destin des cellules, comme indiqué par la légende.

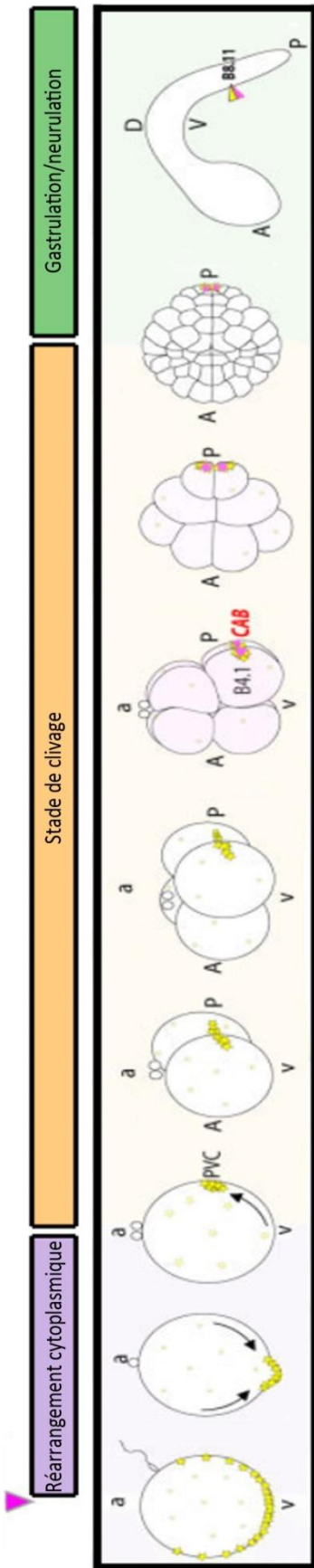


FIGURE 1.4 AXES EMBRYONNAIRES ET DETERMINANTS MATERNELS

Adapté de Prodon et al., 2007

Schéma de la localisation des ARN postplasmiques/PEM I de l'ovocyte jusqu'à la larve précoce.

a : animal ; v : végétatif ; CP/future D : contraction au futur pôle dorsal ; A : antérieur ; P : postérieur ; D : dorsal ; V : ventral ; PVC : Posterior Vegetal Cytoplasm ; CAB : Centrosome Attracting Body ; B8.11 : lignée germinale.

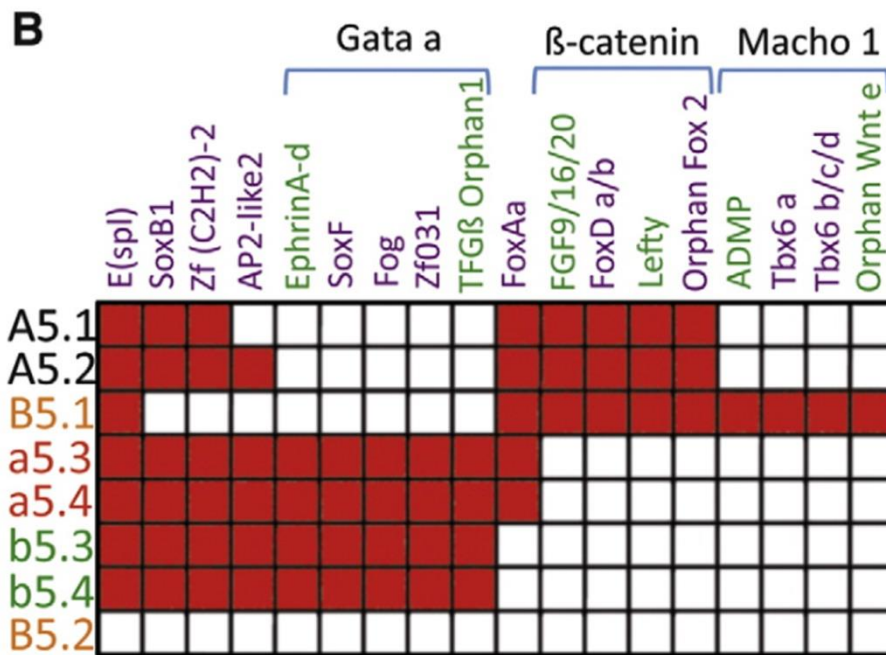
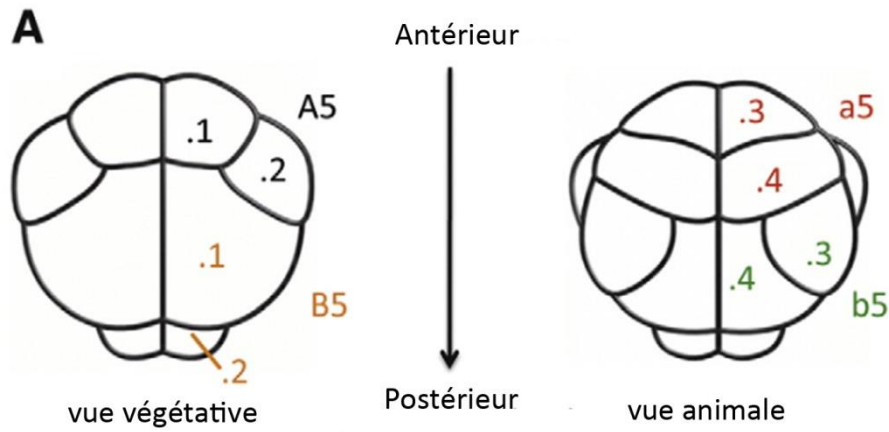


FIGURE 1.5 ACTIVATION DU PROGRAMME ZYGOTIQUE DE *C. INTESTINALIS*.

Emprunté à Lemaire, 2009

A : Schéma des vues végétative (gauche) et animale (droite) d'un embryon au stade 16 cellules.

B : Gata-a, β-caténine, et Macho-1 sont des régulateurs directs des gènes indiqués en dessous. Les gènes en violet représentent des régulateurs transcriptionnels et les gènes en vert des ligands de voie de signalisation. Ensemble, ces facteurs définissent six territoires distincts.

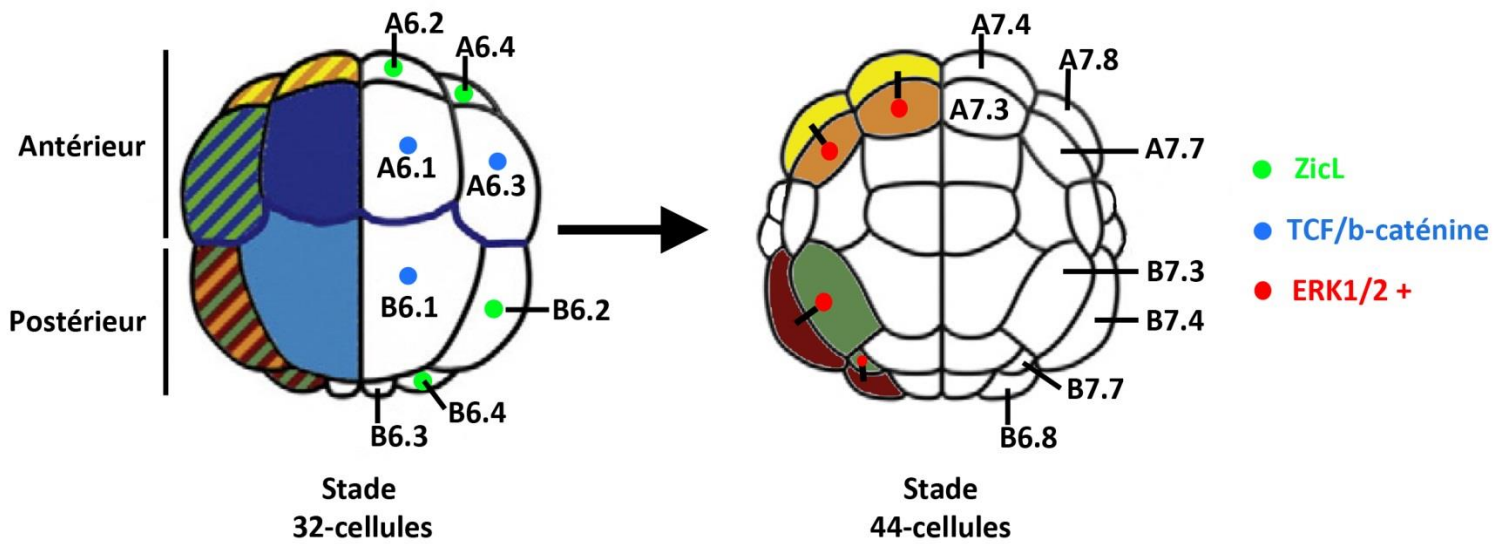


FIGURE 1.6 SPECIFICATION DES DESTINS AUX STADES 32- ET 44-CELLULES.

Adapté de Lemaire, 2009

Schéma d'une vue végétative d'embryon de *C. intestinalis* aux stades 32- et 44-cellules. Les destins sont indiqués par le même code couleur que la figure 1.3. Les points vert et bleu illustrent l'activation différentielle de TCF/ β caténine et ZicL au stade 32-cellules. Le point rouge indique l'activation différentielle d'ERK1/2 au stade 44-cellules.

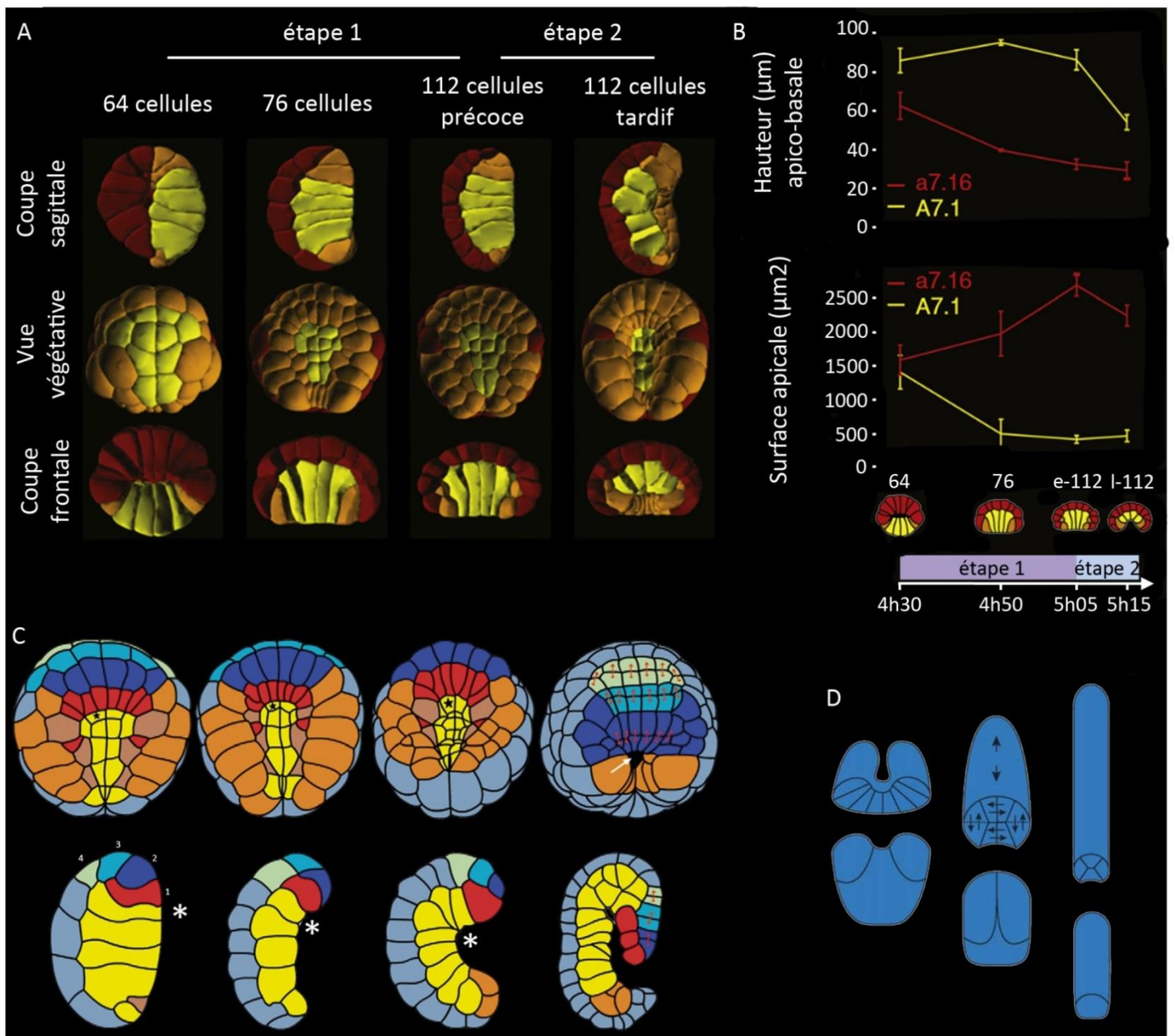


FIGURE 1.7 EVENEMENTS MORPHOGENETIQUES DE LA GASTRULATION ET DE LA NEURULATION

A/B) La gastrulation implique deux étapes
Emprunté à Sherrard et al., 2010

A) Vue sagittale et coupe frontale et végétative d'embryons de *C. intestinalis* reconstruits en 3D aux stades indiqués. L'endoderme est en jaune, le mésoderme en orange et l'ectoderme en rouge.

B) Mesure de la hauteur apico-basale des cellules (µm) et de la surface apicale (µm²) aux stades indiqués, pour une cellule de l'endoderme (courbe jaune) et une cellule de l'ectoderme (courbe rouge).

C/D) Formation de la plaque neurale et du tube neural.
Emprunté à Munro et al., 2006

C) Phases de la gastrulation chez *C. intestinalis*. Vue végétative (en haut) et para-sagittale (en bas) à différents stades (d'abord 76- et 110-cellules, puis deux temps différents de gastrula). L'endoderme est en jaune, la notochorde en rouge, l'épiderme en bleu clair et les muscles en orange. Les lignages

neuraux sont représentés en bleu foncé (lignage « A » et « b ») et en turquoise /vert clair ? (lignage « a »).

- D)** L'enroulement de la plaque neurale permet la formation du tube neural. Elle commence par les cellules les plus postérieures de la plaque neurale et progresse vers la partie antérieure (schéma 1). Les cellules neurales du lignage « a » représentées en vert clair sur le schéma précédent n'intégreront pas la plaque neurale mais formeront les papilles adhésives et le système nerveux périphérique. Durant les stades « bourgeon caudal », l'élongation du tube neural se fait par intercalation des cellules et par divisions obliques (schéma 2). La section montre que le tube neural s'organise par section de quatre cellules : deux latérales, une dorsale et une ventrale (schéma 3).

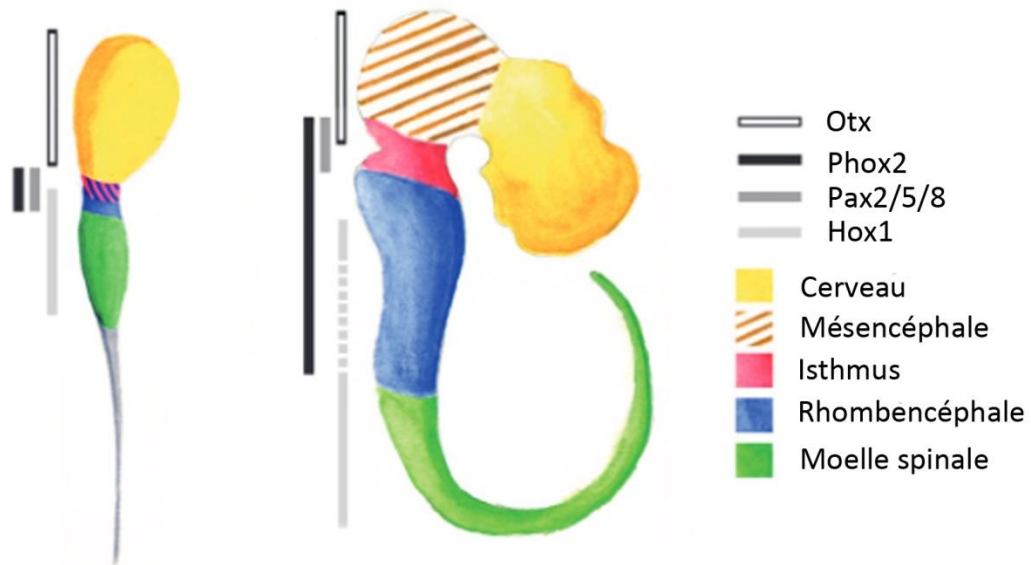


FIGURE 1.8 CONSERVATION DE L'ORGANISATION TRIPARTITE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Emprunté à Dufour et al., 2006

A gauche : schéma du système nerveux central chez *C. intestinalis*

A droite : schéma du système nerveux central chez les Vertébrés

L'homologie des structures (couleurs) et des partons d'expression de certains gènes (nuances de gris) soutiennent l'hypothèse d'une organisation en trois parties du SNC chez l'ascidie. Le tube caudal larvaire en gris chez l'ascidie ne correspond à aucune structure chez les Vertébrés.

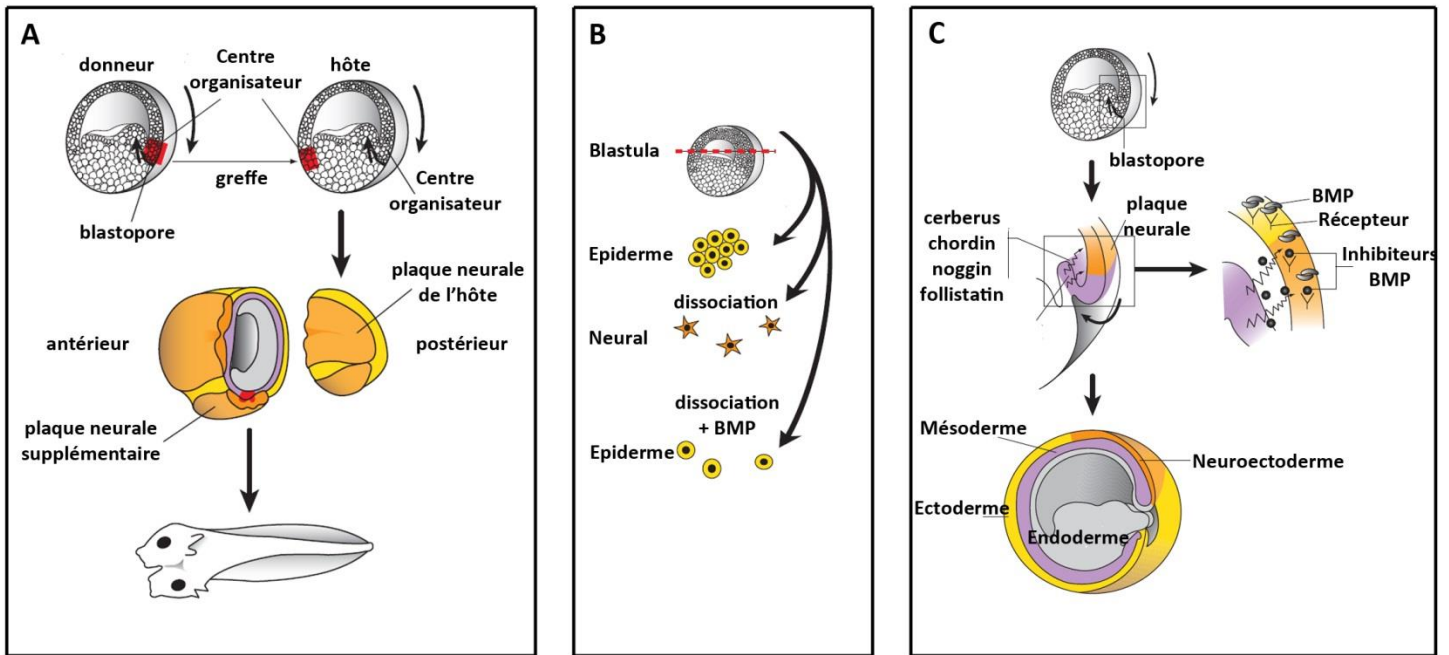


FIGURE 2.1 INDUCTION NEURALE CHEZ LES AMPHIBIENS

Emprunté à Price et al., 2011

En jaune : tissu ou cellule épidermique ; en orange : tissu ou cellule neurale, en violet : mésoderme.

A) Notion de centre organisateur.

En rouge, correspond la région prélevée sur l'embryon donneur, puis greffée sur un embryon hôte. Le tissu neural induit par le greffon apparaît de la même couleur que le tissu neural de l'hôte, car les cellules composant ce tissu neural excédentaire dérivent principalement de l'hôte. Cette capacité du greffon à induire un deuxième axe avec les cellules de l'hôte est à l'origine de la notion de centre organisateur.

B) Rôle de la signalisation BMP.

En fonction des conditions expérimentales indiquées, les cellules issues des calottes animales s'engagent vers un destin épidermique ou neural.

C) Rôle des inhibiteurs des BMP dans l'induction neurale.

Le mésoderme exprime des inhibiteurs BMP qui vont protéger le futur système nerveux de la signalisation BMP.

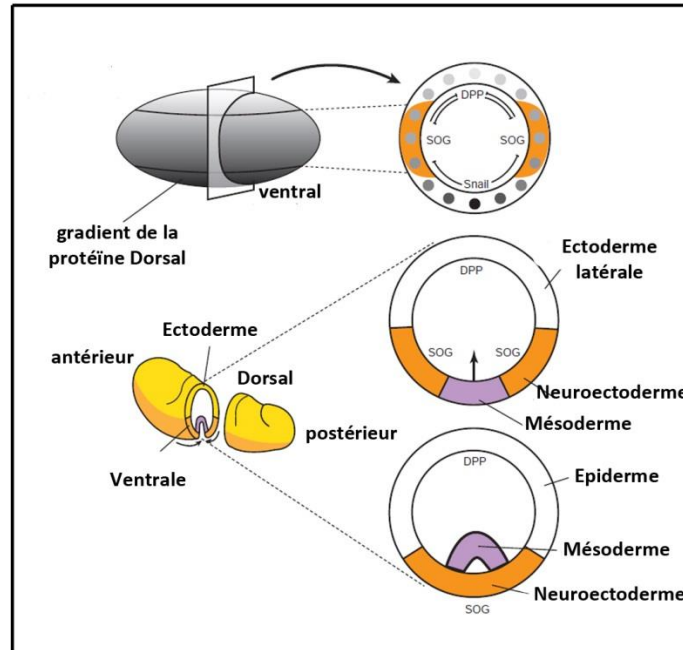


FIGURE 2.2 INDUCTION NEURALE CHEZ LA DROSOPHILE

Emprunté à Price et al., 2011

En jaune : tissu ou cellules épidermiques ; en orange : tissu ou cellules neural(e)s, en violet : mésoderme.

En haut : Le gradient de protéines Dorsal génère les patrons d'expression des homologues de BMP et Chordin, appelés respectivement *Dpp* et *Sog*.

En Bas : De manière analogue aux Vertébrés, *Dpp* et *Sog* définissent la spécification de l'épiderme et du tissu neural.

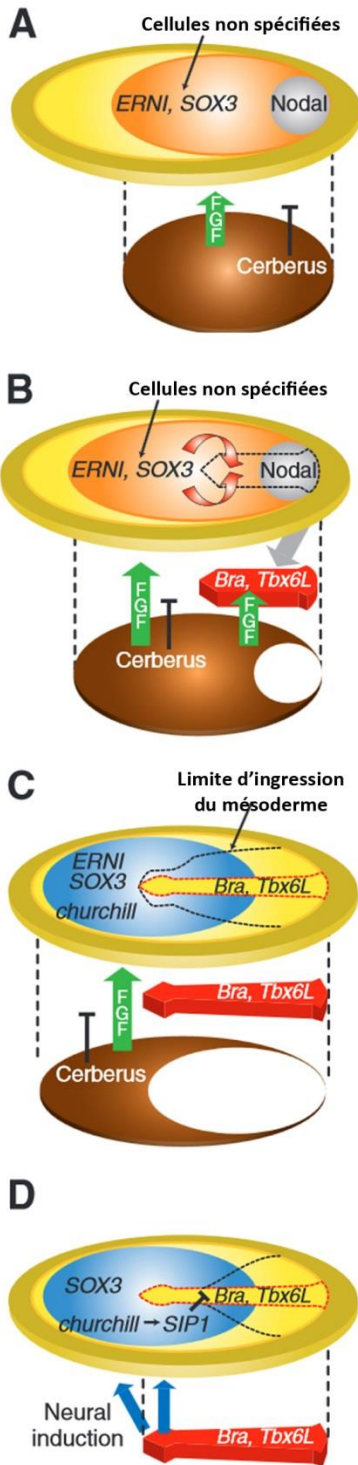


FIGURE 2.3 INDUCTION NEURALE CHEZ LE POULET

Emprunté à Stern, 2005

Vue oblique de l'épiblaste (jaune/orange) et de l'hypoblaste sous-jacent (marron) à différents stades embryonnaires. Le pôle postérieur est à droite.

- A- Stades XI-XII. Le signal FGF8 sécrété par l'hypoblaste induit les gènes neuraux précoces *ERNI* et *Sox3*. *nodal* est exprimé dans l'épiblaste postérieur et il est inhibé par *Cerberus* qui est exprimé par l'hypoblaste.
- B- Stade XIII-2. L'hypoblaste est déplacé antérieurement par l'endoblaste (en blanc). Ainsi, *Nodal* agit en synergie avec FGF et induit l'expression de *Brachyury* et *Tbx6L*, ce qui provoque la gastrulation.
- C- Stade 3-4. Le signal FGF induit l'expression de *churchill* dans l'épiblaste.
- D- Fin du stade 4. *Churchill* induit *SIP1* qui bloque l'expression de *brachyury* et *Tbx6L*, et induit l'arrêt de la progression de la ligne primitive. L'épiblaste reçoit le signal en provenance du nœud de Hensen qui stabilise le destin neural.

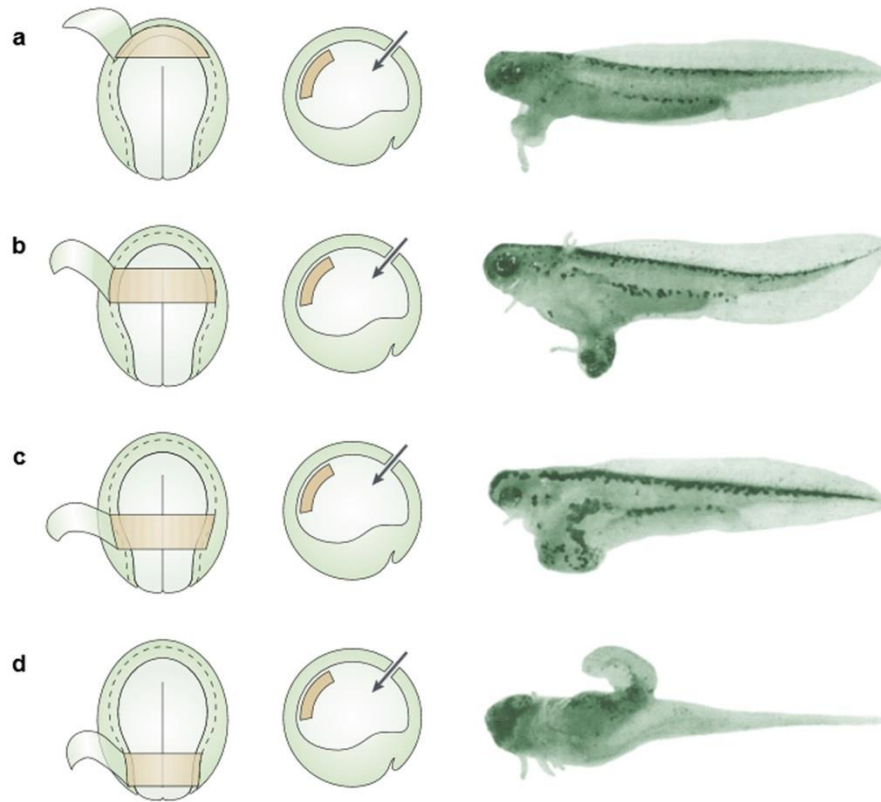


FIGURE 2.4 EXPERIENCE D'OTTO MANGOLD

Emprunté à Stern, 2001

Les différentes régions de l'archantéron, réparties le long de l'axe antéro-postérieur, possèdent différentes capacités d'induction.

a/b) Les parties les plus antérieures de l'archantéron induisent des structures rostrales quand elles sont greffées dans le blastocoèle d'une gastrula précoce.

c/d) A l'opposé, une greffe des structures plus postérieures induit des structures plus caudales.

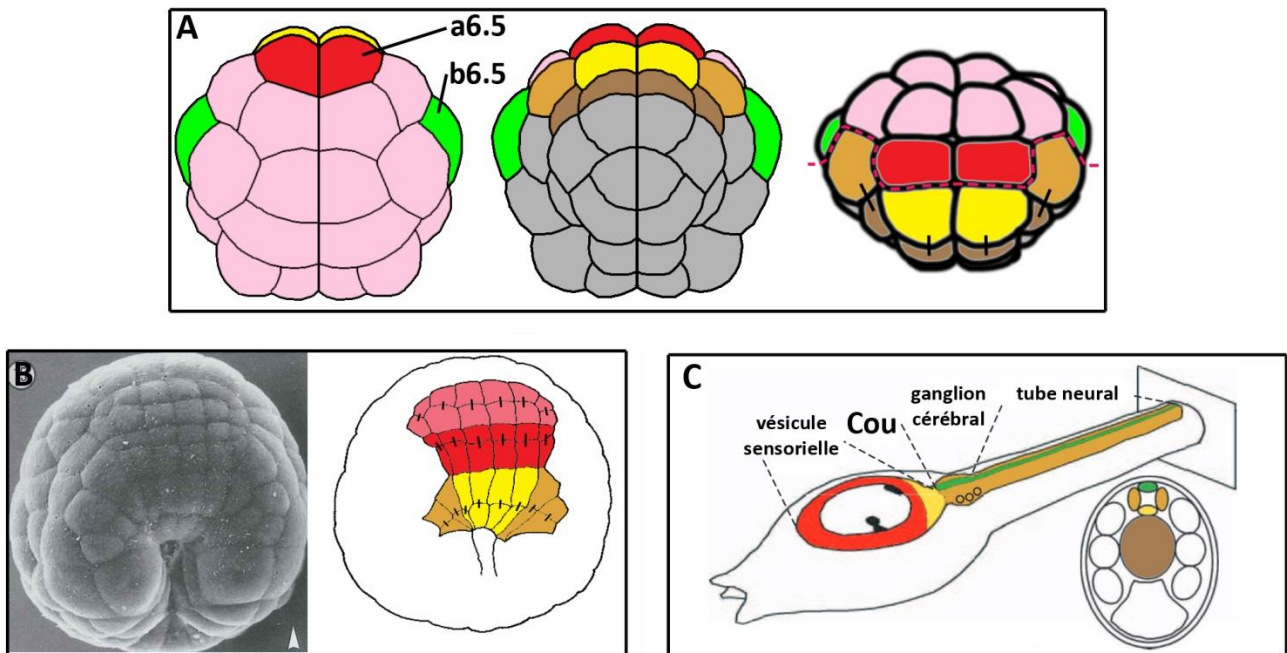


FIGURE 2.5 LES DIFFERENTS LIGNAGES NEURaux CHEZ C. INTESTINALIS.

- A) A gauche : Schéma d'une vue animale d'un embryon au stade 32-cellules. Au milieu : Schéma d'une vue végétative d'un embryon au stade 44-cellules. A droite : schéma d'une vue antérieure d'un embryon au stade 44-cellules. La marge (trait pointillé rouge) délimite la « frontière » entre hémisphères animal et végétatif. Il faut noter que les précurseurs neuraux « A » se forment à la marge, au niveau des contacts cellulaires avec l'hémisphère animal.
- B) Emprunté à Nicol and Meinertzhagen, 1988a
Les différents lignages neuraux participent à la formation de la plaque neurale (excepté le lignage « b »).
- C) Emprunté à Yasuo and Hudson, 2007
Schéma représentant les différents tissus neuraux dans la larve d'ascidie. L'organisation du tube neural est représentée sur la coupe avec deux cellules latérales (orange), une cellule dorsale (vert) et une cellule ventrale (jaune). Les différents lignages neuraux s'organisent différemment dans le tissu neural larvaire. Le lignage « a » participe majoritairement aux structures les plus antérieures. Le lignage neural « A » participe à la fois à des structures antérieures (vésicule sensorielle) et à des structures postérieures (ganglion cérébral et tube neural). Le lignage « b » est à l'origine des cellules dorsales du tube neural.

En rouge : lignée neurale « a » ; en vert : lignée neurale « b » ; en jaune : lignée neurale « A7.4 » ; en orange : lignée neurale « A7.8 » ; en rose : précurseurs épidermiques ; en marron : précurseurs de la notochorde.

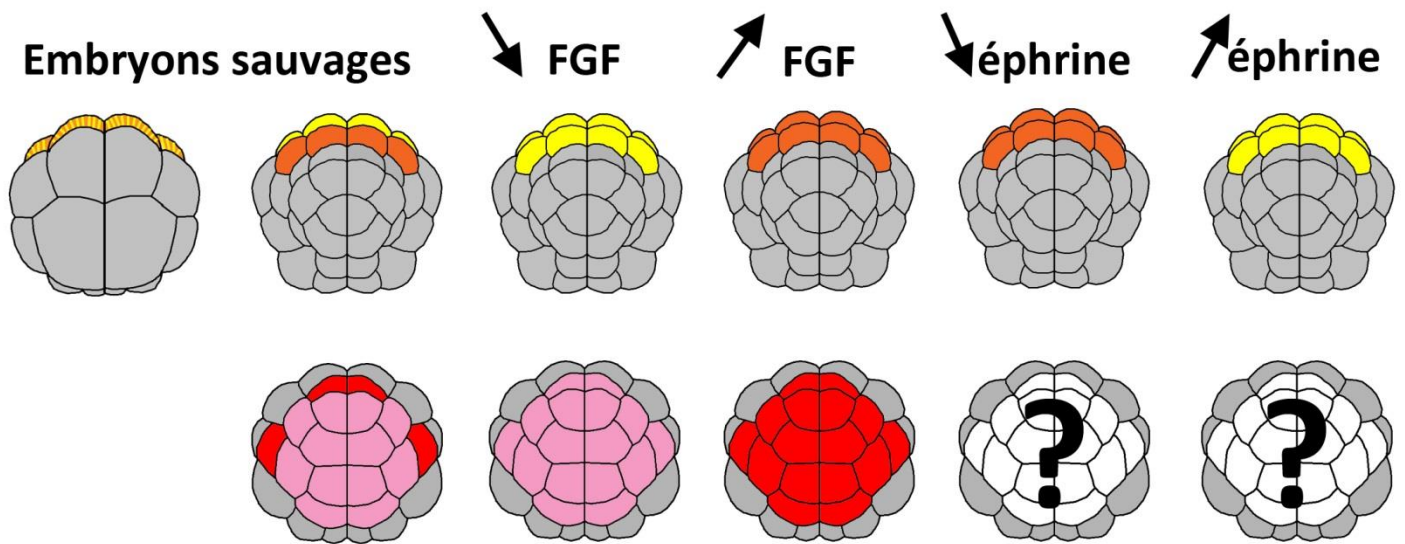


FIGURE 2.6 RÔLE DE FGF ET DE L'ÉPHRINE LORS DE L'INDUCTION DU LIGNAGE NEURAL CAUDAL

Adapté de Lemaire, 2009

En haut : Les cellules mères notochorde/neurale (cellule bicolore) se divisent de manière asymétrique et engagent leur spécification vers le destin neural « A » (couleur jaune) ou notochorde (orange).

En Bas : Au stade 32-cellules, les cellules de l'ectoderme effectuent un choix entre le destin neural animal (en rouge) ou épidermique (rose).

En fonction des expériences pratiquées, les cellules sont converties vers l'une ou l'autre destinée. La nature des expériences est schématisée par des flèches : flèche montante pour une surexpression ; flèche descendante pour une perte de fonction.

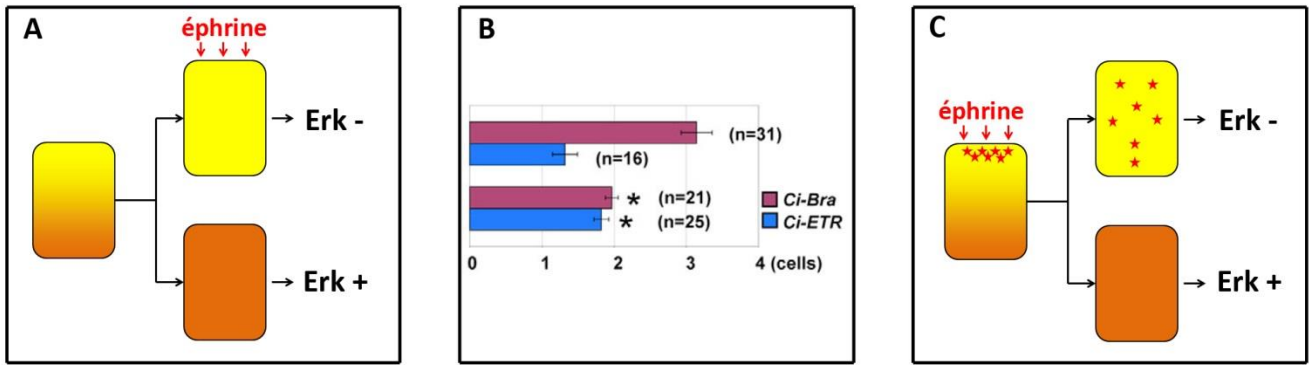


FIGURE 2.7 HYPOTHESES DE SEGREGATION ASYMETRIQUE DE P120-RASGAP.

La cellule bicolore représente la cellule mère notochorde/neurale. La cellule jaune représente le précurseur neural et la cellule orange le précurseur de la notochorde.

A) Première hypothèse : Après la division de la cellule mère notochorde/neurale, seul le précurseur neural est instruit par la signalisation éphrine.

B) Emprunté à Picco et al., 2007.

La cellule mère notochorde/neurale est isolée avant sa division au stade 24-cellules (diagramme du haut) ou 32-cellules tardif (diagramme du bas). L'expression de *Brachyury* et *ETR* est recherchée par hybridation *in situ* dans la descendance des précurseurs isolés, et le nombre de cellules positives dans chaque cas est reporté sur les histogrammes.

C) Seconde hypothèse : retenue par les auteurs : La signalisation éphrine induit la polarisation de la cellule mère notochorde/neurale avant sa division. RasGAP (étoiles rouges) serait recruté au niveau des membranes exposées au signal éphrine. Lors de la division de la cellule mère notochorde/neurale, les membranes « enrichies en protéines RasGAP » seraient héritées de manière asymétrique et provoqueraient le choix de destins.

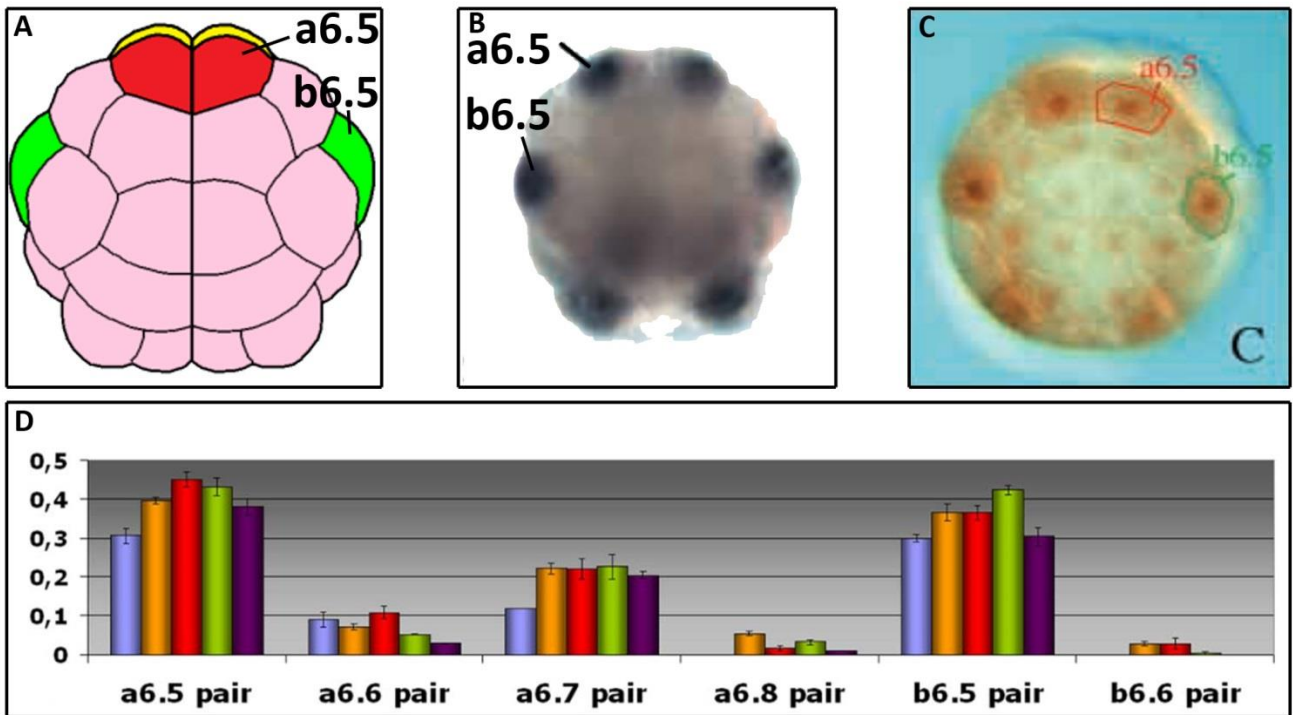


FIGURE 2.8 CARACTERISTIQUES DE L'INDUCTION NEURALE DANS L'HEMISPHERE

ANIMAL.

A) Schéma d'une vue animale d'un embryon au stade 32-cellules.

B/C) Emprunté à Hudson et al., 2003

B) Détection de l'expression d'*Otx* par hybridation in situ dans les précurseurs neuraux a6.5 et b6.5. Vue animale.

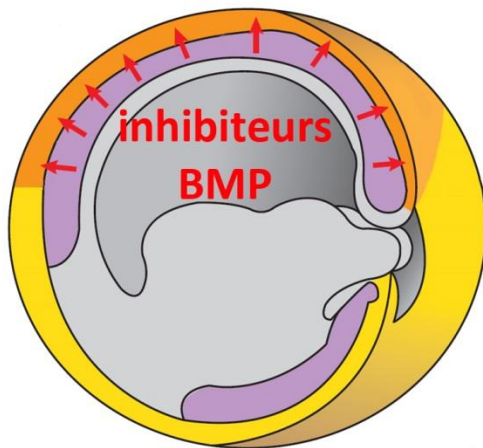
C) Détection de la forme active d'ERK1/2 par immunomarquage dans les précurseurs neuraux a6.5 et b6.5. Vue animale

D) Emprunté à Tassy et al., 2006

Surfaces de contact entre les cellules animales (compétentes pour adopter le destin neural) et les cellules végétatives « A » qui expriment *FGF9/16/20*. Il s'agit de l'analyse d'un seul embryon. En bleu : *C. intestinalis*, stade 32-cellules précoce ; en orange : *C. intestinalis*, stade 32-cellules ; en rouge : *C. intestinalis*, stade 32-cellules tardif ; en vert : *C. intestinalis*, stade 44-cellules ; en violet : *H. roretzi*, stade 32-cellules tardif.

En rouge : lignée neurale « a » ; en vert : lignée neurale « b » ; en jaune : lignée neurale « A7.4 » ; en orange : lignée neurale « A7.8 » ; en rose : précurseurs épidermiques ; en marron : précurseurs de la notochorde.

Induction



Transformation

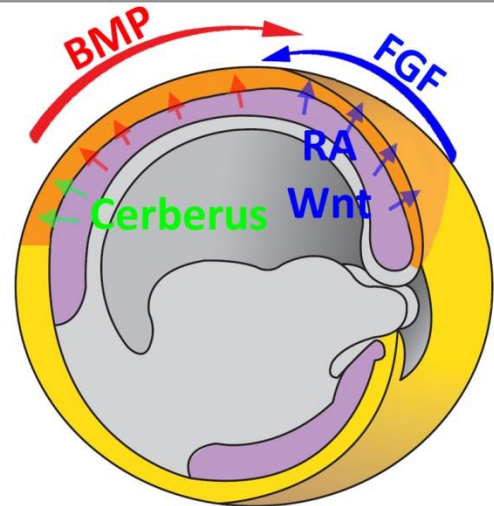


FIGURE 3.1 MODELE D'INDUCTION-TRANSFORMATION DE NIEUWKOOP.

Adaptée de (Price et al., 2011)

Schéma des premières étapes du développement neural chez le xénope.

A gauche Des inhibiteurs des BMP (en rouge) protègent le futur tissu neural du signal BMP.

A droite Des signaux caudalisants (en bleu) instruisent la partie postérieure de la plaque neurale. Cerberus protège l'extrémité antérieure de la plaque neurale des signaux caudalisants. La frontière entre le domaine antérieur et le domaine postérieur est maintenue par l'antagonisme BMP/FGF.

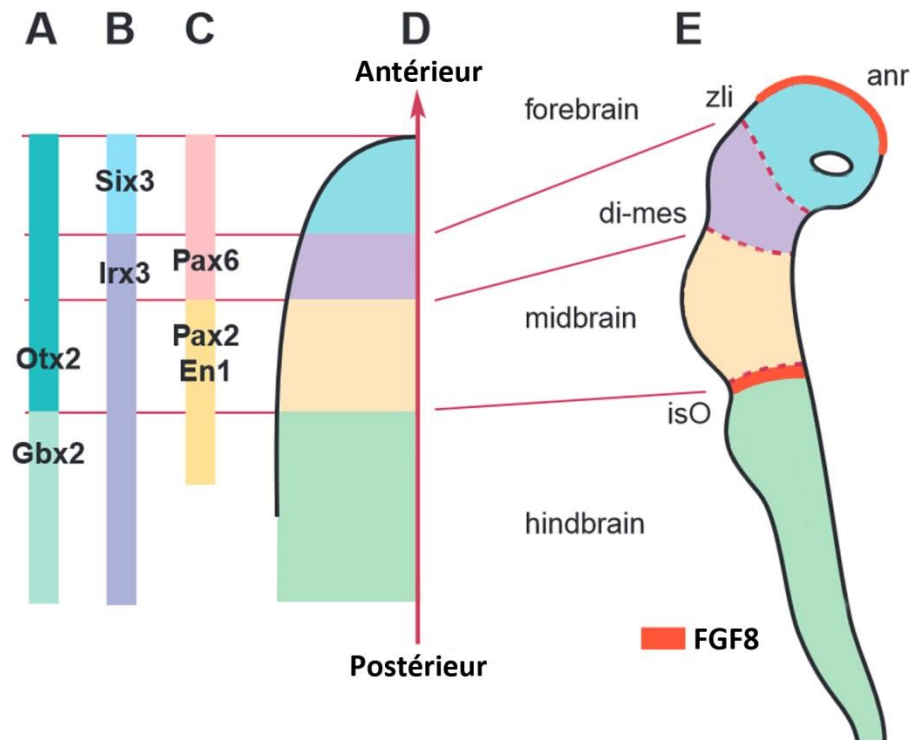


FIGURE 3.2 REGIONALISATION ANTERO-POSTERIEURE DU SYSTEME NERVEUX CHEZ LA SOURIS.

Adaptée de (Kobayashi et al., 2002)

- A/B/C/D** Schéma des territoires d'expression des facteurs de transcription impliqués dans la régionalisation antéro-postérieure du neuroectoderme. Les différents territoires sont indiqués par un code couleur (en bleu : télencéphale ; en violet : diencephale, en jaune : mésencéphale et en vert : rhombencéphale).
- E** Les facteurs de transcription établissent la délimitation des principales structures neurales. A la frontière des différents territoires se forment des organisateurs neuraux secondaires. (anr : anterior neural ridge, zli : zona limitans intrathalamica, di-mes : frontière entre le diencephale et le mésencéphale et le isthmic organizer (Isthmus)).

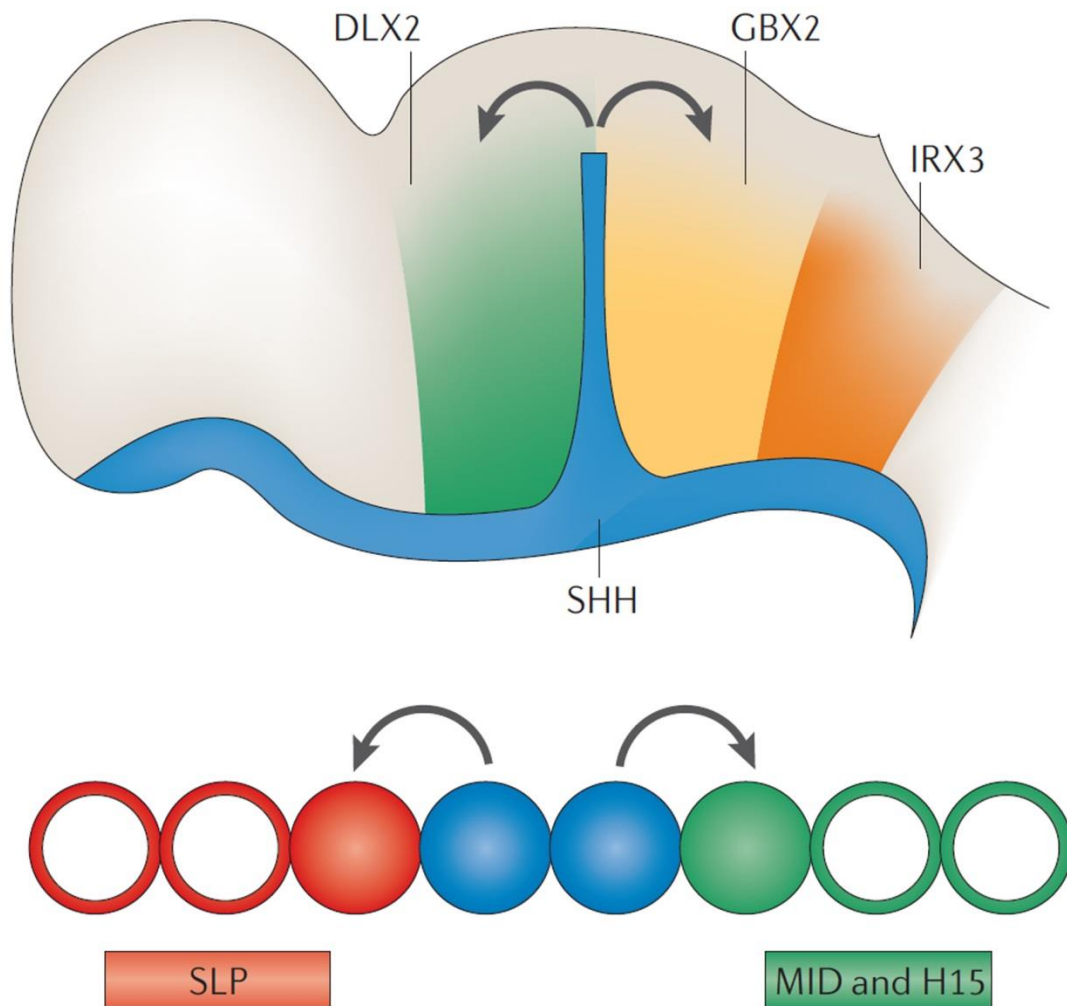


FIGURE 3.3 REGIONALISATION LOCALE DU SYSTEME NERVEUX.

Adaptée de (Ingham and Placzek, 2006)

En haut Schéma de l'effet régionalisant de la ZLI chez les Vertébrés. *Sonic Hedgehog (SHH)* est exprimé à la frontière d'expression des facteurs de transcription *Six3* et *IRX3*. Le signal SHH diffuse antérieurement et postérieurement autour du site d'expression. Comme les régions antérieure et postérieure n'expriment pas les mêmes facteurs de transcription, elles interprètent différemment le signal SHH.

A bas Vue schématique d'un segment de drosophile. Chez la drosophile, les frontières de chaque segment agissent, de manière similaire aux organisateurs locaux des Vertébrés, pour affiner la spécification de chaque cellule du segment. Les cellules bleues expriment *Hedgehog (Hh)*, qui diffuse de part et d'autre de son lieu d'expression. Les cellules situées autour de la source du signal *Hh* expriment des facteurs de transcription différents (en vert et rouge), modulant leurs capacités à répondre au signal *Hh*.

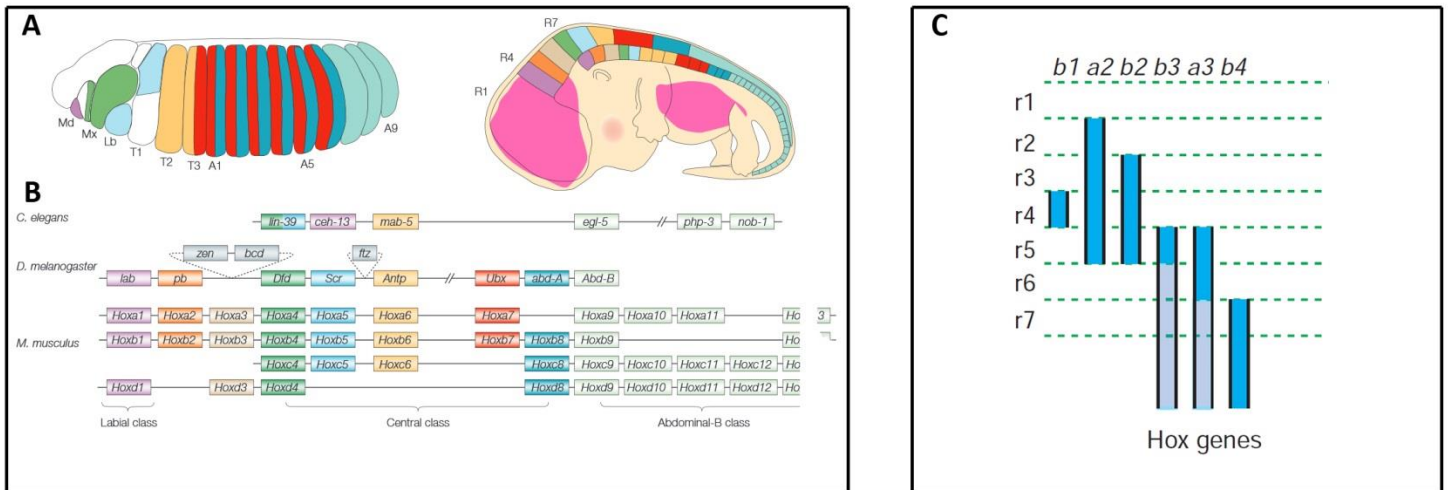


FIGURE 3.4 EXPRESSION DES GENES *HOX* DURANT LA REGIONALISATION A/P.

Adaptée de (Price et al., 2011)

- A** Vue schématique de l'expression des gènes *Hox* chez la drosophile (à gauche) et chez la souris (à droite).
- B** L'organisation des différents clusters génétiques des gènes *Hox* chez *C. elegans*, *D. melanogaster* et *M. musculus* révèle que l'ordre des gènes sur le génome correspond à l'ordre d'expression des gènes le long de l'axe antéro-postérieur. Le code couleur est le même que celui employé en A.
- C** Vue schématique du patron d'expression des gènes *Hox* dans les rhombomères chez la souris.

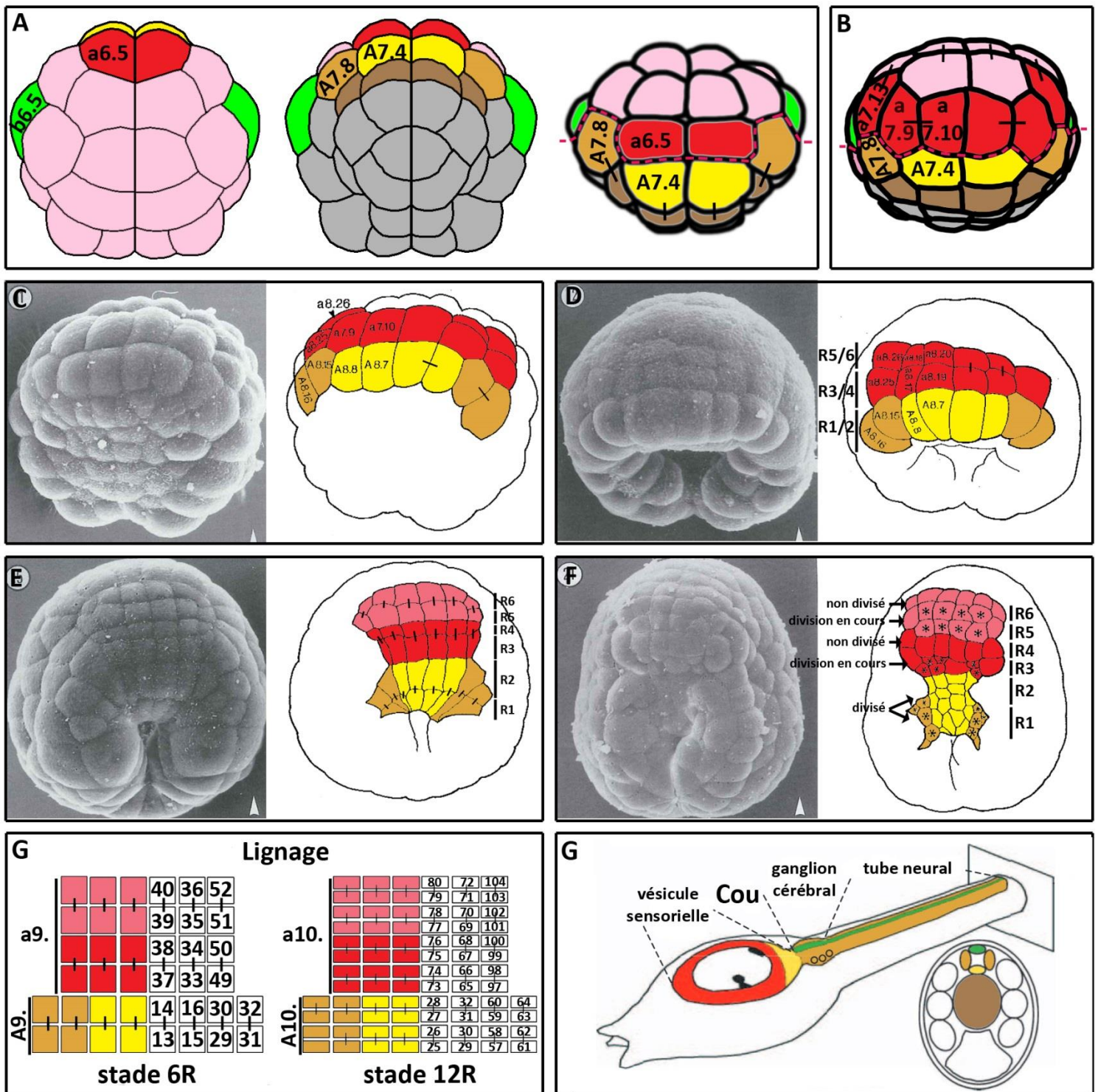


FIGURE 3.5 LIGNAGE DU SYSTEME NERVEUX CHEZ L'ASCIDIE LORS DE LA REGIONALISATION A/P.

En rouge : lignée neurale « a » ; en vert : lignée neurale « b » ; en jaune : lignée neurale « A7.4 » ; en orange : lignée neurale « A7.8 » ; en rose : précurseurs épidermiques ; en marron : précurseurs de la notochorde.

A) **A gauche** : schéma d'une vue animal d'un embryon au stade 44-cellules. **Au milieu** : schéma d'une vue végétative d'un embryon au stade 44-cellules. **A droite** : schéma d'une vue antérieure d'un embryon au stade 44-cellules. La marge (trait pointillé rouge) délimite la « frontière » entre hémisphère animal

et végétatif. Il faut noter que les précurseurs neuraux « A » se forment à la marge, au niveau des contacts cellulaires avec l'hémisphère animal.

B) Schéma d'une vue antérieure d'un embryon au stade 64-cellules. Les cellules animales génèrent à la marge une rangée de cellules neurales.

C/F) Emprunté à Nicol and Meinertzhagen, 1988a

Photographies d'embryons à différents stades de la gastrulation, réalisées en microscopie électronique à balayage, avec leur représentation schématique correspondante. Au stade 110-cellules (C), les précurseurs neuraux se divisent dans l'axe de la marge. Cela génère un stade plaque neurale 2R. Lors des divisions suivantes, les précurseurs neuraux se divisent selon l'axe antéro-postérieur. Cela génèrera les stades plaque neurale 3R (D), puis 6R (E) et enfin 12R (F). Ces stades se forment de façon progressive, car les divisions au sein de chaque rangée ne sont pas synchrones.

Les différents lignages neuraux participent à la formation de la plaque neurale (excepté le lignage « b »).

G) Le lignage de chaque cellule est reporté dans les vues schématiques des plaques neurales à 6R et 12R.

H) Emprunté à Yasuo and Hudson, 2007

Schéma représentant les différents tissus neuraux de la larve d'ascidies. L'organisation du tube neural est représentée sur la coupe avec, deux cellules latérales (orange), une cellule dorsale (vert) et une cellule ventrale (jaune). Les différents lignages neuraux s'organisent différemment dans le tissu neural larvaire. Le lignage « a » participe majoritairement aux structures les plus antérieures. Le lignage neural « A » participe à la fois à des structures antérieures (vésicule sensorielle) et des structures postérieures (ganglion cérébrale et tube neurale). Le lignage « b » est à l'origine des cellules dorsales du tube neural.

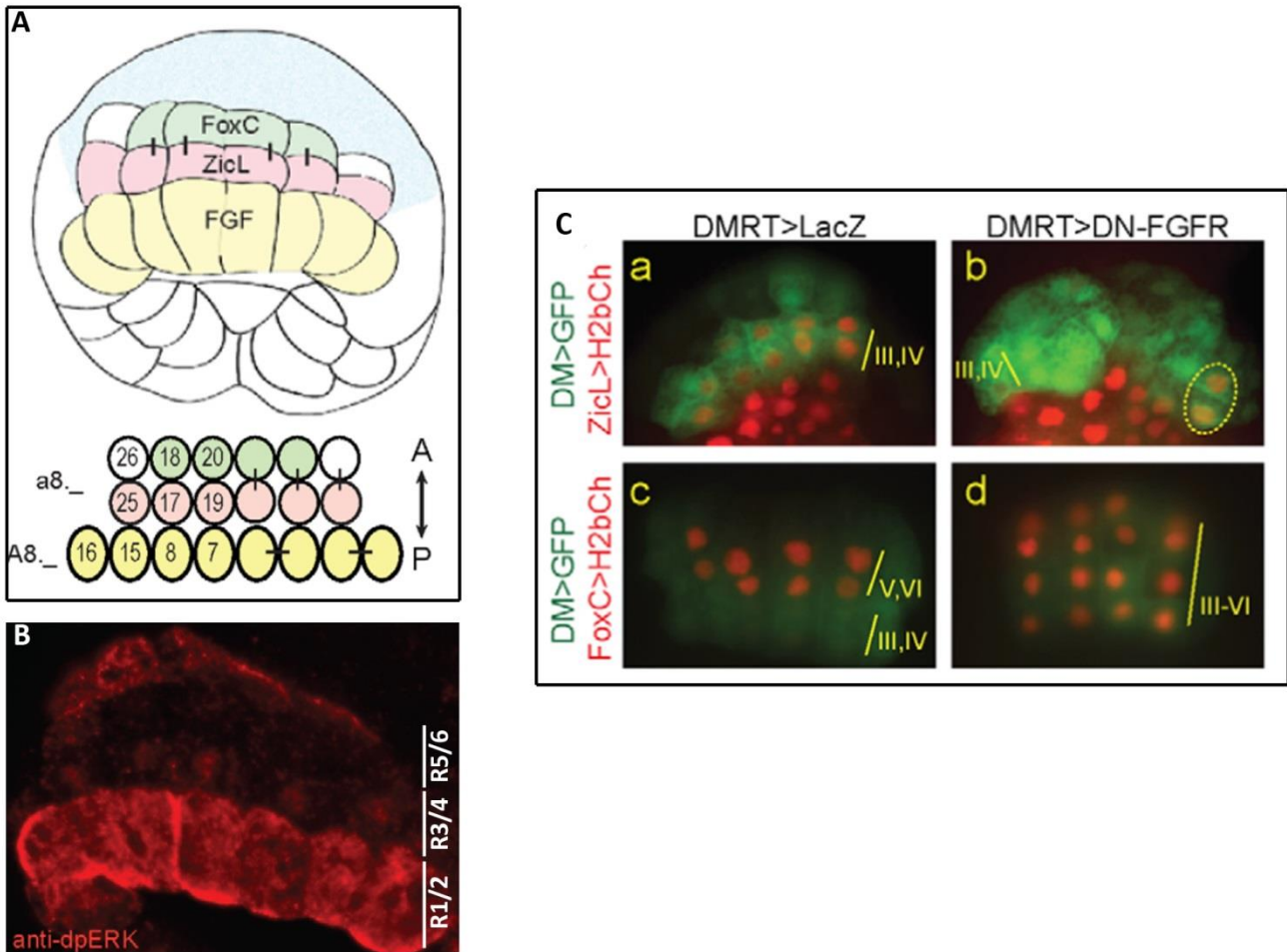


FIGURE 3.6 REGIONALISATION A/P DES R3/4 ET R5/6 AU STADE 3R.

Empruntée à Wagner and Levine, 2012

- A)** Schéma de l'expression des gènes au stade 3R. Les barres indiquent les cellules sœurs qui viennent de se diviser. En jaune, le territoire neural « A » exprime *FGF9/16/20*. La R3/4 exprime *ZicL* (rose) et la R5/6 exprime *FoxC*. Le nom de chaque cellule du stade 3R est indiqué sur la vue schématique du bas.
- B)** L'activation d'Erk1/2 est détectée par immunomarque fluorescent de ERK1/2 doublement phosphorylé (dpERK). Ce marquage montre une activation graduée d'ERK1/2 dans la plaque neurale 3R. Un fort signal est détecté dans la R1/2, qui exprime *FGF9/16/20*. Un signal ERK d'intensité intermédiaire est détecté dans la R3/4, et aucun signal n'est visible dans la R5/6.
- C)** Étude de l'activité des enhancers de *ZicL* et *FoxC*, en présence du DN-FGFR. Les enhancers des gènes *ZicL* et *FoxC* sont coélectroporés avec un rapporteur GFP, exprimé dans le lignage neural « a » (DMRT). Les images a et c montrent que, les rapporteurs induisent l'expression d'H2b-mcherry (H2bCh) dans les territoires d'expression des gènes *ZicL* et *FoxC*. La coélectroporation des rapporteurs avec le DN-FGFR induit la perte d'expression d'H2bCh par le rapporteur de *ZicL* dans la R3/4, mais l'extension d'expression d'H2bCh, avec le rapporteur de *FoxC* dans la R3/4.

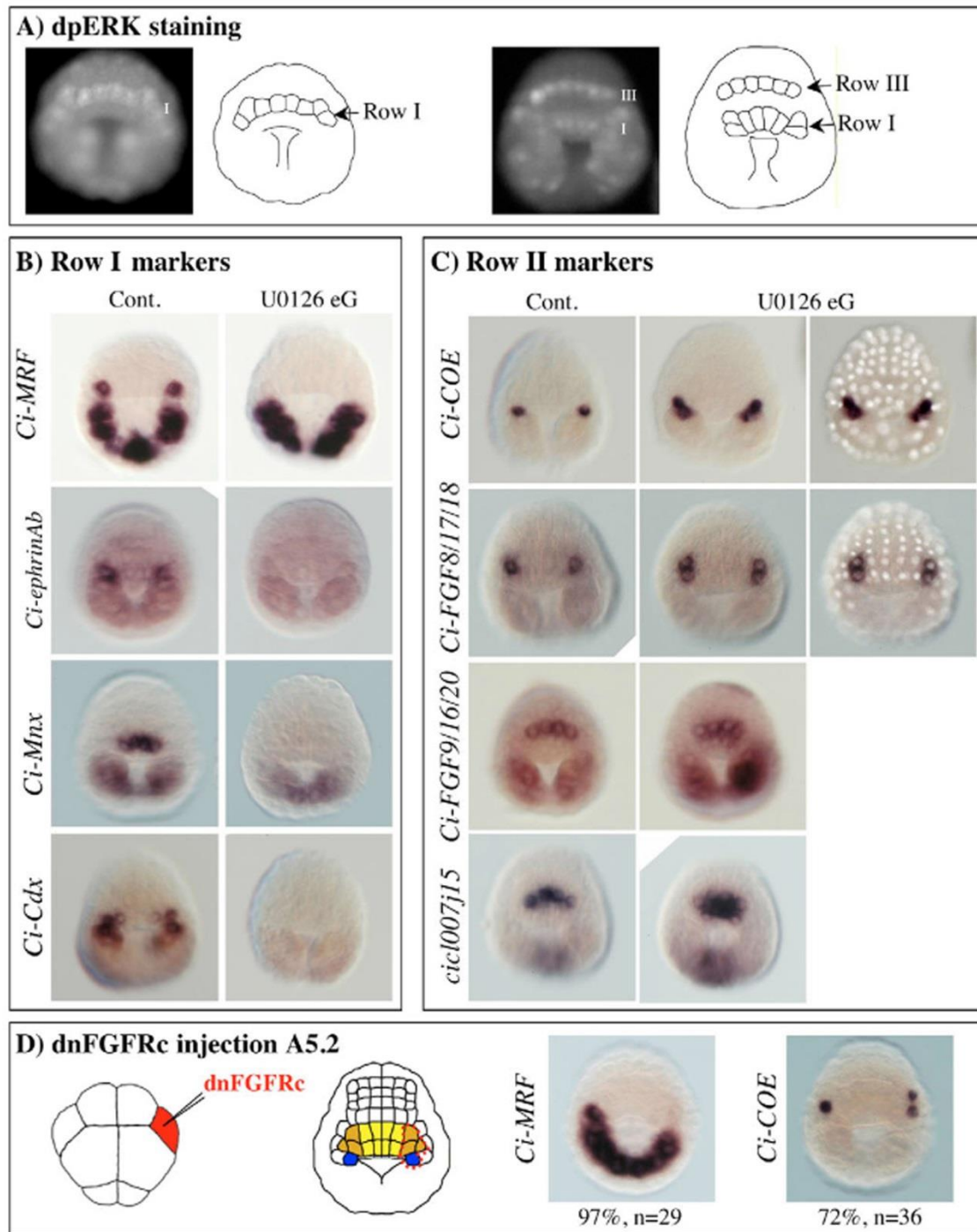


FIGURE 3.7 REGIONALISATION A/P DES RANGÉES I ET II AU STADE 6R.

emprunté à Hudson et al., 2007

- A)** L'immunomarque fluorescent de la forme ERK1/2 activée (dpERK) montre une activation d'ERK1/2 au stade 3R (à gauche) et 6R (à droite).
- B/C)** Hybridation in situ montrant l'expression, au stade 6R, des marqueurs spécifiques des rangées 1 (B) et 2 (C) dans des embryons sauvages, ou traités au stade 3R avec un inhibiteur de MEK (U0126).
- C)** Expression au stade 6R de *MRF* (spécifique de la R1), et *COE* (spécifique de la R2) dans des embryons injectés unilatéralement avec DN-FGFR dans la cellule A5.2.

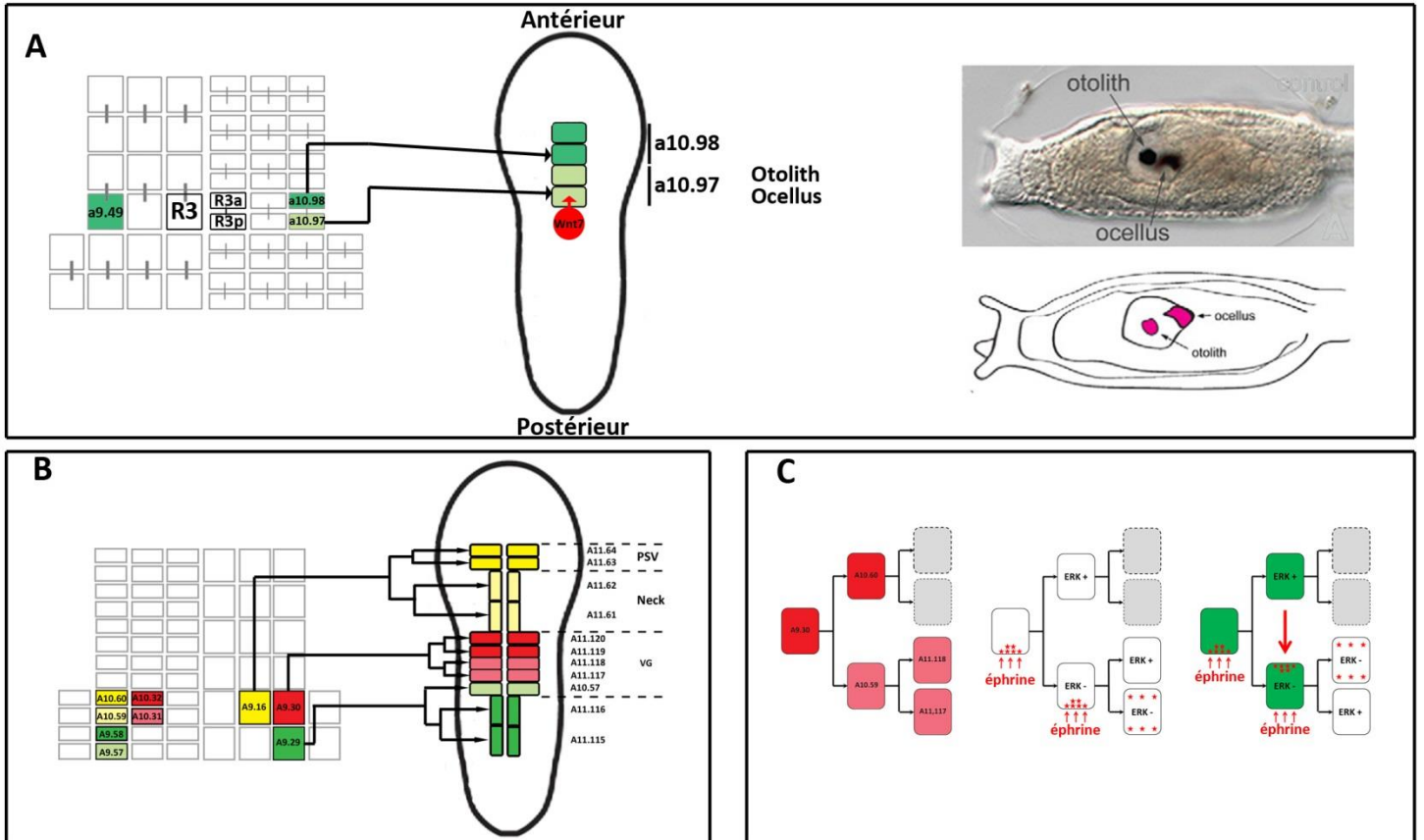


FIGURE 3.8 REGIONALISATION A/P INITIÉE AU STADE 12R.

- A)** Lignage des précurseurs pigmentaires. Les deux cellules pigmentaires proviennent des cellules latérales de la R3p. Après leur intercalation, au niveau dorsal du tube neural, la cellule pigmentaire la plus postérieure reçoit un signal WNT provenant des cellules immédiatement postérieures à elle-même (cercle rouge), qui induit sa différenciation en ocellus.
N.B. Les flèches n'indiquent qu'une cellule sur deux car elles illustrent les destins issus d'une seule cellule a9.49. La cellule indiquée pourrait être remplacée par sa voisine de même couleur, car la position finale des cellules n'est définie qu'aléatoirement au moment de la formation du tube neural.
- B)** Adapté de Stolfi et al., 2011
Vue schématique des lignages latéraux de la PSV et du cou (jaune), du ganglion viscéral (en rouge et vert clair) et des structures les plus antérieures de la moelle épinière (vert foncé).
- C)** Schéma du lignage des motoneurones illustrant l'activation différentielle d'ERK1/2. Les flèches rouges représentent la direction du signal éphrine. La coloration verte des cellules indiquent qu'elles ont été électroporées avec l'éphrinAb. La grande flèche rouge indique un signal éphrine provenant d'une cellule qui surexprime *épine-Ab*. Les étoiles rouges indiquent la position des protéines RasGAP.

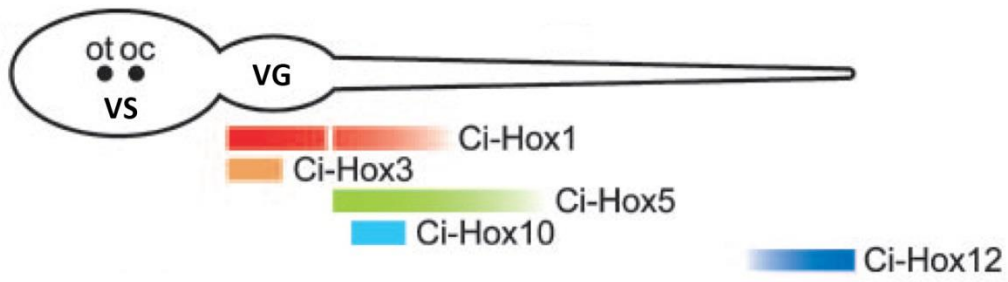


FIGURE 3.9 EXPRESSION DES GENES HOX LE LONG DE L'AXE A/P CHEZ *C.*

INTESTINALIS.

Emprunté à Ikuta et al., 2004

Représentation schématique des patrons d'expression des gènes *Hox*, dans le tube neural, le long de l'axe antéro-postérieur chez *C. intestinalis*.

Ot : otolith, oc : ocellus, VS : vésicule sensorielle, VG : ganglion cérébrale

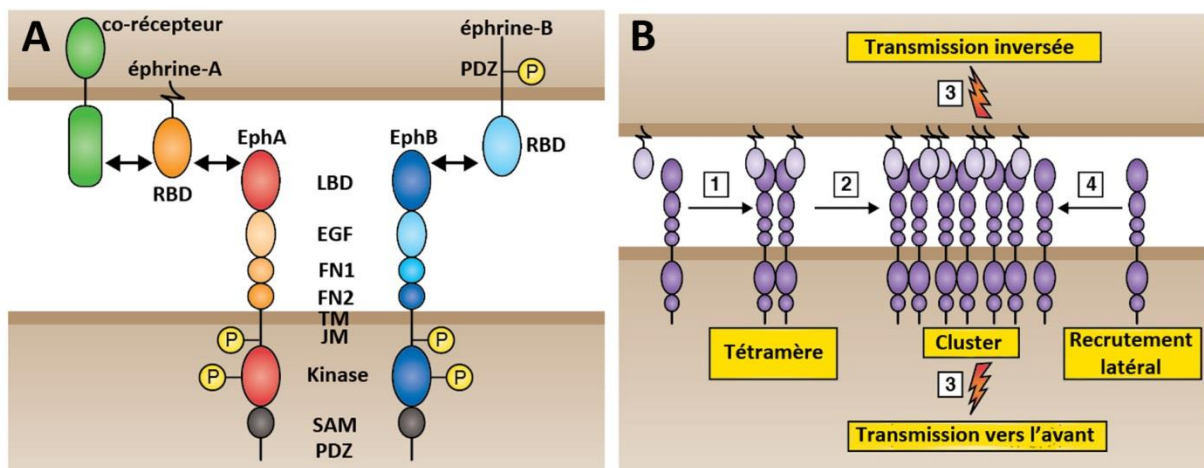


FIGURE 4.1 ORGANISATION ET ACTIVATION DE LA SIGNALISATION EPHRINE

Emprunté à Klein, 2012

A) Structure des ligands éphrine et des récepteurs Eph.

Les ligands éphrine possèdent un domaine RBD (RecBinding Domain) permettant la liaison avec les récepteurs Eph sur leurs domaines LBD (Ligand Binding Domain). Les récepteurs éphrine-A sont liés aux cellules par une ancre GPI et transmettent le signal par la liaison de co-récepteurs *en cis*. Les récepteurs éphrines-B possèdent un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique contenant un domaine PDZ. Les récepteurs EphA et EphB sont relativement similaires et sont classés en deux groupes selon leur affinité pour un des deux types de ligands éphrine. Leurs domaines extracellulaires comportent un domaine LBD, un domaine similaire à l'EGF (Epidermal Growth Factor), qui est riche en cystéine et deux domaines fibronectine de type III (FN1 et FN2). Ils possèdent un domaine transmembranaire (TM) et un domaine juxtamembranaire (JM) qui contient des sites de phosphorylation, contrôlant l'activation du récepteur. La queue cytoplasmique comporte un domaine kinase, un domaine SAM (Sterile Alpha Motif) et un motif PDZ.

B) Formation d'un cluster éphrine.

- 1) La reconnaissance éphrine/Eph induit la formation d'un tétramère composé de deux ligands éphrines et de deux récepteurs Eph.
- 2) La transmission du signal (vers l'avant ou inversée) nécessite la formation de clusters regroupant un grand nombre de récepteurs et de ligands.
- 3) Les clusters s'étendent par recrutement latéral (en cis) de récepteurs Eph.

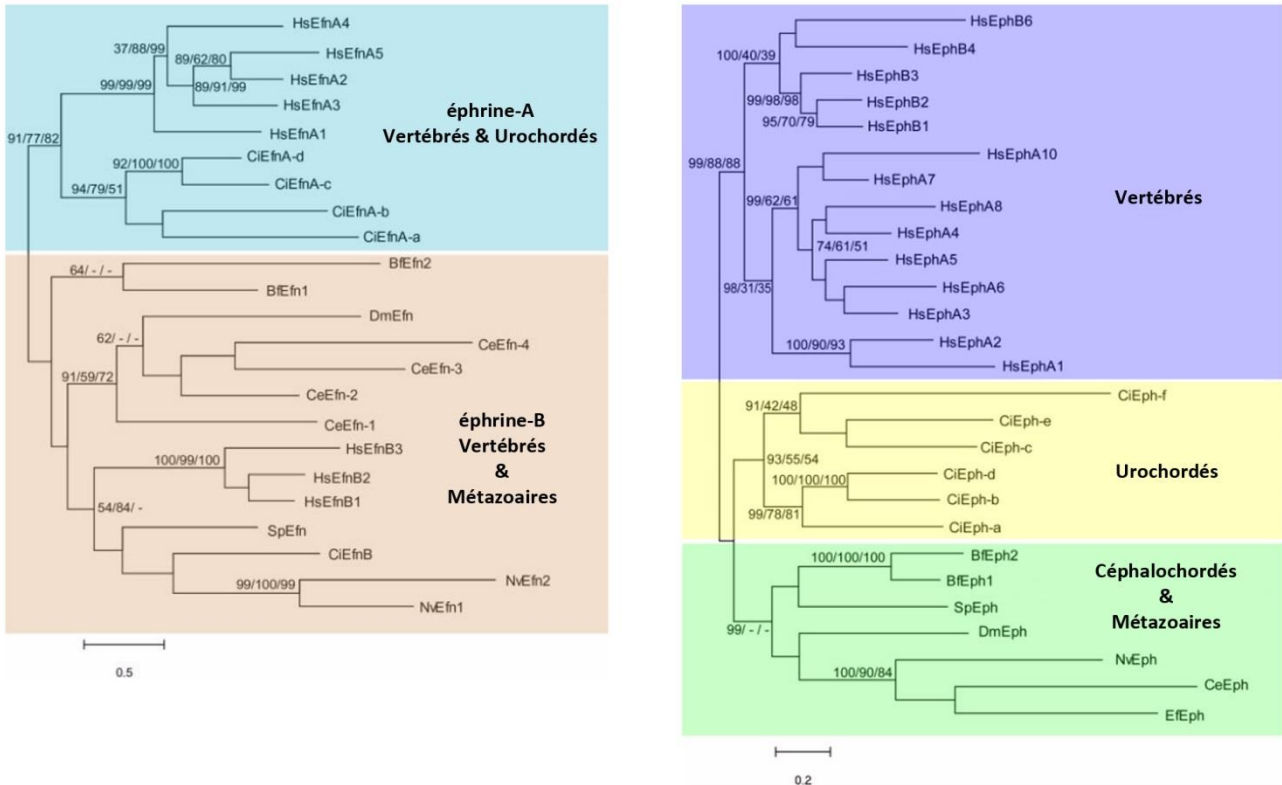


FIGURE 4.2 ÉTUDE PHYLOGENETIQUE DE LA SIGNALISATION EPHRINE

Emprunté à Mellott and Burke, 2008

A) Phylogénie des ligands éphrine

Deux groupes principaux peuvent être mis en évidence. Le premier groupe correspond aux ligands éphrine de type A, spécifiques des Vertébrés et des Urochordés. L'autre groupe correspond aux ligands de type B de toutes les espèces analysées. Il y a quatre ligands différents chez *C. intestinalis*.

B) Phylogénie des récepteurs Eph

Seul les récepteurs Eph des Vertébrés présentent une division en type A et B. Il y a six récepteurs chez *C. intestinalis*.

Les arbres phylogénétiques sont réalisés par la méthode du maximum de parcimonie. Bf : *Brachiostama floridae*, Ce : *Caenorhabditis elegans*, Ci : *Ciona intestinalis*, Dm : *Drosophila melanogaster*, Ef : *Ephydatia fluviatili*, Hs *Homo sapiens*, Nv : *Nemastela vectensis*, Sp : *Strongylocentrotus purpuratus*.

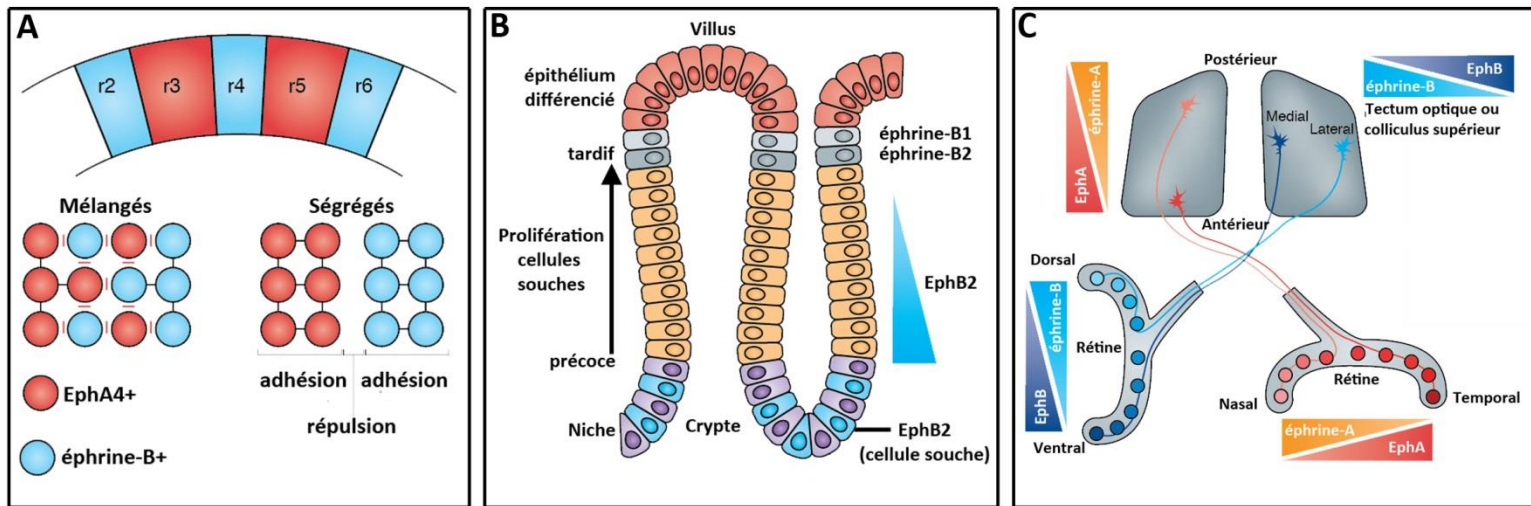


FIGURE 4.3 RÔLE DE LA SIGNALISATION EPHRINE DANS L'ORGANISATION DES TISSUS

Emprunté à Klein, 2012

A) Rôle dans la ségrégation des cellules lors de la formation des rhombomères

Vue schématique de l'organisation des rhombomères chez le poisson zèbre. Lors de la formation des rhombomères, des forces de répulsion (barres rouges) et d'attraction (barres noires) induisent la ségrégation des populations de cellules.

B) Rôle dans le positionnement des cellules intestinales

Les cellules souches de la crypte prolifèrent et progressent vers le villus. Le positionnement des cellules le long de l'axe villus-crypte est conditionné par le gradient d'expression d'EphB2.

C) Rôle dans la guidance des axones rétiniens dans le tectum optique

Les axones de la rétine projettent leurs axones vers le tectum optique. La position finale des terminaisons axonales est définie par les gradients d'éphrine/Eph. Par exemple, les neurones de la rétine expriment en gradient un récepteur EphA le long de l'axe temporal/nasal. En fonction du niveau d'expression d'EphA, les projections axonales seront plus ou moins fortement repoussées par le tectum optique antérieur, qui exprime plus fortement un ligand éphrine-A.

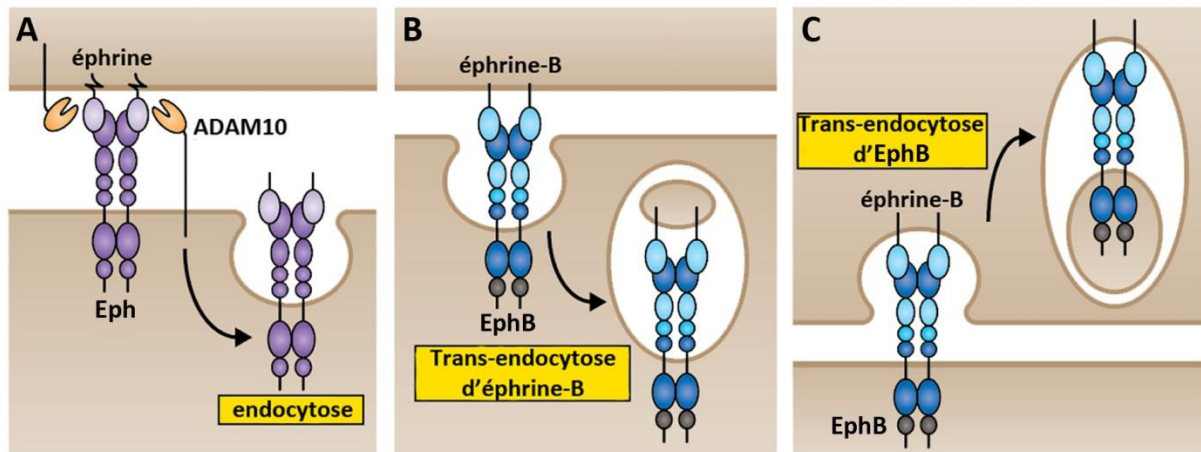


FIGURE 4.4 ARRET DU SIGNAL ET ENDOCYTOSE DE LA SIGNALISATION EPHRINE

Emprunté à Klein, 2012

A) Clivage des ligands éphrine par ADAM10

La métalloprotéase ADAM10 a été décrite comme pouvant s'associer aux récepteurs Eph ou aux ligands éphrine. La formation du complexe éphrine-Eph induit un changement de conformation permettant de dégager le site de clivage. Ainsi, la métalloprotéase ADAM10 ne peut cliver que les ligands éphrine impliqués dans un complexe éphrine-Eph.

B/C) Trans-endocytose de l'éphrine et d'Eph

Les ligands éphrine et les récepteurs Eph peuvent être trans-endocytés dans la cellule opposée. Cette trans-endocytose permet le transfert du complexe éphrine/Eph intact dans les endosomes, suggérant que le complexe éphrine/Eph continue à transmettre le signal à partir des endosomes.

Lignées	Origine	Activation d'ERK	Inhibition d'ERK
pRNS1-1	Cancer de la prostate humain		X
PC-3	Cancer de la prostate humain	X	X
MEF	Fibroblaste d'embryon de souris		X
BAEC	Endothelium de l'Aorte bovine		X
COS	Fibroblaste rénale de singe		X
NG-108	Lignée neuronale de souris		X
HEK293	Epithelium de rein humain		X
MDA	Cancer du sein humain	X	
NIH 3T3	Fibroblaste de souris		X
PC12	Lignée neuronal de rat	X	
HUVEC	Endothelium veineux du cordon ombilical humain		X

FIGURE 4.5 REGULATION DE LA CASCADE MEK/ERK PAR LA SIGNALISATION EPHRINE DANS DIVERS MODELES CELLULAIRES.

Ce tableau résume l'effet de la signalisation éphrine sur le contrôle de l'activité de la cascade MAPK/ERK dans différents modèles de lignées cellulaires.

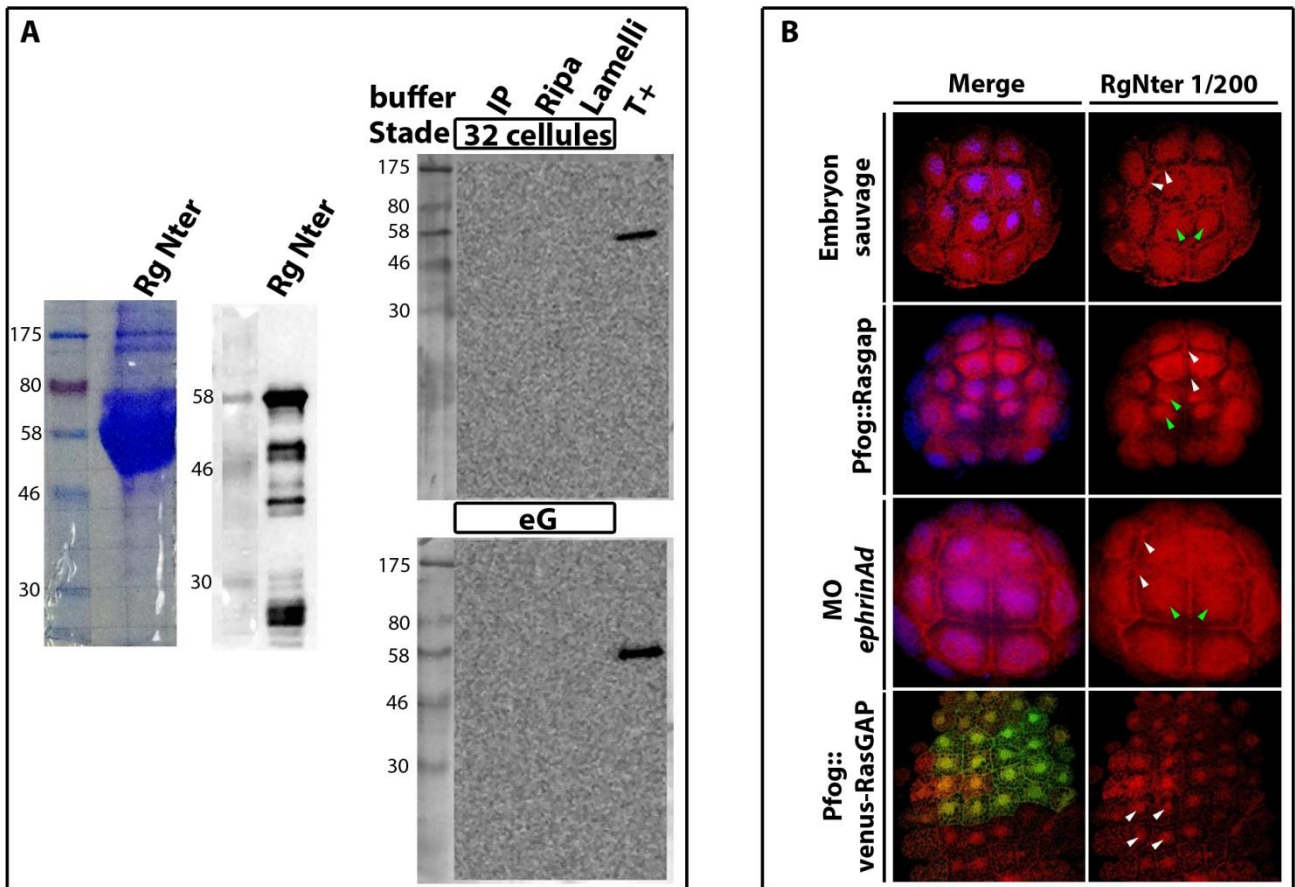


FIGURE I.1 IMMUNOLocalISATION DE RASGAP

A) Western blot réalisé avec l'anticorps RgNter au 1/2000

A gauche : 300 embryons ont été lysés avec différents tampons de lyse au stade 32-cellules ou en début de gastrulation (eG). Dans les deux cas, il n'y a aucun signal. La piste T+ correspond à la protéine RgNter purifiée et déposée en faible quantité.

A droite : L'anticorps reconnaît plusieurs bandes présentes dans l'extrait protéique utilisé pour immuniser les souris.

B) Immunomarquage réalisé avec l'anticorps RgNter au 1/200

Rouge : RgNter, bleu : dapi, vert : Venus

Les têtes de flèches blanches montrent un signal membranaire et les têtes de flèches vertes le signal autour des noyaux.

Pour Pfog ::Venus-RasGAP, les flèches blanches indiquent les cellules à comparer.

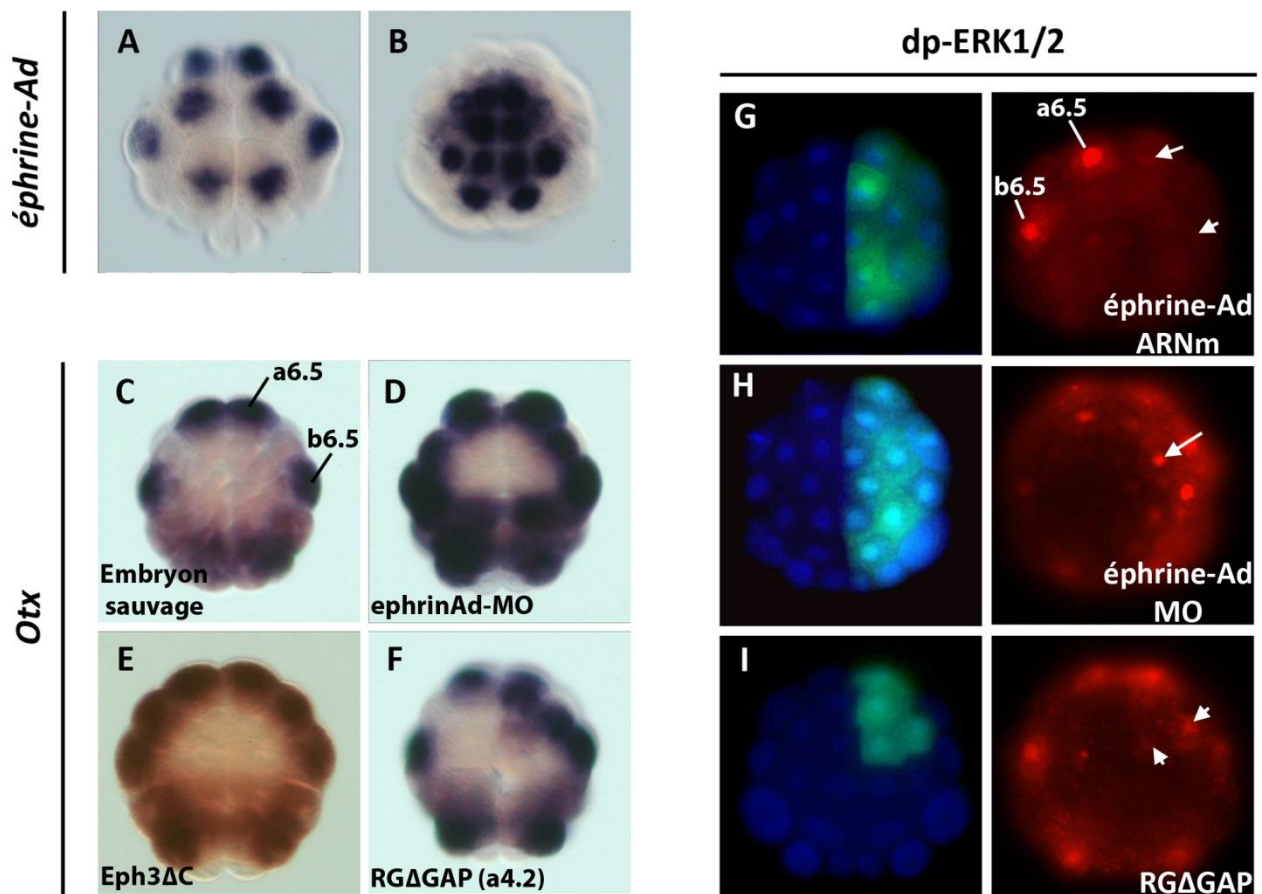


FIGURE II.1 LA DEREGULATION DE LA VOIE EPHRINE/RASGAP MODIFIE LE DESTIN DES CELLULES

A/B) Expression d'*éphrine-Ad*

Emprunté à Picco et al., 2007

Vue de l'hémisphère animal d'une hybridation in situ d'*éphrine-Ad* au stade 16-cellules (A) et 32-cellules (B).

C-F) La voie éphrine/RasGAP restreint l'expression d'*Otx*

Vue de l'hémisphère animal au stade 32-cellules d'une hybridation in situ d'*Otx*.

C : embryon sauvage ; D : embryon injecté avec le morpholino dirigé contre *éphrine-Ad* au stade œuf, E : embryon injecté avec le dominant négatif de *Eph3* au stade œuf, F : embryon injecté avec l'ARNm *RGΔGAP* au stade 2-cellules.

G-I) La voie éphrine/RasGAP inhibe l'activation d'ERK1/2

Vue de l'hémisphère animal au stade 32-cellules, **en rouge** : Immunomarquage dp-ERK1/, **en bleu** : noyaux marqués au Hoechst et **en vert** : traceur d'injection.

G : Injection de l'ARNm *éphrine-Ad* au stade deux cellules. H : Injection du morpholino dirigé contre *éphrine-Ad* au stade 2-cellules. I : Injection de l'ARNm *RGΔGAP* dans la cellule a4.2 (stade 8-cellules).

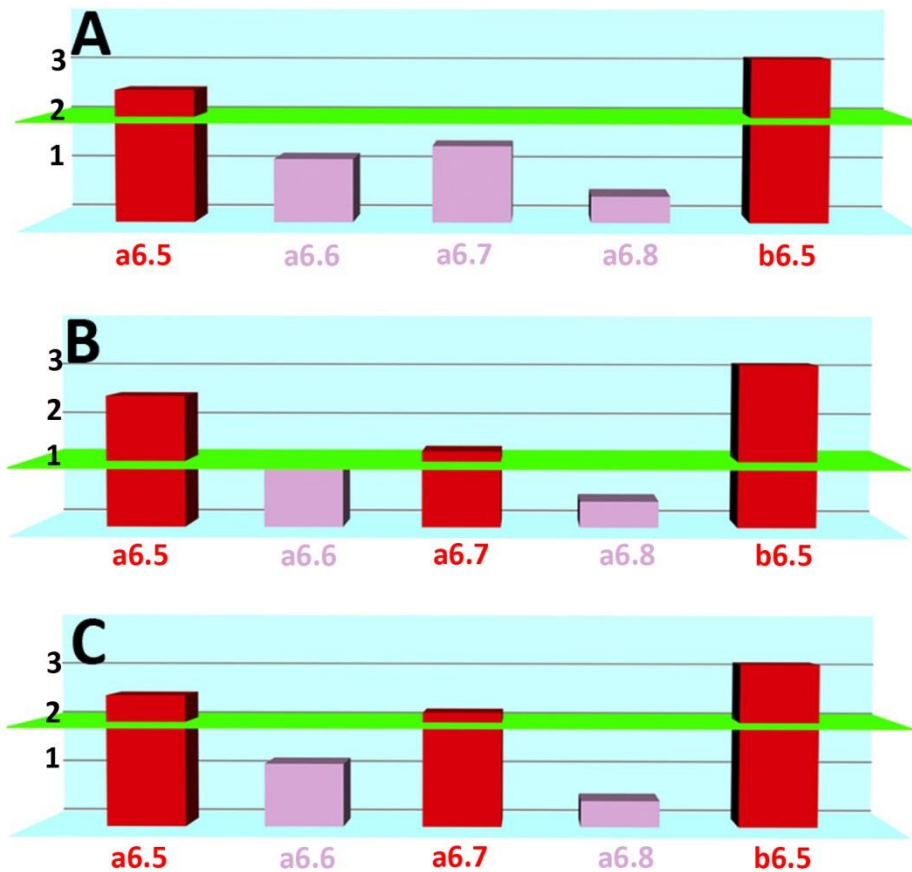


FIGURE II.2 GENERATION D'UN SEUIL ET REPONSE DES CELLULES

Ces graphiques représentent les surfaces de contact des cellules animales avec les cellules exprimant le ligand FGF9/16/20 (Lignée A). Les couleurs désignent le choix de destin effectué par la majorité des cellules (rose : épiderme ; rouge : neural)

A) Embryon sauvage

Adapté de Tassy et al., 2006

Un seuil d'activation du programme neural est défini par les voies FGF et éphrine. Seules les cellules au-dessus de ce seuil peuvent adopter le destin neural.

B) Hypothèse d'une modification du seuil dans un embryon injecté avec Eph3ΔC

La perte du signal éphrine induit une diminution du seuil. De ce fait, des cellules neurales excédentaires peuvent être induites. Cette hypothèse soutient que la voie de signalisation éphrine est directement impliquée dans le contrôle de l'activation du destin neural.

C) Hypothèse d'une modification des surfaces de contacts dans un embryon injecté avec Eph3ΔC

La perte du signal éphrine induit une modification des surfaces de contact entre les blastomères. De ce fait, des cellules neurales excédentaires peuvent être induites, malgré un seuil d'activation inchangé. Cette hypothèse soutient qu'une large surface de contact avec les cellules qui expriment FGF est suffisante à induire le destin neural.

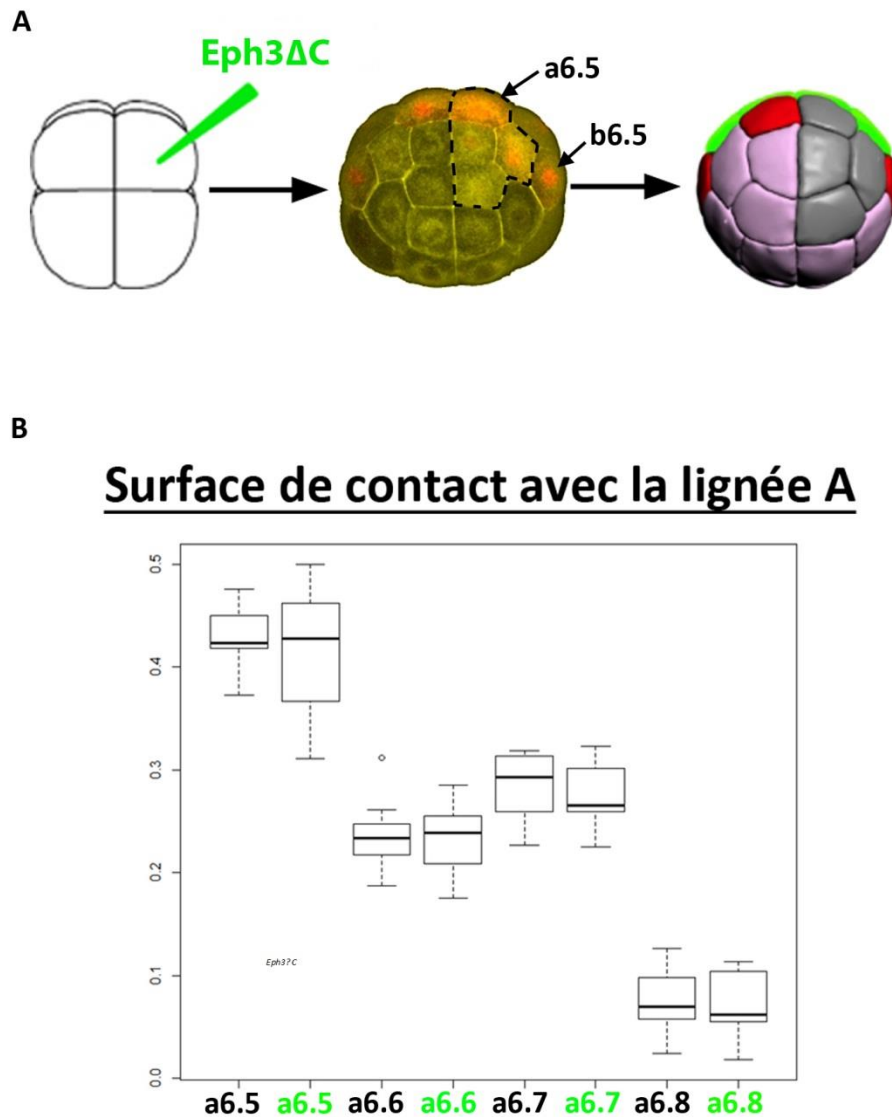


FIGURE II.3 LA DEREGULATION DE LA VOIE EPHRINE/RASGAP NE MODIFIE PAS LES CONTACTS ENTRE BLASTOMERES.

A) Etapes clés du protocole

Les embryons sont injectés au stade 8-cellules avec l'ARNm *Eph3ΔC* dans une des deux cellules a4.2. Les embryons sont fixés au stade 32-cellules. Un double marquage phalloïdine-dp-ERK1/2 permet de marquer les membranes pour la reconstruction 3D, d'identifier par l'augmentation du signal ERK1/2, les cellules injectées et de vérifier l'efficacité du dominant négatif. Les embryons sont ensuite reconstruits en 3D en utilisant le logiciel Avizo.

B) Comparaisons des surfaces de contact des cellules non-injectée/injectée

Les surfaces de contact de chaque blastomère ont été mesurées sur plusieurs embryons injectés (n=9). Les cellules non injectées sont indiquées en noir et les cellules injectées avec *Eph3ΔC* sont indiqués en vert. Les boîtes à moustaches représentent les valeurs de surfaces obtenues avec le logiciel 3D Virtual Embryo (Tassy et al., 2006). La comparaison des surfaces de contact entre le clone d'injection *Eph3ΔC* et les cellules sauvages ne révèle pas de différence significative (test des signes de Wilcoxon).

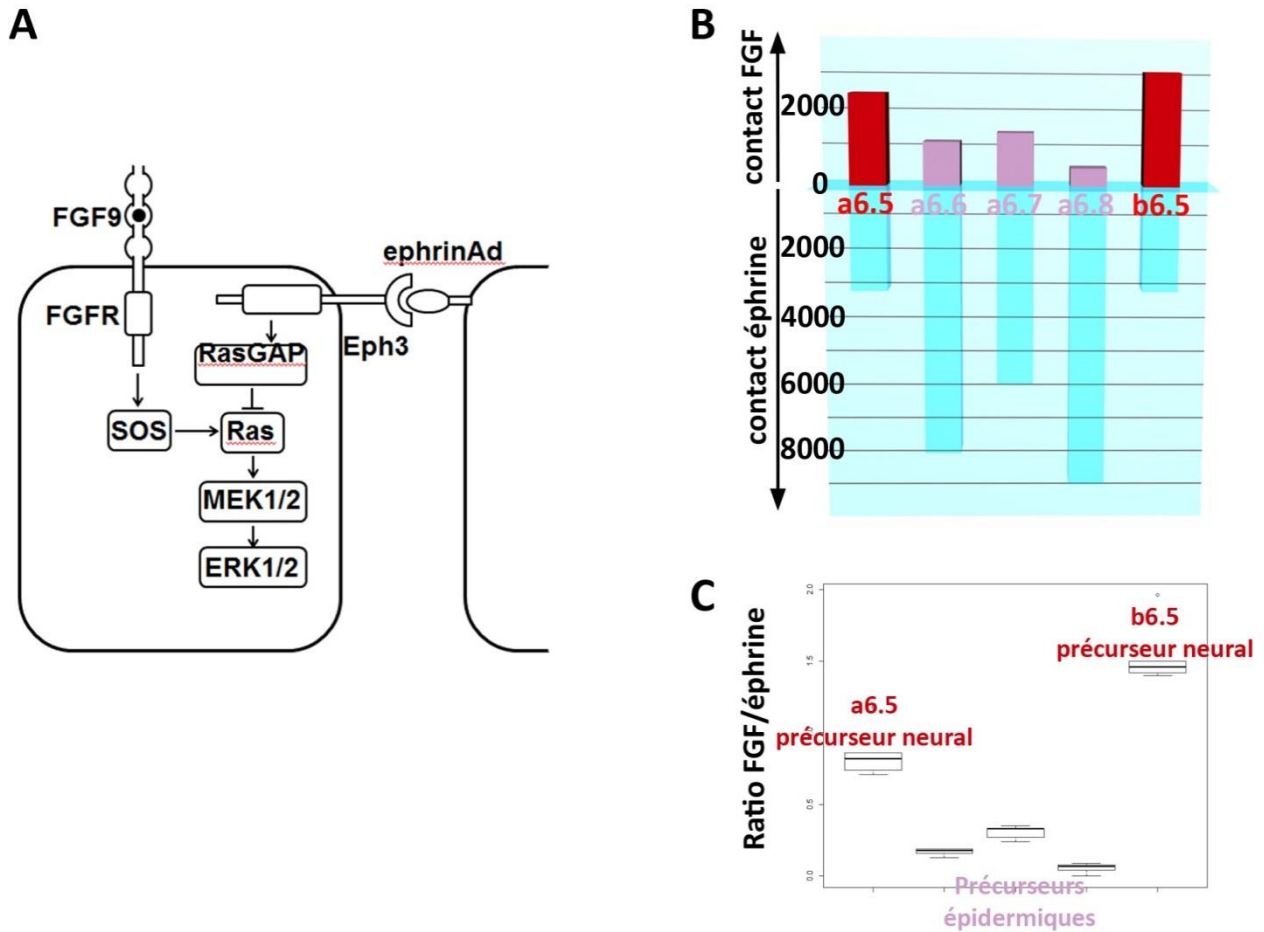


FIGURE II.4 MODELE PROPOSE : RAS INTEGRE LES SIGNAUX ENTRANTS

A) Intégration des signaux au niveau de Ras

Les signaux entrants transmis par les voies FGF et éphrine sont intégrés au niveau de Ras. En fonction de son état d'activation, Ras transmet le signal à la cascade MEK/ERK qui active le destin neural.

B) Mesure des surfaces de contact

Pour chaque blastomère, les surfaces de contact avec les cellules qui expriment FGF ou éphrine sont reportées. Le destin des cellules est reporté par un code couleur (rouge : neural ; rose : épiderme). L'ordonnée indique la surface de contact en μm^2 .

C) Ratio des surfaces FGF et éphrine

Les boîtes à moustaches indiquent la valeur du ratio des surfaces FGF/éphrine mesurées sur plusieurs embryons 3D au stade 32-cellules, publiés sur ANISEED (n=6).

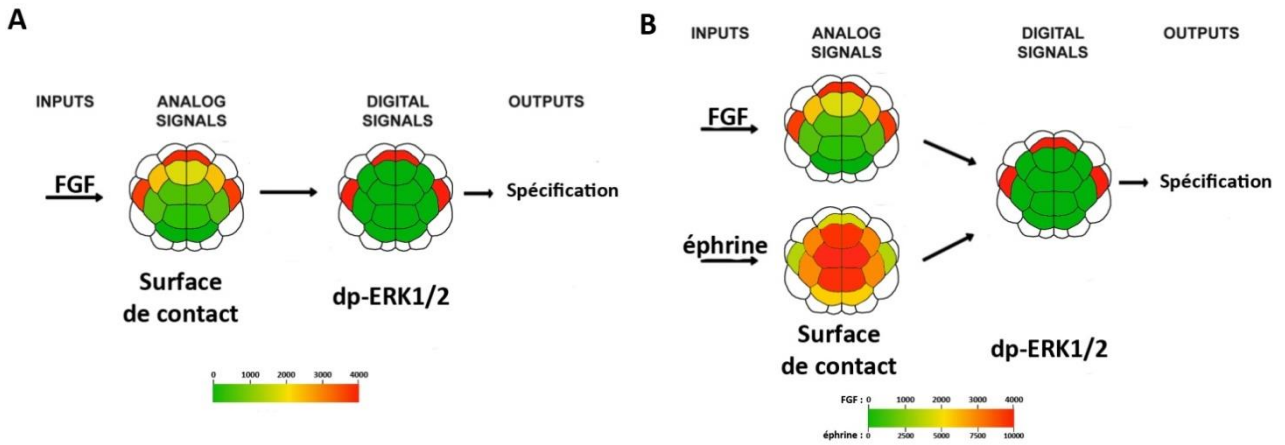


FIGURE II.5 FORMALISATION DU MODELE D'INDUCTION NEURALE CHEZ *C.*

INTESTINALIS

A) Modèle proposé par Tassy et al. 2006

L'activation de la cascade MEK/ERK est induite par le signal FGF dont l'intensité est évaluée par les surfaces de contact. Seules les cellules ayant de grandes surfaces de contact avec les cellules qui expriment le FGF adoptent le destin neural. Dans ce modèle, la conversion du signal repose uniquement sur l'ultrasensibilité intrinsèque des MAPK. Les surfaces de contact sont représentées par un code couleur reporté, qui récapitule l'intensité du signal (vert : faible surface de contact; rouge : grande surface de contact).

B) Modèle proposé à partir de nos résultats expérimentaux.

Les voies de signalisation éphrine et FGF transmettent aux cellules un signal antagoniste. Ces signaux permettent aux cellules d'engager leur différenciation. En fonction du ratio des deux signaux reçus, les cellules présentent ou non une activation de la protéine kinase ERK1/2.

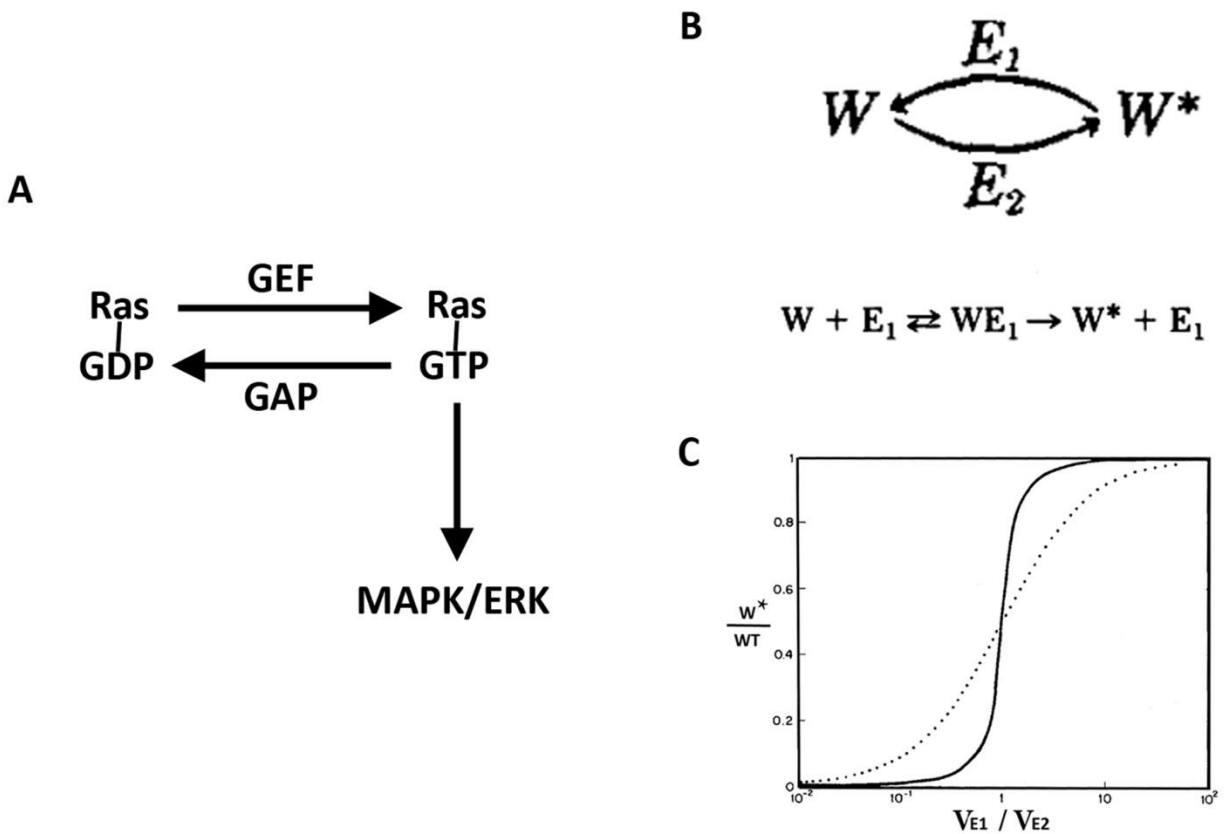


FIGURE II.6 CYCLE DE REGULATION DE RAS ET ULTRASENSIBILITE

A) Cycle de régulation de Ras

Ras est activé par des enzymes de la famille GEF, qui remplacent le groupement GDP par un groupement GTP. A l'inverse, les enzymes de la famille GAP inactivent Ras en liant Ras et en stimulant son activité GTPase.

B) Cycle de modification covalente de Goldbeter et Koshland

Cycle de modification covalente d'une protéine (W) par deux enzymes antagonistes (E1 et E2). Ce modèle correspond à la régulation des petites protéines G comme Ras, mais aussi aux phosphorylations et aux ubiquitinylation.

C) Cinétique de la modification de W en W*

En ordonnée : ratio des cinétiques des enzymes E1 et E2.

La ligne pointillée représente la cinétique d'une enzyme ayant une cinétique Michaelienne (hyperbolique). La ligne continue représente la cinétique (sigmoïdale) de modification de W décrite par Goldbeter et Koshland.

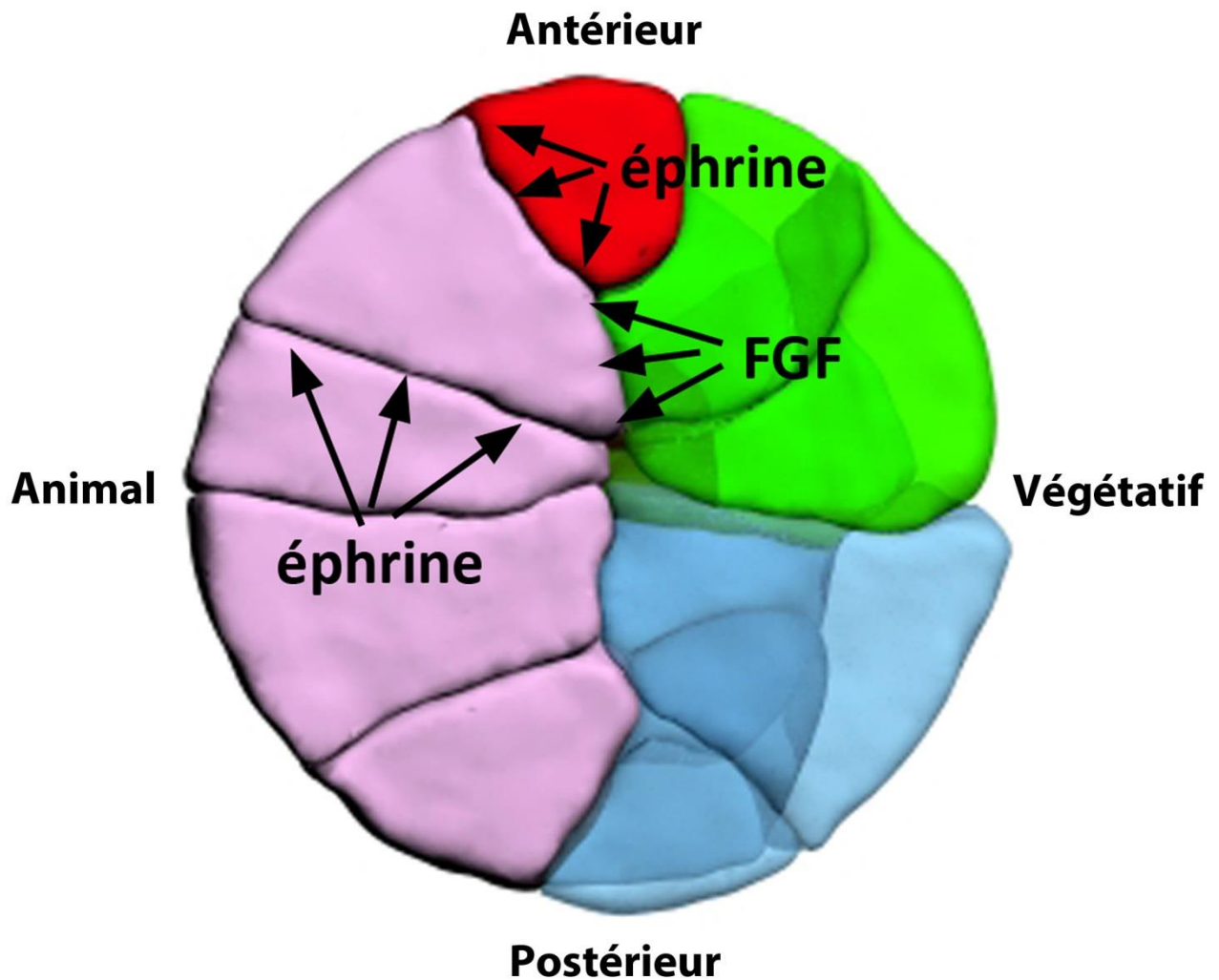


FIGURE II.7 SEPARATION PHYSIQUE DES VOIES FGF ET EPHRINE

Coupe sagittale d'un embryon 3D au stade 32-cellules. Les cellules de l'hémisphère animal sont en rouge (neural) et rose (épiderme). Les cellules de l'hémisphère végétatif sont en vert (expression du ligand FGF9/16/20) et bleu. Chaque cellule de l'hémisphère animal reçoit des signaux FGF et éphrine sur des membranes séparées. Dans cet exemple la cellule a6.7 reçoit le signal FGF sur sa membrane basale et le signal éphrine sur ses membranes latérales.

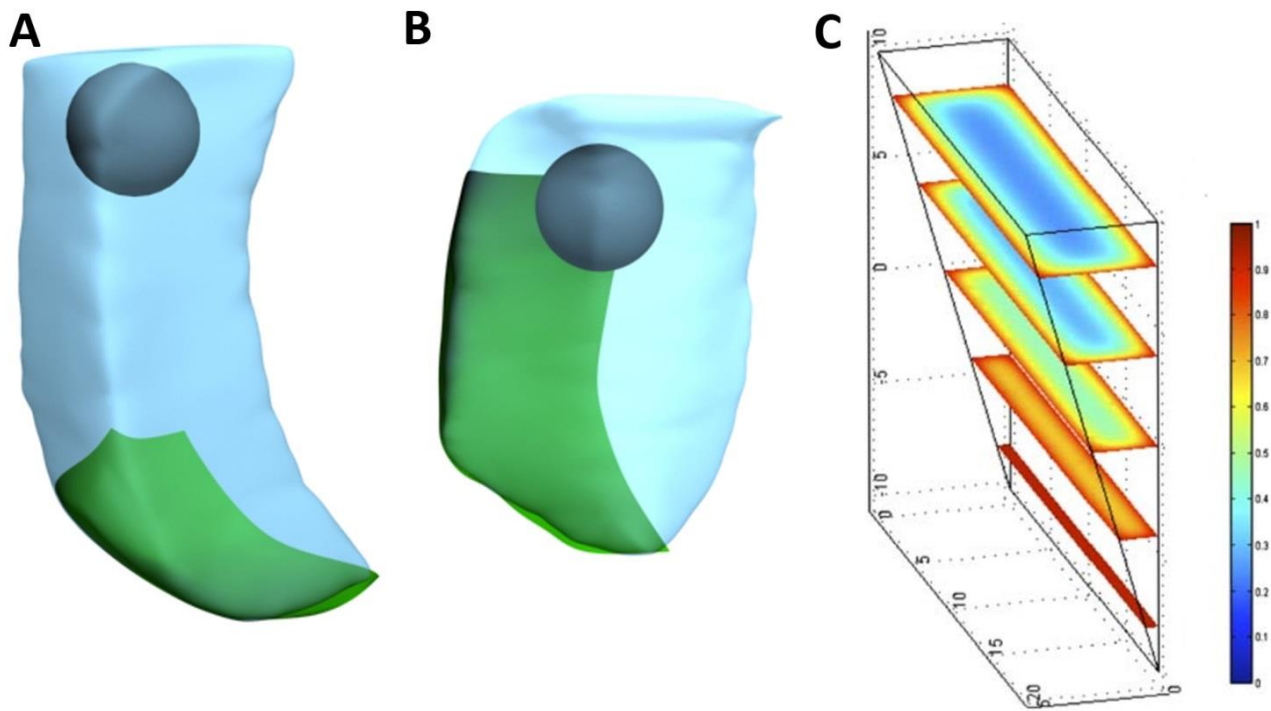


FIGURE II.8 RÔLE DE LA GEOMETRIE CELLULAIRE

A) Géométrie de la cellule a6.6

La cellule a6.6 possède de larges contacts avec les cellules qui expriment FGF (en vert) sur sa membrane basale. Toutes ses membranes latérales sont en contact avec des cellules qui expriment *éphrine-Ad*.

B) Géométrie de la cellule a6.7

La cellule a6.7 possède des contacts avec des cellules qui expriment FGF (en vert) sur une large surface latérale. Il apparaît que la distance membrane (induite par FGF)-noyau est inférieure à celle de la cellule a6.6.

C) Transmission du signal de la membrane au cytoplasme.

Emprunté à Meyers et al., 2006

Résolution mathématique de l'évolution de la phosphorylation en fonction de la position dans la cellule. Le taux de phosphorylation est important lorsqu'il est proche des membranes, et diminue vers l'intérieur de la cellule.

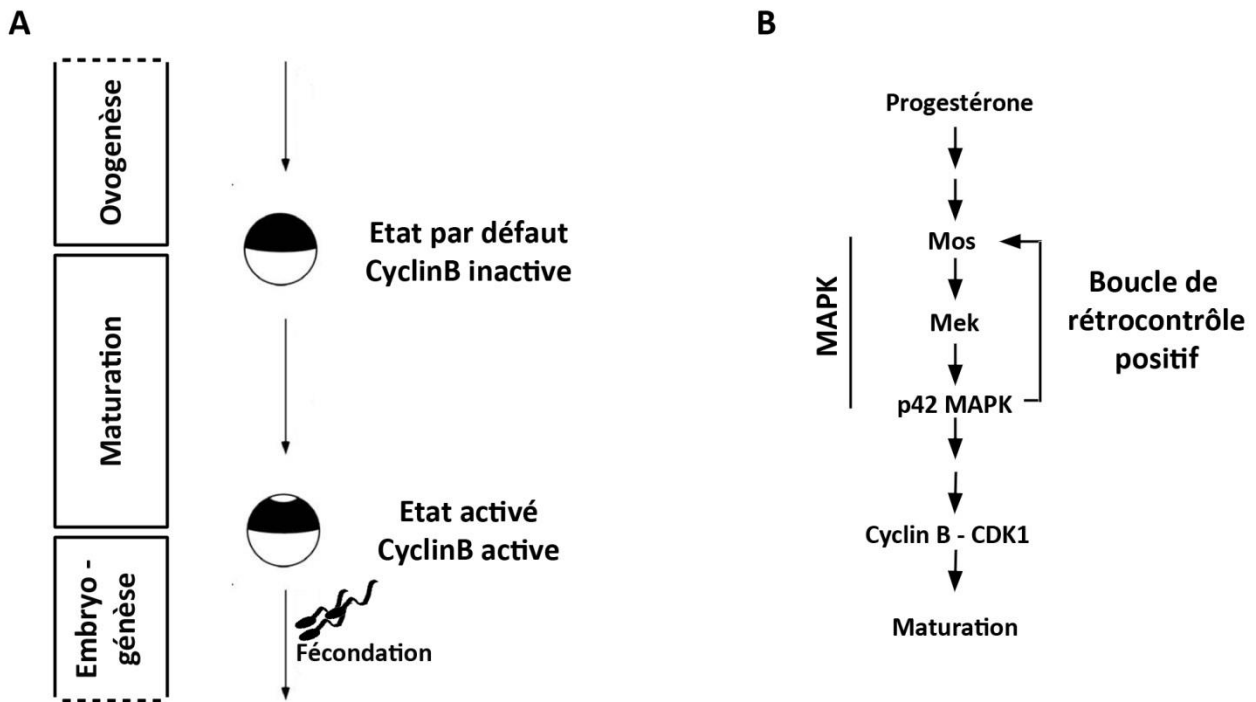


FIGURE II.9 MATURATION DES OVOCYTES DE XENOPE

Adapté de Ferrell et al., 2009

- A) La maturation des ovocytes est une étape indispensable, permettant l'activation de la cycline B et la progression du cycle cellulaire. Il s'agit d'une étape indispensable pour rendre l'ovocyte fécondable.
- B) La maturation de l'ovocyte est induite par la progestérone, qui active la cascade MEK/ERK. L'activation de p42 MAPK (ERK) induit l'activation de la cycline B/CDK1, qui induit la maturation des ovocytes.

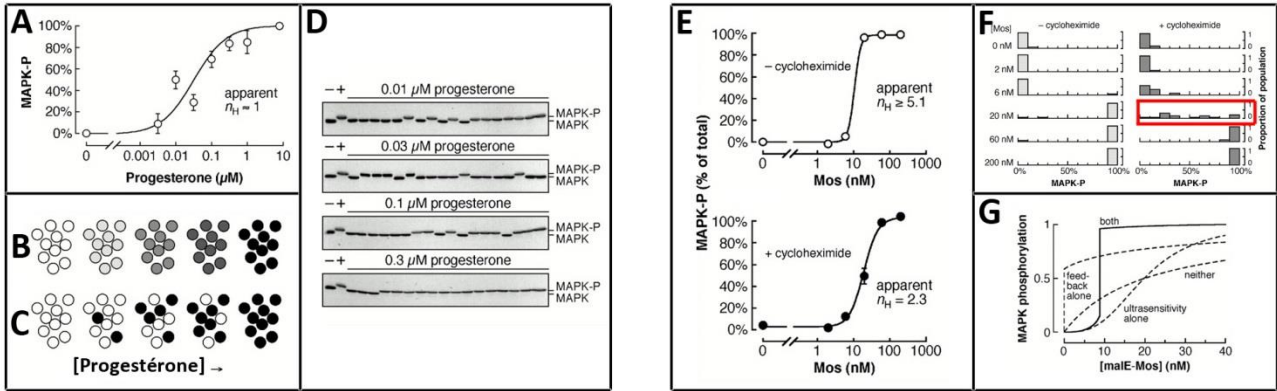


FIGURE II.10 BASE BIOCHIMIQUE DE LA MATURATION DES OVOCYTES DE XENOPE

Emprunté à Ferrell and Machleder, 1998

- A)** Réponse des ovocytes suite au traitement progestérone. Chaque point représente une mesure contenant de 11 à 39 ovocytes. L'augmentation de la concentration en progestérone induit une augmentation graduée de la phosphorylation d'ERK. Le calcul de nombre de Hill (n_H) indique que cette cinétique n'est pas ultrasensible.
- B/C)** L'activation graduée d'ERK peut s'expliquer par B) une augmentation linéaire de la phosphorylation d'ERK dépendante de la concentration en progestérone, ou par C) une réponse binaire des ovocytes.
- D)** Pour identifier quelle hypothèse retenir, les auteurs ont analysé l'activation d'ERK par western-blot sur 1 ovocyte. Les résultats montrent que les ovocytes répondent de façon binaire à l'augmentation de la concentration de progestérone (similaire à la deuxième hypothèse (C)).
- E)** Les ovocytes sont injectés avec différentes concentrations de *malE-Mos*, qui est un activateur direct de MEK. L'activation d'ERK est ultrasensible avec $n_H=5.1$ alors que, la même expérience, réalisée sur des ovocytes préalablement traités avec un inhibiteur de la traduction (cycloheximide) induit une réponse ultrasensible moins forte ($n_H=2.3$).
- F)** Ces graphiques normalisés représentent l'activation d'ERK dans des ovocytes analysés individuellement par western-blot, suite à l'injection de différentes concentrations de *Mos* et en présence ou non de cycloheximide. Sans cycloheximide, les ovocytes présentent tous une activation maximale d'ERK à partir de 20nM de *Mos* injecté. En présence de cycloheximide, la concentration de 20nM de *Mos* produit une réponse graduée d'ERK (rectangle rouge). Lors de l'injection d'une concentration inférieure ou supérieure, les ovocytes traités au cycloheximide répondent comme les ovocytes non traités, c'est-à-dire de façon binaire.
- G)** La résolution mathématique des équations décrivant les différentes cinétiques d'activation d'ERK en fonction de la concentration de *Mos*.

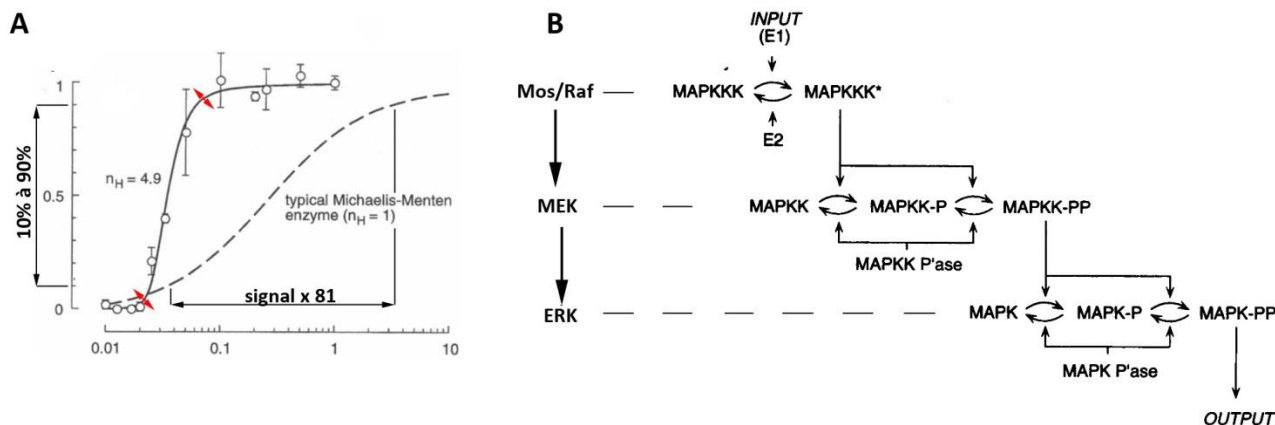


FIGURE II.11 ULTRASENSIBILITE DE LA CASCADE MEK/ERK.

Emprunté à Huang and Ferrell, 1996

A) Mesure de la cinétique d'activation d'ERK dans les extraits cytoplasmiques de xénope.

Une enzyme Michaelienne (pointillé) répond de façon graduée à l'augmentation du signal. Elle nécessite une augmentation du signal de 81 fois, pour passer d'un état d'activation de 10% des protéines disponibles à 90%. Si la réponse est ultrasensible (ligne continue, séparée en 3 tiers par un trait rouge), alors la cinétique d'activation est plus rapide et possède des propriétés différentes d'une cinétique Michaelienne. Quand le signal est faible (premier tiers), une réponse ultrasensible présente une réponse à une induction plus faible qu'une cinétique Michaelienne. Cela permet la filtration des signaux parasites. Une fois le niveau seuil dépassé (deuxième tiers), la cinétique d'activation est plus rapide que celle d'une enzyme Michaelienne. Le troisième tiers correspond à une étape de plateau puisque le niveau maximal d'activation est atteint.

B) Schéma de la cascade MEK/ERK.

La cascade MEK/ERK est activée par la MAPKKK (Mos ou Raf) par une double phosphorylation non processive sur MEK, suivie d'une double phosphorylation non processive sur ERK par la forme dpMEK. A chaque étape de la cascade, des phosphatases peuvent inactiver Raf, MEK ou ERK. Ainsi, chaque étage de la cascade est constituée d'une protéine qui est régulée par deux enzymes antagonistes. Cette organisation permet, si les paramètres cinétiques sont réunis (cela dépend des concentrations de Raf, de MEK, de ERK et des phosphatases) d'augmenter l'ultrasensibilité générée par la double phosphorylation non-processive.

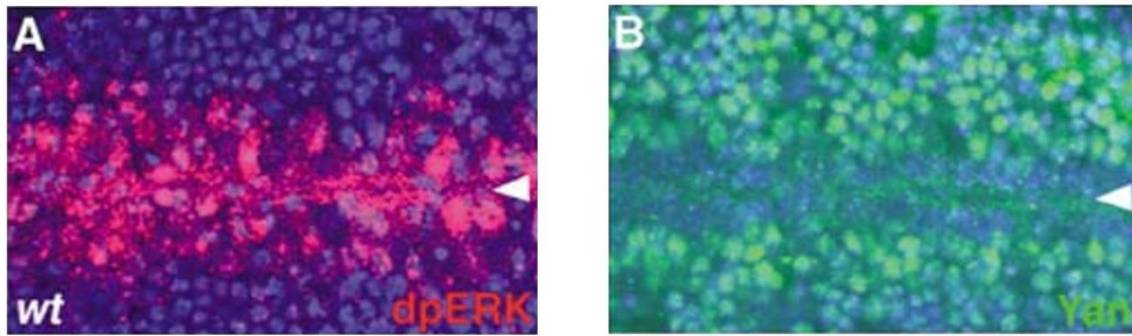


FIGURE II.12 CONTROLE DE LA DEGRADATION DE YAN CHEZ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Emprunté à Melen et al., 2005

A) Activation d'Erk autour de l'expression de spitz

Embryons sauvages au stade 10. L'activation d'Erk présente une activation graduée en s'éloignant de la rangée centrale. La forme dpERK est recherchée par immunomarquage (rouge). Les noyaux sont marqués par le dapi (bleu). La rangée centrale est marquée par la tête de flèche blanche.

B) Dégradation de Yan

Le patron d'expression de Yan (vert) montre que Yan est absent des rangées proches de la rangée centrale. Même nomenclature que l'image A.

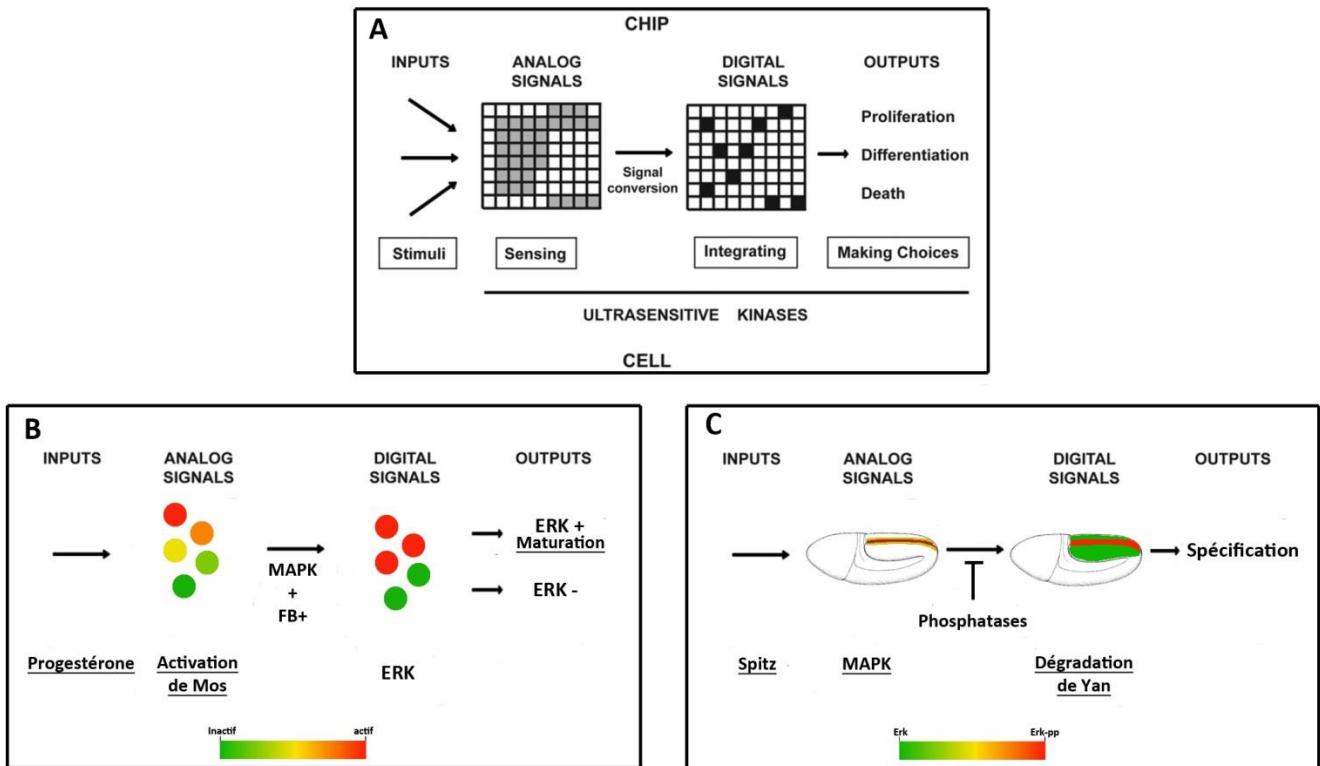


FIGURE II.13 FORMALISATION DES DIFFERENTS MODELES PRESENTES

- A) Emprunté à López, 2010
Modèle digital des décisions cellulaires. Différents stimuli induisent des signaux analogiques qui sont perçus par les MAPK, puis convertis en une réponse digitale. La réponse digitale permet de prendre une décision entre différents programmes biologiques.
- B) Lors de la maturation des ovocytes chez le xénope, la progestérone induit une activation graduée de Mos en fonction de sa concentration. L'action combinée des MAPK et d'une boucle de rétrocontrôle positive génère la conversion du signal analogique en une réponse binaire.
- C) La différenciation de l'ectoderme ventral chez *Drosophila melanogaster* implique l'activation des MAPK. L'antagonisme MAPK/phosphatase génère une conversion du signal analogique en une réponse digitale, qui établit un seuil de dégradation de Yan autour de la zone d'expression de Spitz.

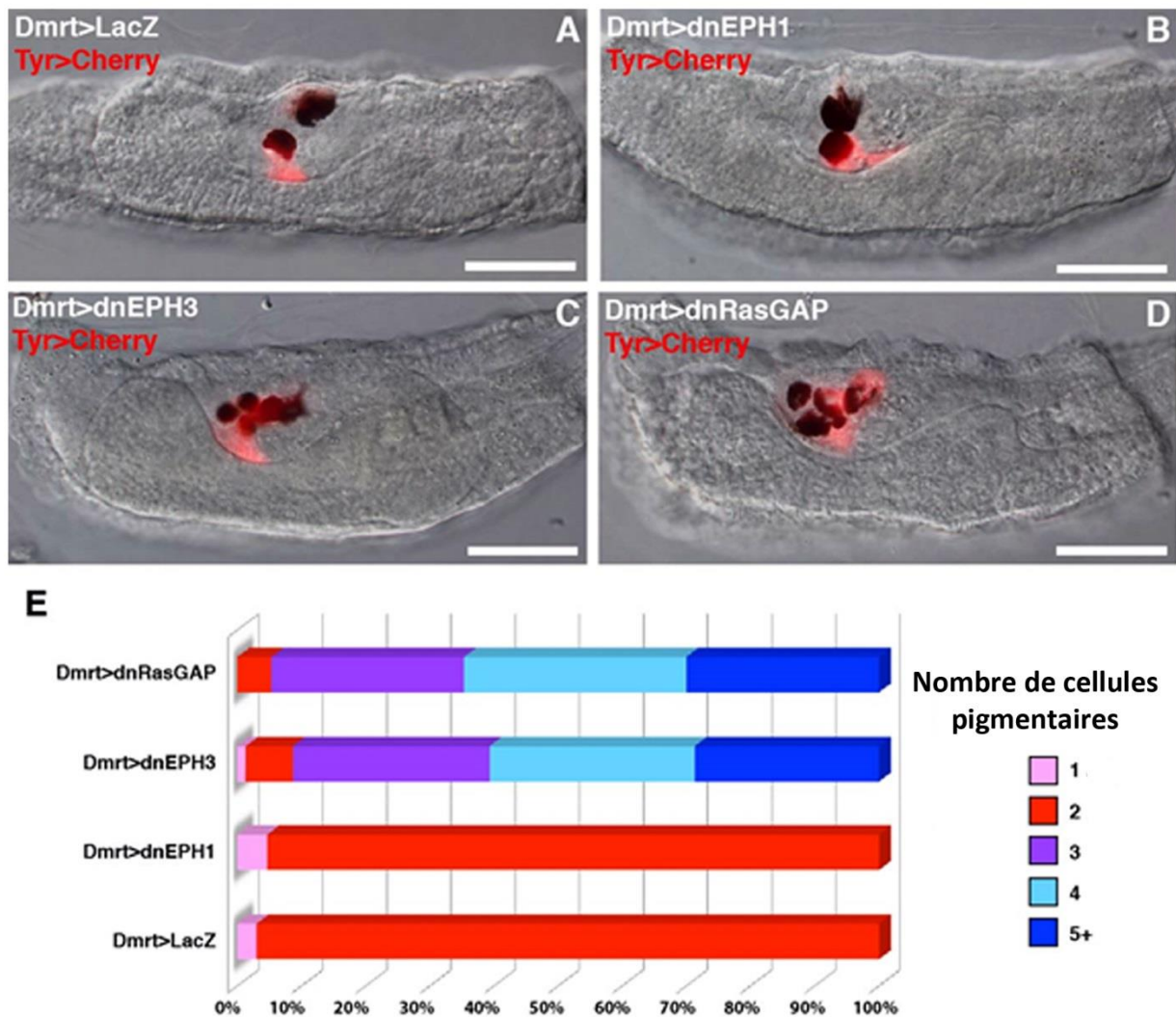


FIGURE III.1 L'INHIBITION DE LA VOIE DE SIGNALISATION EPHRINE/EPH3/RASGAP INDUIT DES CELLULES PIGMENTAIRES EXCEDENTAIRES.

A-D) Inhibition du signal éphrine/Eph3/RasGAP

Les embryons sont électroporés avec différentes constructions sous le contrôle du promoteur DMRT (exprimé dans le lignage « a » de la plaque neurale (R3 à R6 au stade 6R)). *DMRT>LacZ* est une construction témoin. Les autres constructions expriment les formes dominantes-négatives d'*Eph3* (*dnEPH3* correspondant à *Eph3ΔC*), d'*Eph1* (*dnEPH1* correspondant à *Eph1ΔC*) et de *RasGAP* (*dnRasGAP* correspondant à *RGΔGAP*). *Tyr>mCherry* induit l'expression de la protéine fluorescente dans les cellules du lignage pigmentaire à partir du stade 6R. Il s'agit d'un témoin supplémentaire permettant de contrôler que les pigments observés correspondent bien à des cellules pigmentaires excédentaires.

E) Quantification du nombre de cellules pigmentaires

Le nombre de cellules pigmentaires a été compté pour chaque condition expérimentale. Les statistiques sont reportées sur les histogrammes. Seules les inhibitions d'Eph3 et de RasGAP induisent des cellules pigmentaires excédentaires, avec dans plus de 30% des cas, un minimum de cinq cellules pigmentaires induites.

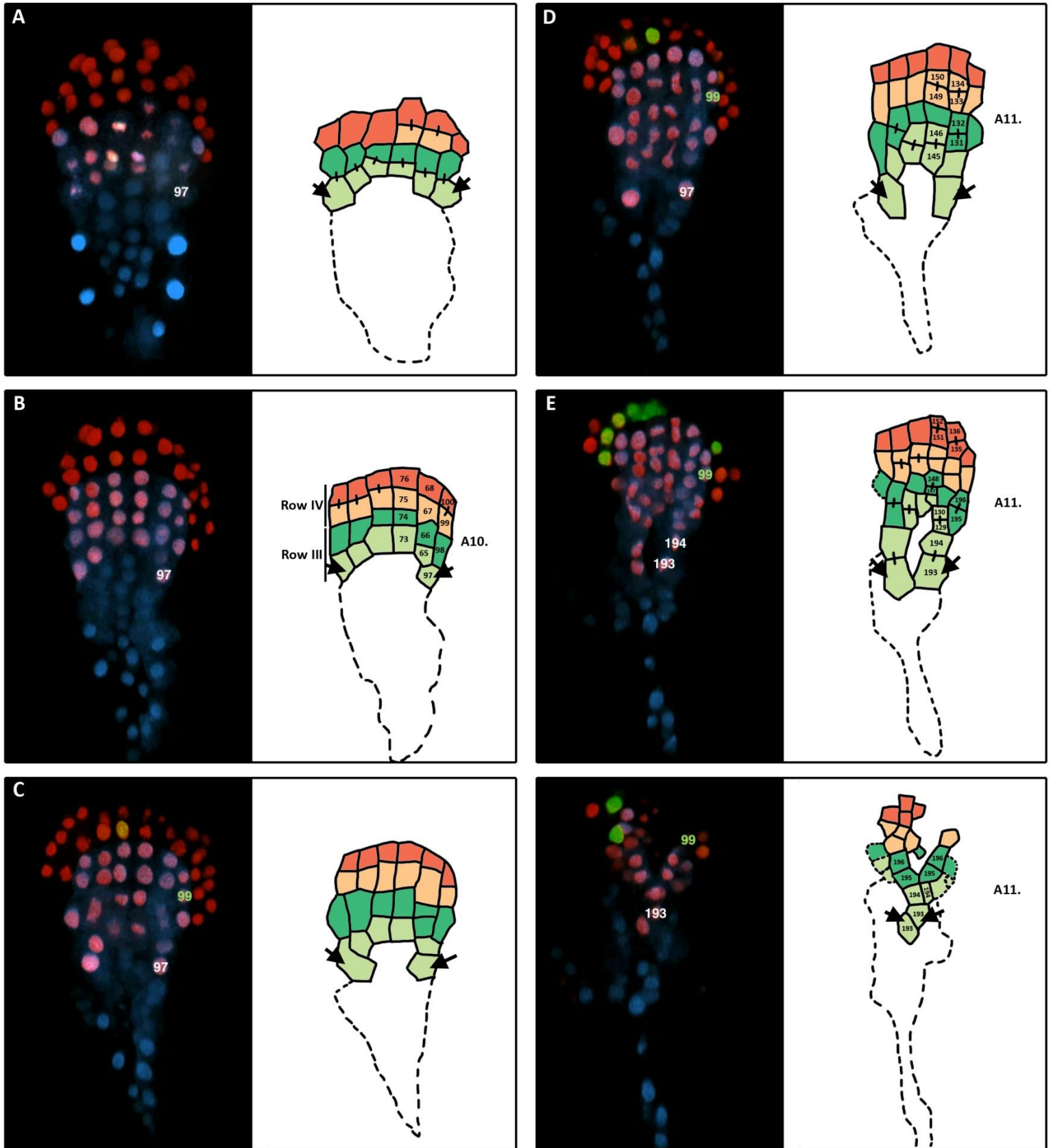


FIGURE III.2 EXTRAIT D'UN FILM SUIVANT LA FORMATION DU LIGNAGE PIGMENTAIRE.

Vue de la plaque neurale au cours de divisions 6R→12R. Les cellules pigmentaires sont indiquées par des flèches noires. Les lignages sont indiqués directement sur les cellules.

A) La R3 a achevé sa division en R3p (vert clair) et R3a (vert foncé). Les cellules de la R4 commencent à se diviser en R4p (orange clair) et R4a (orange foncé). **B)** La R4 a achevé de se diviser et la plaque neurale à 12R

est complètement formée. Il faut noter que les cellules a10.97 commencent à adopter une position plus postérieure que les autres cellules de la R3. **C-D)** La position postérieure des cellules a10.97 s'accroît. Les cellules centrales de la plaque neurale débutent un nouveau cycle cellulaire. **E)** Les cellules de la plaque neurale continuent de se diviser, avec notamment, la division des précurseurs pigmentaires a10.97 en a10.193 (en position postérieure) et a10.194 (en position antérieure). **F)** Les précurseurs pigmentaires s'intercalent aléatoirement en position dorsale du tube neural.

Les embryons ont été électroporés avec plusieurs constructions. *ZicL>H2B::Kaede* (en bleu), *DMRT>H2B::mCherry* en rouge et une troisième construction non publiée de Philip Albitua, spécifique du lignage de la R4p (en vert). Les patrons d'expression de ces différents gènes permettent de différencier les différents domaines de la plaque neurale. *ZicL* est exprimé dans les R1 à 4 alors que, *DMRT* est exprimé dans les R3 à 6. Les rangées présentant uniquement un marquage bleu sont les R1 et R2. Les rangées exprimant un marquage bleu et rouge sont les rangées R3 et R4. Après le dernier cycle cellulaire, la rangée R4a est bordée par le marquage vert. Les rangées exprimant uniquement le marquage rouge sont les rangées R5 et R6.

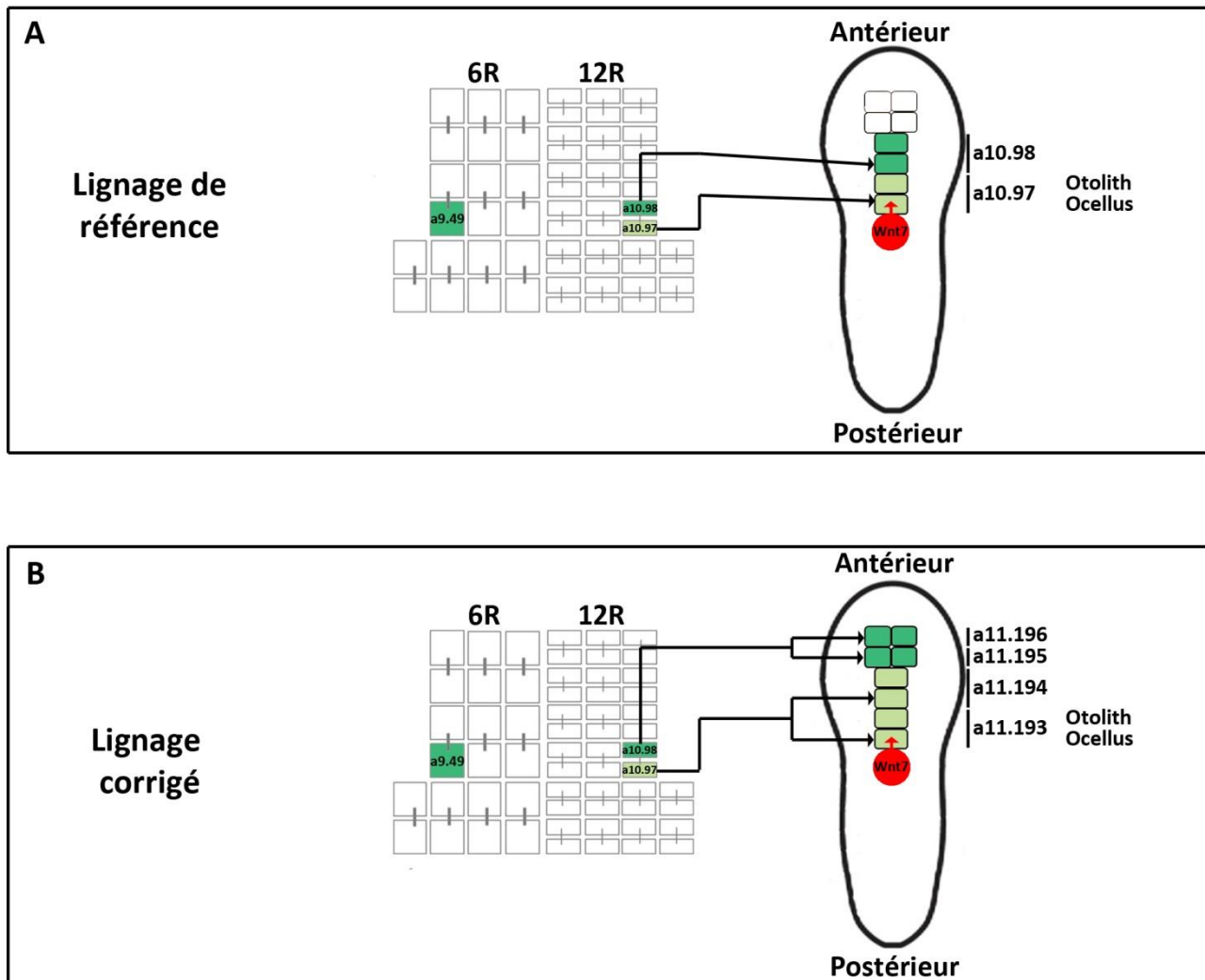


FIGURE III.3 CORRECTION DU LIGNAGE PIGMENTAIRE

A) Lignage pigmentaire de référence

Ce lignage, datant de 1987, est basé sur le suivi des cellules par l'injection d'un traceur dans un précurseur précoce du lignage pigmentaire. Les cellules pigmentaires sont issues du lignage neural « a », plus exactement des cellules latérales de la R3 au stade plaque neurale 6R (cellule a9.49). Lors de la division de la plaque neurale 6R->12R, seules les deux cellules les plus postérieures conservent la capacité à devenir des cellules pigmentaires.

B) Lignage pigmentaire corrigé

Basé sur les observations de Philip Albitua, le lignage pigmentaire est toujours issu du précurseur a9.49. Mais les cellules de ce lignage vont effectuer, non pas un, mais deux cycles cellulaires. A chaque division, seules les cellules les plus postérieures conservent leur capacité à adopter le destin pigmentaire.

N.B. Les flèches n'indiquent qu'une cellule sur deux car elles illustrent les destins issus d'une seule cellule a9.49. La cellule indiquée pourrait être remplacée par sa voisine de même couleur, car la position finale des cellules n'est définie qu'aléatoirement au moment de la formation du tube neural.

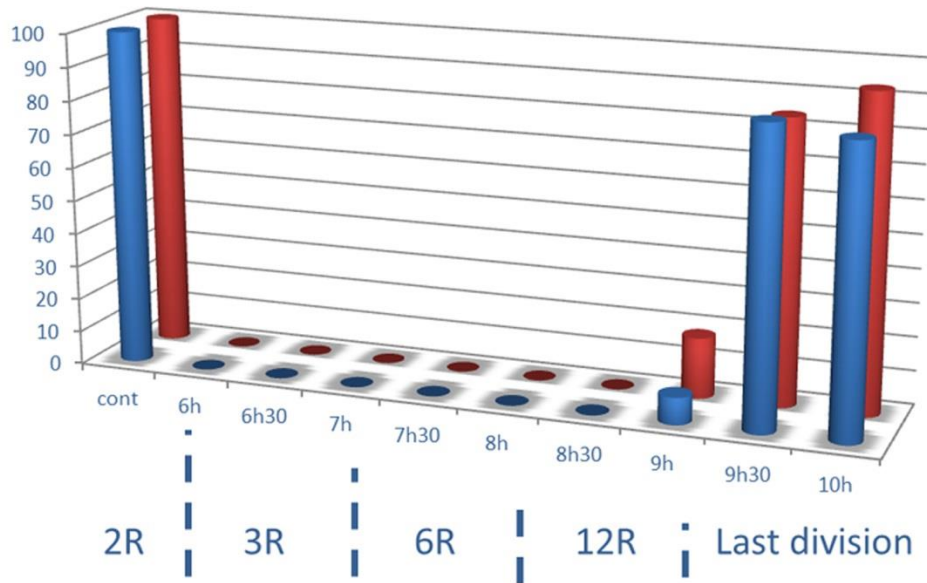


FIGURE III.4 PERIODE D'ACTION DE LA CASCADE MEK/ERK

Les histogrammes représentent le pourcentage d'embryons présentant un phénotype sauvage (c'est-à-dire deux cellules pigmentaires) suite à un traitement UO126 commencé, au temps indiqué en abscisse. Les temps de développement après fécondation sont associés aux stades de développement de la plaque neurale. Les deux couleurs d'histogrammes indiquent les résultats de deux expériences indépendantes.

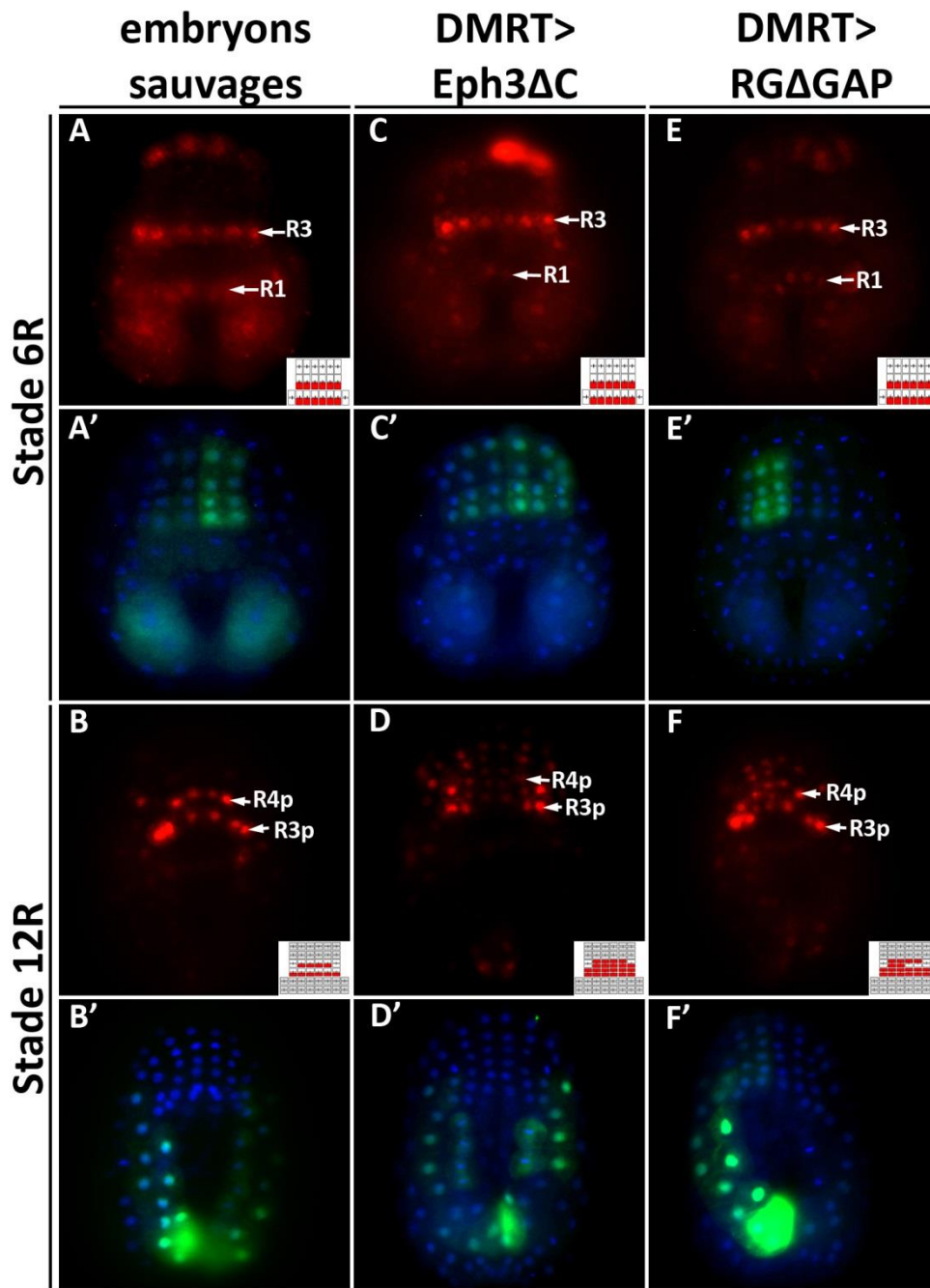


FIGURE III.5 LE PATRON D'ACTIVATION D'ERK1/2 EST CONTROLÉ PAR LA SIGNALISATION EPHRINE

A/C/E) Immunomarquage dpERK1/2 au stade 6R

Embryons électroporés ou coélectroporés avec *DMRT>GFP* afin de faciliter l'identification des lignages pigmentaires. La R3 est la rangée la plus postérieure exprimant la GFP.

B/D/F) Immunomarquage dpERK1/2 au stade 12R

Embryons électroporés ou coélectroporés avec *Msx>GFP* afin de faciliter l'identification des lignages pigmentaires. Le promoteur *Msx* induit la GFP dans les cellules voisines des précurseurs pigmentaires.

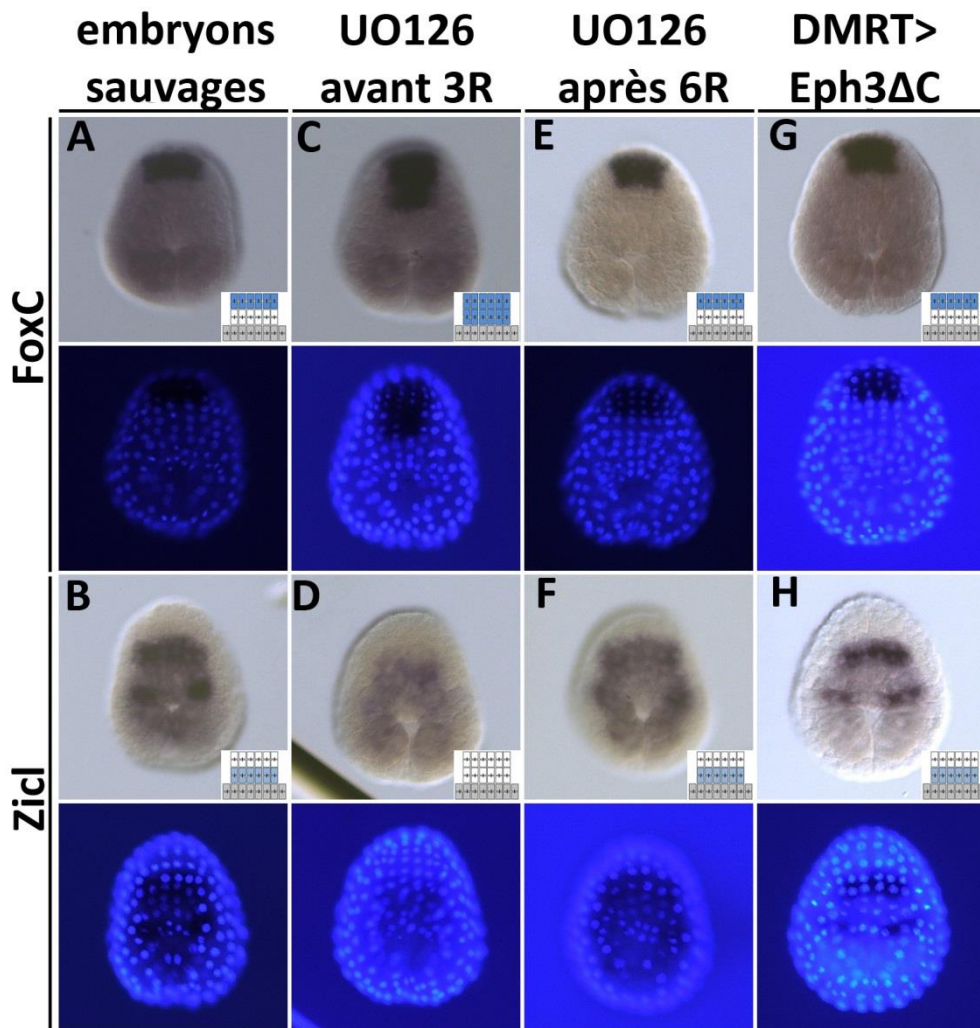


FIGURE III.6 REGIONALISATION A/P AU STADE 3R

A/C/E/G) Hybridation in situ de *FoxC* au stade 6R

B/D/F/H) Hybridation in situ de *ZicL* au stade 6R

A/B) Embryons sauvages

FoxC est exprimé dans les R5 et R6 alors que *ZicL* est exprimé dans les R3 et R4.

C/D) Embryons traités par UO126 avant le stade 3R

FoxC est exprimé dans les R3 à 6 et *ZicL* n'est plus exprimé.

E/F) Embryons traités par UO126 après le stade 3R

Les embryons présentent le phénotype d'un embryon sauvage.

G/H) Embryons électroporés avec *DMRT>Eph3ΔC*

Les embryons présentent le phénotype d'un embryon sauvage.

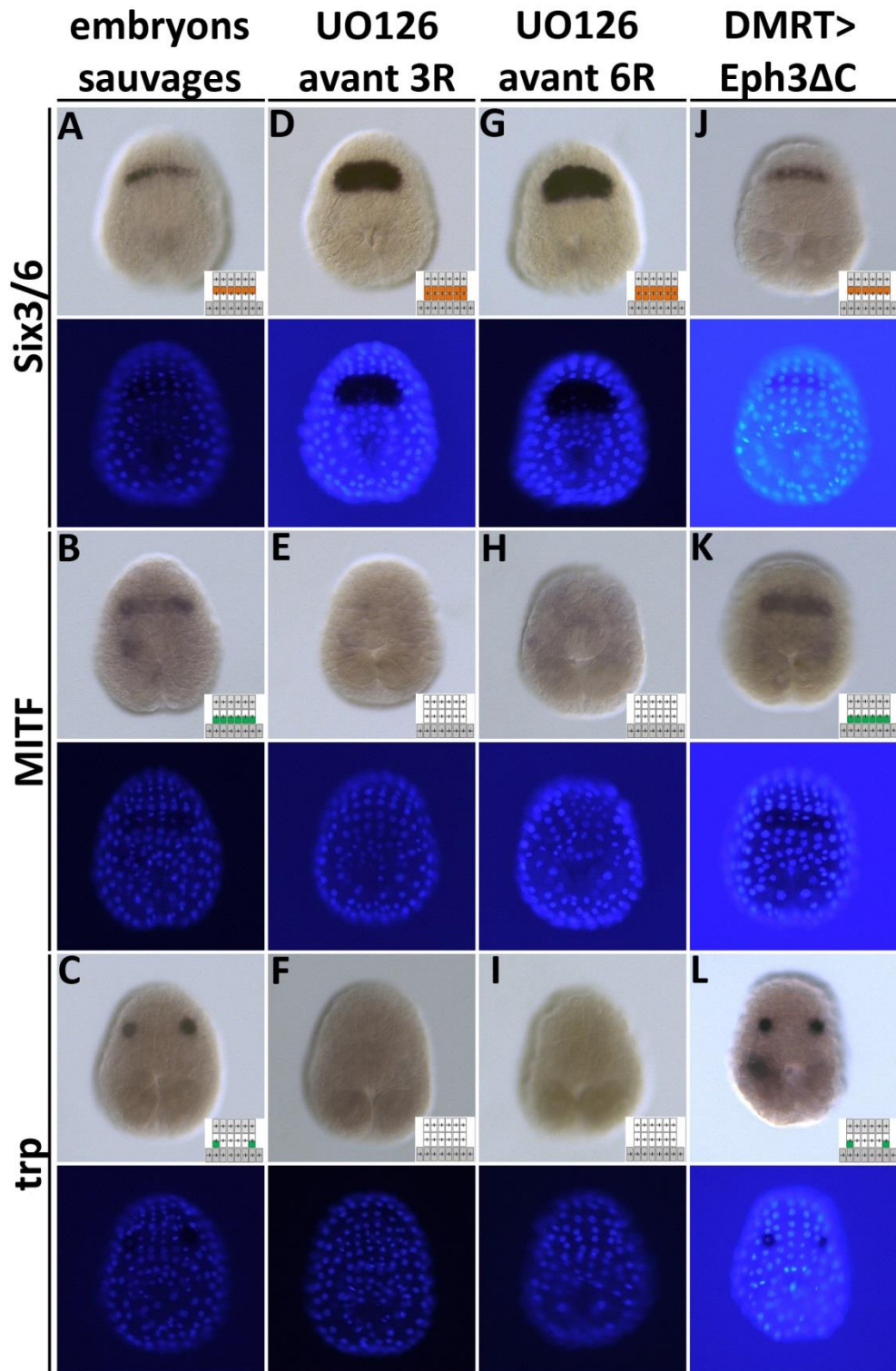


FIGURE III.7 REGIONALISATION A/P AU STADE 6R

A/D/G/J) Hybridation in situ de *Six3/6* au stade 6R

B/E/H/K) Hybridation in situ de *MITF* au stade 6R

C/F/I/L) Hybridation in situ de *Trp* au stade 6R

A/B/C) Embryons sauvages

Six3/6 est exprimé dans la R4 alors que *MITF* et *Trp* sont exprimés dans la R3.

D/E/F) Embryons traités par UO126 avant le stade 3R

Six3/6 est exprimé dans la R3 et R4 alors que *MITF* et *Trp* ne sont plus exprimés.

G/H/I) Embryons traités par UO126 après le stade 3R

Six3/6 est exprimé dans la R3 et R4 alors que *MITF* et *Trp* ne sont plus exprimés.

J/K/L) Embryons électroporés avec *DMRT>Eph3ΔC*

Les embryons présentent le phénotype sauvage.

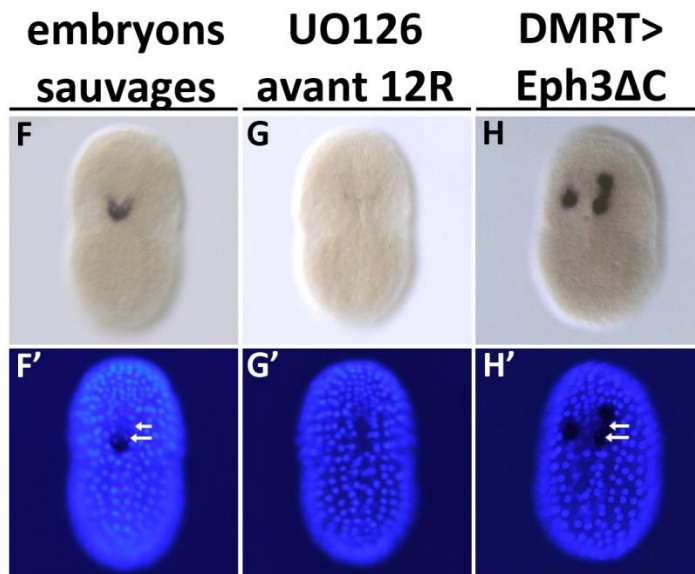
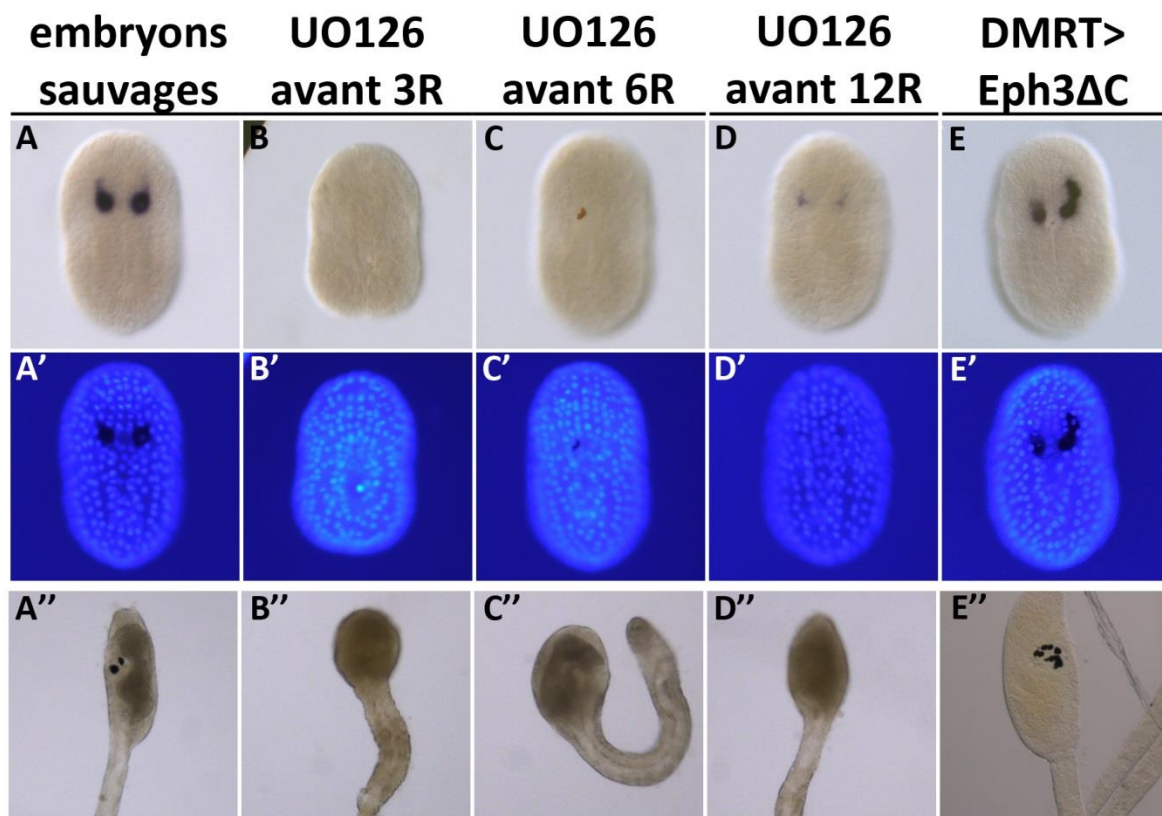


FIGURE III.8 SUIVI DU LIGNAGE PIGMENTAIRE APRES LE STADE 6R

Résultat d'hybridation *in situ* du gène *Trp* à partir du stade 12R.

Chaque expérience est couplée à une photo de la tête de la larve.

A/F) Embryons sauvages

En haut : *Trp* est exprimé dans les précurseurs pigmentaires (a10.97) qui appartiennent à la rangée R3p. Deux cellules pigmentaires sont induites.

En bas : *Trp* est uniquement exprimé dans les cellules pigmentaires a11.193.

B/C/D/G) Embryons traités par UO126 avant différents stades

Trp n'est pas exprimé dans la R3p et les cellules pigmentaires ne sont pas induites.

E/H) Embryons électroporés avec *DMRT>Eph3ΔC*

En haut : *Trp* est exprimé de manière ectopique dans les cellules sœurs des précurseurs pigmentaires (a10.98) qui appartiennent à la rangée R3a. Des cellules pigmentaires ectopiques sont induites.

En bas : *Trp* est exprimé manière ectopique dans les cellules sœurs des précurseurs pigmentaires a11.194.

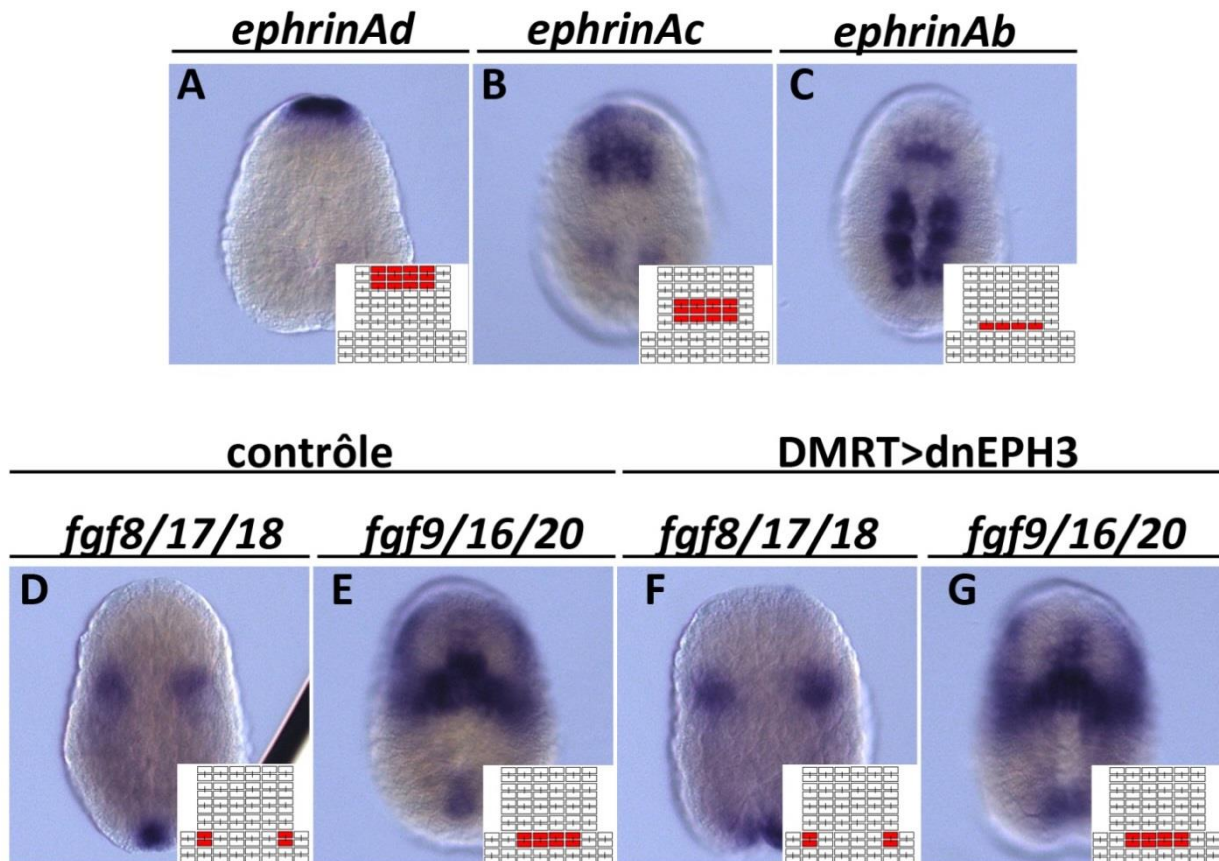


FIGURE III.9 PATRONS D'EXPRESSIONS DES LIGANDS EPHRINE ET FGF AU STADE 12R

A/B/C) Hybridation in situ des ligands éphrine au stade 12R

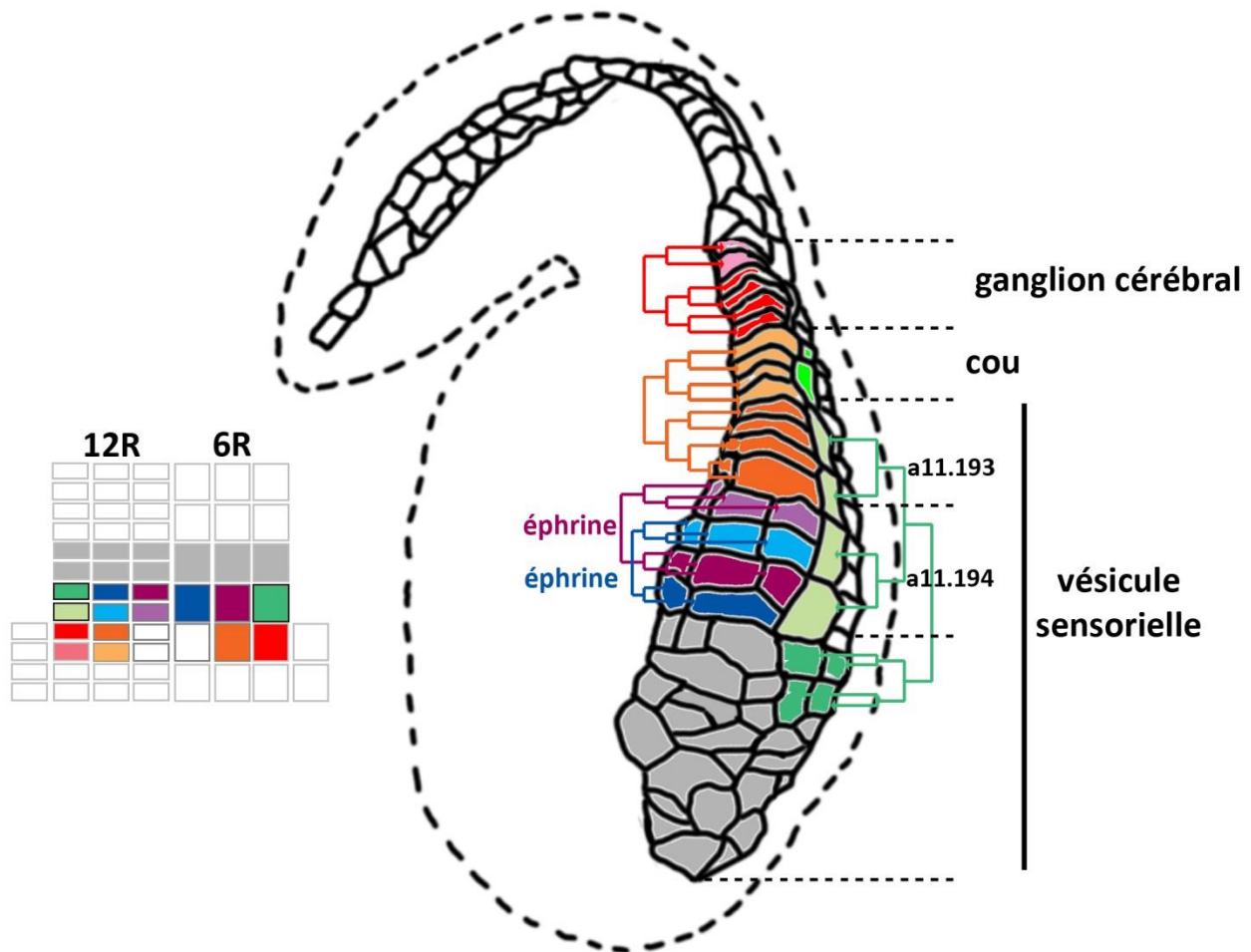
Les différents ligands éphrine sont exprimés dans différentes rangées de la plaque neurale.

D/E) Hybridation in situ des ligands FGF au stade 12R

Les ligands FGF8/17/18 et FGF9/16/20 sont exprimés dans les R2a et R2p.

F/G) Hybridation in situ des ligands FGF au stade 12R dans des embryons électroporés *DMRT>Eph3ΔC*.

Le patron d'expression des ligands FGF8/17/18 et FGF9/16/20 n'est pas modifié par l'inhibition du signal éphrine.



Mesure des surfaces de contact Stade bourgeon caudal (1.78)

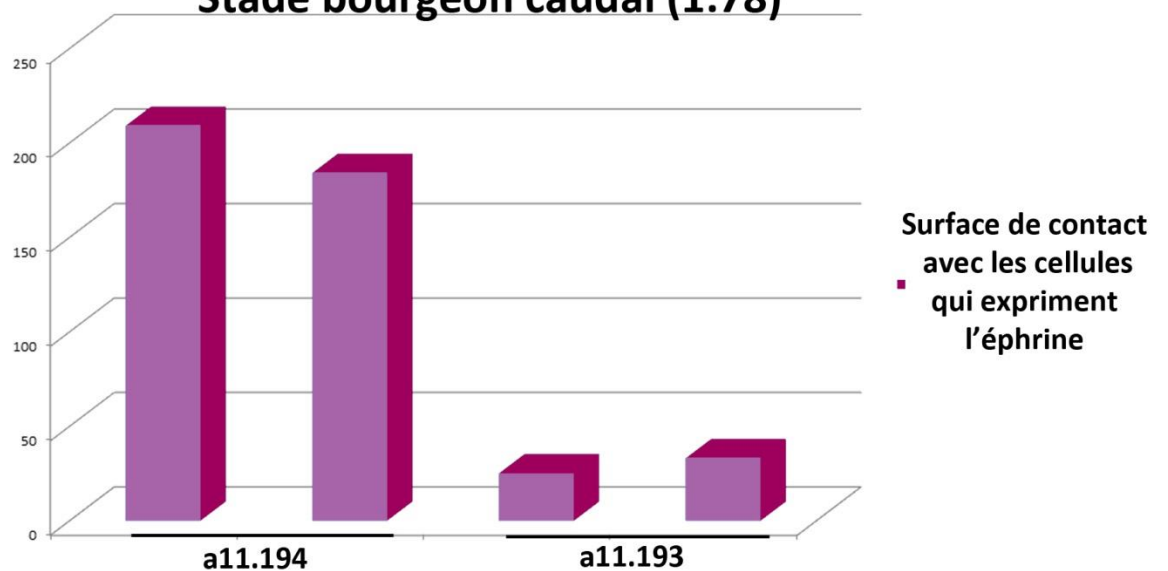


FIGURE III.10 SUIVI DU LIGNAGE PIGMENTAIRE AU STADE BOURGEON CAUDAL

- A) Correspondance des lignages entre les stades plaque neurale et bourgeon caudal. La cellule fluorescente verte exprime *Wnt7* et spécifie le précurseur pigmentaire voisin en ocellus.
- B) Mesure des surfaces de contact au stade bourgeon caudal (ratio taille de la tête/taille de la queue = 1 :1.78) entre les cellules qui expriment l'éphrine au stade 12R et les cellules du lignage pigmentaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Abitua, P.B., Wagner, E., Navarrete, I.A., and Levine, M. (2012). Identification of a rudimentary neural crest in a non-vertebrate chordate. *Nature* *492*, 104–107.
- Van Albada, S.B., and ten Wolde, P.R. (2007). Enzyme localization can drastically affect signal amplification in signal transduction pathways. *PLoS Comput. Biol.* *3*, 1925–1934.
- Alexander, T., Nolte, C., and Krumlauf, R. (2009). Hox genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *25*, 431–456.
- Ang, S.L., Conlon, R.A., Jin, O., and Rossant, J. (1994). Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse *Otx2* in ectoderm explants. *Dev. Camb. Engl.* *120*, 2979–2989.
- Araki, I., and Nakamura, H. (1999). Engrailed defines the position of dorsal di-mesencephalic boundary by repressing diencephalic fate. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 5127–5135.
- Arvanitis, D., and Davy, A. (2008). Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev.* *22*, 416–429.
- Battle, E., Henderson, J.T., Beghtel, H., van den Born, M.M.W., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., et al. (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* *111*, 251–263.
- Belleudi, F., Leone, L., Nobili, V., Raffa, S., Francescangeli, F., Maggio, M., Morrone, S., Marchese, C., and Torrisi, M.R. (2007). Keratinocyte growth factor receptor ligands target the receptor to different intracellular pathways. *Traffic Cph. Den.* *8*, 1854–1872.
- Bertrand, V., Hudson, C., Caillol, D., Popovici, C., and Lemaire, P. (2003). Neural tissue in ascidian embryos is induced by FGF9/16/20, acting via a combination of maternal GATA and Ets transcription factors. *Cell* *115*, 615–627.
- Bouillet, P., Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Dollé, P., and Chambon, P. (1995). Sequence and expression pattern of the *Stra7* (*Gbx-2*) homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *204*, 372–382.
- Bourlat, S.J., Juliusdottir, T., Lowe, C.J., Freeman, R., Aronowicz, J., Kirschner, M., Lander, E.S., Thorndyke, M., Nakano, H., Kohn, A.B., et al. (2006). Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida. *Nature* *444*, 85–88.
- Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E.M. (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* *382*, 595–601.
- Broccoli, V., Boncinelli, E., and Wurst, W. (1999). The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmic organizer. *Nature* *401*, 164–168.
- Carvalho, R.F., Beutler, M., Marler, K.J.M., Knöll, B., Becker-Barroso, E., Heintzmann, R., Ng, T., and Drescher, U. (2006). Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nat. Neurosci.* *9*, 322–330.
- Casaletto, J.B., and McClatchey, A.I. (2012). Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 387–400.
- Cho, G.-S., Choi, S.-C., and Han, J.-K. (2013). BMP signal attenuates FGF pathway in anteroposterior neural patterning. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *434*, 509–515.
- Christiaen, L., Wagner, E., Shi, W., and Levine, M. (2009). The Sea Squirt *Ciona intestinalis*. *Cold Spring Harb. Protoc.* *2009*, pdb.emo138.
- Cole, A.G., and Meinertzhagen, I.A. (2004). The central nervous system of the ascidian larva: mitotic history of cells forming the neural tube in late embryonic *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* *271*, 239–262.

- Conklin, E.G. (1905). The organization and cell-lineage of the ascidian egg (Philadelphia : [Academy of Natural Sciences]).
- Cooke, J.E., Kemp, H.A., and Moens, C.B. (2005). EphA4 is required for cell adhesion and rhombomere-boundary formation in the zebrafish. *Curr. Biol.* *CB 15*, 536–542.
- Corbo, J.C., Levine, M., and Zeller, R.W. (1997). Characterization of a notochord-specific enhancer from the Brachyury promoter region of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Development* *124*, 589–602.
- Cowan, C.A., and Henkemeyer, M. (2001). The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* *413*, 174–179.
- Cox, W.G., and Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Dev. Camb. Engl.* *121*, 4349–4358.
- Dail, M., Richter, M., Godement, P., and Pasquale, E.B. (2006). Eph receptors inactivate R-Ras through different mechanisms to achieve cell repulsion. *J. Cell Sci.* *119*, 1244–1254.
- Darras, S., and Nishida, H. (2001). The BMP/CHORDIN antagonism controls sensory pigment cell specification and differentiation in the ascidian embryo. *Dev. Biol.* *236*, 271–288.
- Davy, A., and Robbins, S.M. (2000). Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *EMBO J.* *19*, 5396–5405.
- Dehal, P., and Boore, J.L. (2005). Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol.* *3*, e314.
- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R.K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D.M., et al. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* *298*, 2157–2167.
- Delaune, E., Lemaire, P., and Kodjabachian, L. (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 299–310.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D., and Philippe, H. (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* *439*, 965–968.
- Dufour, H.D., Chettouh, Z., Deyts, C., Rosa, R. de, Goridis, C., Joly, J.-S., and Brunet, J.-F. (2006). Precranial origin of cranial motoneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 8727–8732.
- Durstun, A.J., Timmermans, J.P., Hage, W.J., Hendriks, H.F., de Vries, N.J., Heideveld, M., and Nieuwkoop, P.D. (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* *340*, 140–144.
- Elowe, S., Holland, S.J., Kulkarni, S., and Pawson, T. (2001). Downregulation of the Ras-Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway by the EphB2 Receptor Tyrosine Kinase Is Required for Ephrin-Induced Neurite Retraction. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 7429–7441.
- Eph Nomenclature Committee (1997). Unified Nomenclature for Eph Family Receptors and Their Ligands, the Ephrins. *Cell* *90*, 403–404.
- Esposito, R., D’Aniello, S., Squarzone, P., Pezzotti, M.R., Ristoratore, F., and Spagnuolo, A. (2012). New insights into the evolution of metazoan tyrosinase gene family. *PLoS One* *7*, e35731.
- Ferguson, E.L., and Anderson, K.V. (1992). Localized enhancement and repression of the activity of the TGF-beta family member, decapentaplegic, is necessary for dorsal-ventral pattern formation in the *Drosophila* embryo. *Dev. Camb. Engl.* *114*, 583–597.

- Ferrell, J.E., Jr (2002). Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 140–148.
- Ferrell, J.E., Jr, and Bhatt, R.R. (1997). Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* *272*, 19008–19016.
- Ferrell, J.E., Jr, and Machleder, E.M. (1998). The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in *Xenopus* oocytes. *Science* *280*, 895–898.
- Ferrell, J.E., Jr, Pomerening, J.R., Kim, S.Y., Trunnell, N.B., Xiong, W., Huang, C.-Y.F., and Machleder, E.M. (2009). Simple, realistic models of complex biological processes: positive feedback and bistability in a cell fate switch and a cell cycle oscillator. *FEBS Lett.* *583*, 3999–4005.
- Ferrell Jr, J.E. (1996). Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 460–466.
- Frisén, J., Yates, P.A., McLaughlin, T., Friedman, G.C., O’Leary, D.D., and Barbacid, M. (1998). Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* *20*, 235–243.
- Gabay, L., Scholz, H., Golembo, M., Klaes, A., Shilo, B.Z., and Klämbt, C. (1996). EGF receptor signaling induces pointed P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 3355–3362.
- Gilbert, S.F. (2004). *Biologie du développement (De Boeck Supérieur)*.
- Goldbeter, A., and Koshland, D.E., Jr (1981). An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 6840–6844.
- Hatta, K., and Takahashi, Y. (1996). Secondary axis induction by heterospecific organizers in zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *205*, 183–195.
- Hattori, M., Osterfield, M., and Flanagan, J.G. (2000). Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* *289*, 1360–1365.
- Hemmati-Brivanlou, A., and Melton, D. (1997). Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise. *Cell* *88*, 13–17.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O.G., and Melton, D.A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* *77*, 283–295.
- Hibino, T., Nishikata, T., and Nishida, H. (1998). Centrosome-attracting body: a novel structure closely related to unequal cleavages in the ascidian embryo. *Dev. Growth Differ.* *40*, 85–95.
- Himanen, J.-P., Chumley, M.J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W.A., Jeffrey, P.D., Vearing, C., Geleick, D., Feldheim, D.A., Boyd, A.W., et al. (2004). Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat. Neurosci.* *7*, 501–509.
- Holland, S.J., Gale, N.W., Gish, G.D., Roth, R.A., Songyang, Z., Cantley, L.C., Henkemeyer, M., Yancopoulos, G.D., and Pawson, T. (1997). Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells. *EMBO J.* *16*, 3877–3888.
- Holley, S.A., Jackson, P.D., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E.M., Hoffmann, F.M., and Ferguson, E.L. (1995). A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving sog and chordin. *Nature* *376*, 249–253.

- Hotta, K., Mitsuhashi, K., Takahashi, H., Inaba, K., Oka, K., Gojobori, T., and Ikeo, K. (2007). A web-based interactive developmental table for the ascidian *Ciona intestinalis*, including 3D real-image embryo reconstructions: I. From fertilized egg to hatching larva. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *236*, 1790–1805.
- Huang, C.Y., and Ferrell, J.E., Jr (1996). Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 10078–10083.
- Hudson, C., and Lemaire, P. (2001). Induction of anterior neural fates in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mech. Dev.* *100*, 189–203.
- Hudson, C., and Yasuo, H. (2008). Similarity and diversity in mechanisms of muscle fate induction between ascidian species. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *100*, 265–277.
- Hudson, C., Darras, S., Caillol, D., Yasuo, H., and Lemaire, P. (2003). A conserved role for the MEK signalling pathway in neural tissue specification and posteriorisation in the invertebrate chordate, the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 147–159.
- Hudson, C., Lotito, S., and Yasuo, H. (2007). Sequential and combinatorial inputs from Nodal, Delta2/Notch and FGF/MEK/ERK signalling pathways establish a grid-like organisation of distinct cell identities in the ascidian neural plate. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 3527–3537.
- Hudson, C., Ba, M., Rouvière, C., and Yasuo, H. (2011). Divergent mechanisms specify chordate motoneurons: evidence from ascidians. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 1643–1652.
- Hudson, C., Kawai, N., Negishi, T., and Yasuo, H. (2013). β -Catenin-driven binary fate specification segregates germ layers in ascidian embryos. *Curr. Biol. CB* *23*, 491–495.
- Hunter, T. (1987). A thousand and one protein kinases. *Cell* *50*, 823–829.
- Ikuta, T., Yoshida, N., Satoh, N., and Saiga, H. (2004). *Ciona intestinalis* Hox gene cluster: Its dispersed structure and residual colinear expression in development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15118–15123.
- Ikuta, T., Satoh, N., and Saiga, H. (2010). Limited functions of Hox genes in the larval development of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 1505–1513.
- Imai, K.S., Satoh, N., and Satou, Y. (2002a). Early embryonic expression of FGF4/6/9 gene and its role in the induction of mesenchyme and notochord in *Ciona savignyi* embryos. *Development* *129*, 1729–1738.
- Imai, K.S., Satoh, N., and Satou, Y. (2002b). An essential role of a FoxD gene in notochord induction in *Ciona* embryos. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 3441–3453.
- Imai, K.S., Satou, Y., and Satoh, N. (2002c). Multiple functions of a Zic-like gene in the differentiation of notochord, central nervous system and muscle in *Ciona savignyi* embryos. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 2723–2732.
- Imai, K.S., Hino, K., Yagi, K., Satoh, N., and Satou, Y. (2004). Gene expression profiles of transcription factors and signaling molecules in the ascidian embryo: towards a comprehensive understanding of gene networks. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 4047–4058.
- Ingham, P.W., and Placzek, M. (2006). Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 841–850.
- Irannejad, R., Tomshine, J.C., Tomshine, J.R., Chevalier, M., Mahoney, J.P., Steyaert, J., Rasmussen, S.G.F., Sunahara, R.K., El-Samad, H., Huang, B., et al. (2013). Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* *495*, 534–538.
- Irving, C., and Mason, I. (2000). Signalling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of Hox gene expression. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 177–186.

- Janes, P.W., Wimmer-Kleikamp, S.H., Frangakis, A.S., Treble, K., Griesshaber, B., Sabet, O., Grabenbauer, M., Ting, A.Y., Saftig, P., Bastiaens, P.I., et al. (2009). Cytoplasmic relaxation of active Eph controls ephrin shedding by ADAM10. *PLoS Biol.* 7, e1000215.
- Janes, P.W., Nievergall, E., and Lackmann, M. (2012). Concepts and consequences of Eph receptor clustering. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 43–50.
- Jean, S., Mikryukov, A., Tremblay, M.G., Baril, J., Guillou, F., Bellenfant, S., and Moss, T. (2010). Extended-synaptotagmin-2 mediates FGF receptor endocytosis and ERK activation in vivo. *Dev. Cell* 19, 426–439.
- Kholodenko, B.N. (2006). Cell-signalling dynamics in time and space. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 165–176.
- Kholodenko, B.N., and Birtwistle, M.R. (2009). Four-dimensional dynamics of MAPK information processing systems. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 1, 28–44.
- Kim, G.J., Yamada, A., and Nishida, H. (2000). An FGF signal from endoderm and localized factors in the posterior-vegetal egg cytoplasm pattern the mesodermal tissues in the ascidian embryo. *Dev. Camb. Engl.* 127, 2853–2862.
- Kim, G.J., Kumano, G., and Nishida, H. (2007). Cell fate polarization in ascidian mesenchyme/muscle precursors by directed FGF signaling and role for an additional ectodermal FGF antagonizing signal in notochord/nerve cord precursors. *Dev. Camb. Engl.* 134, 1509–1518.
- Kim, I., Ryu, Y.S., Kwak, H.J., Ahn, S.Y., Oh, J.-L., Yancopoulos, G.D., Gale, N.W., and Koh, G.Y. (2002). EphB ligand, ephrinB2, suppresses the VEGF- and angiopoietin-1-induced Ras/mitogen-activated protein kinase pathway in venous endothelial cells. *FASEB J.*
- Kintner, C.R., and Dodd, J. (1991). Hensen's node induces neural tissue in *Xenopus* ectoderm. Implications for the action of the organizer in neural induction. *Dev. Camb. Engl.* 113, 1495–1505.
- Klein, R. (2012a). Eph/ephrin signalling during development. *Development* 139, 4105–4109.
- Klein, R. (2012b). Eph/ephrin signalling during. *Development* 139, 4105–4109.
- Kobayashi, D., Kobayashi, M., Matsumoto, K., Ogura, T., Nakafuku, M., and Shimamura, K. (2002). Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Dev. Camb. Engl.* 129, 83–93.
- Kobayashi, K., Sawada, K., Yamamoto, H., Wada, S., Saiga, H., and Nishida, H. (2003). Maternal macho-1 is an intrinsic factor that makes cell response to the same FGF signal differ between mesenchyme and notochord induction in ascidian embryos. *Dev. Camb. Engl.* 130, 5179–5190.
- Kondoh, K., Kobayashi, K., and Nishida, H. (2003). Suppression of macho-1-directed muscle fate by FGF and BMP is required for formation of posterior endoderm in ascidian embryos. *Dev. Camb. Engl.* 130, 3205–3216.
- Kullander, K., and Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of eph and ephrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 475–486.
- Kumano, G., Takatori, N., Negishi, T., Takada, T., and Nishida, H. (2011). A maternal factor unique to ascidians silences the germline via binding to P-TEFb and RNAP II regulation. *Curr. Biol. CB* 21, 1308–1313.
- Lackmann, M., and Boyd, A.W. (2008). Eph, a protein family coming of age: more confusion, insight, or complexity? *Sci. Signal.* 1, re2.
- Lamy, C., Rothbacher, U., Caillol, D., and Lemaire, P. (2006). Ci-FoxA-a is the earliest zygotic determinant of the ascidian anterior ectoderm and directly activates Ci-sFRP1/5. *Dev. Camb. Engl.* 133, 2835–2844.

- Laude, A.J., and Prior, I.A. (2008). Palmitoylation and localisation of RAS isoforms are modulated by the hypervariable linker domain. *J. Cell Sci.* *121*, 421–427.
- Launay, C., Fromentoux, V., Shi, D.L., and Boucaut, J.C. (1996). A truncated FGF receptor blocks neural induction by endogenous Xenopus inducers. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 869–880.
- Lemaire, P. (2009). Unfolding a chordate developmental program, one cell at a time: invariant cell lineages, short-range inductions and evolutionary plasticity in ascidians. *Dev. Biol.* *332*, 48–60.
- Lemaire, P., Bertrand, V., and Hudson, C. (2002). Early Steps in the Formation of Neural Tissue in Ascidian Embryos. *Dev. Biol.* *252*, 151–169.
- Li, C., Scott, D.A., Hatch, E., Tian, X., and Mansour, S.L. (2007). Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 167–176.
- Lim, Y.-S., McLaughlin, T., Sung, T.-C., Santiago, A., Lee, K.-F., and O’Leary, D.D.M. (2008). p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* *59*, 746–758.
- López, J.M. (2010). Digital kinases: A cell model for sensing, integrating and making choices. *Commun. Integr. Biol.* *3*, 146–150.
- Mallo, M., and Alonso, C.R. (2013). The regulation of Hox gene expression during animal development. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 3951–3963.
- Marchal, L., Luxardi, G., Thomé, V., and Kodjabachian, L. (2009). BMP inhibition initiates neural induction via FGF signaling and Zic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17437–17442.
- Marquardt, T., Shirasaki, R., Ghosh, S., Andrews, S.E., Carter, N., Hunter, T., and Pfaff, S.L. (2005). Coexpressed EphA Receptors and Ephrin-A Ligands Mediate Opposing Actions on Growth Cone Navigation from Distinct Membrane Domains. *Cell* *121*, 127–139.
- Marston, D.J., Dickinson, S., and Nobes, C.D. (2003). Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph–ephrin contact repulsion. *Nat. Cell Biol.* *5*, 879–888.
- Matsunaga, E., Araki, I., and Nakamura, H. (2000). Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 2357–2365.
- McGrew, L.L., Lai, C.J., and Moon, R.T. (1995). Specification of the anteroposterior neural axis through synergistic interaction of the Wnt signaling cascade with noggin and follistatin. *Dev. Biol.* *172*, 337–342.
- McLaughlin, T., Hindges, R., and O’Leary, D.D.M. (2003). Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13*, 57–69.
- Melen, G.J., Levy, S., Barkai, N., and Shilo, B.-Z. (2005). Threshold responses to morphogen gradients by zero-order ultrasensitivity. *Mol. Syst. Biol.* *1*, 2005.0028.
- Mellott, D.O., and Burke, R.D. (2008). The molecular phylogeny of eph receptors and ephrin ligands. *BMC Cell Biol.* *9*, 27.
- Meyers, J., Craig, J., and Odde, D.J. (2006). Potential for control of signaling pathways via cell size and shape. *Curr. Biol. CB* *16*, 1685–1693.
- Miao, H., Wei, B.-R., Peehl, D.M., Li, Q., Alexandrou, T., Schelling, J.R., Rhim, J.S., Sedor, J.R., Burnett, E., and Wang, B. (2001). Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nat. Cell Biol.* *3*, 527–530.

- Miller, M.A., Ruest, P.J., Kosinski, M., Hanks, S.K., and Greenstein, D. (2003). An Eph receptor sperm-sensing control mechanism for oocyte meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* *17*, 187–200.
- Millet, S., Campbell, K., Epstein, D.J., Losos, K., Harris, E., and Joyner, A.L. (1999). A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* *401*, 161–164.
- Minokawa, T., Yagi, K., Makabe, K.W., and Nishida, H. (2001). Binary specification of nerve cord and notochord cell fates in ascidian embryos. *Development* *128*, 2007–2017.
- Munro, E., Robin, F., and Lemaire, P. (2006). Cellular morphogenesis in ascidians: how to shape a simple tadpole. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *16*, 399–405.
- Nakamura, M.J., Terai, J., Okubo, R., Hotta, K., and Oka, K. (2012). Three-dimensional anatomy of the *Ciona intestinalis* tailbud embryo at single-cell resolution. *Dev. Biol.* *372*, 274–284.
- Negishi, T., Takada, T., Kawai, N., and Nishida, H. (2007). Localized PEM mRNA and protein are involved in cleavage-plane orientation and unequal cell divisions in ascidians. *Curr. Biol. CB* *17*, 1014–1025.
- Nicol, D., and Meinertzhagen, I.A. (1988a). Development of the central nervous system of the larva of the ascidian, *Ciona intestinalis* L. I. The early lineages of the neural plate. *Dev. Biol.* *130*, 721–736.
- Nicol, D., and Meinertzhagen, I.A. (1988b). Development of the central nervous system of the larva of the ascidian, *Ciona intestinalis* L. II. Neural plate morphogenesis and cell lineages during neurulation. *Dev. Biol.* *130*, 737–766.
- Nishida, H. (1987). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. *Dev. Biol.* *121*, 526–541.
- Nishida, H. (1991). Induction of brain and sensory pigment cells in the analyzed by experiments with isolated blastomeres. *Development* *112*, 389–395.
- Nishida, H. (1994). Localization of determinants for formation of the anterior–posterior axis in eggs of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev. Camb. Engl.* 3093–3104.
- Nishida, H. (2003). Spatio-temporal pattern of MAP kinase activation in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev. Growth Differ.* *45*, 27–37.
- Nishida, H., and Satoh, N. (1983). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. I. Up to the eight-cell stage. *Dev. Biol.* *99*, 382–394.
- Nishida, H., and Satoh, N. (1985). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. II. The 16- and 32-cell stages. *Dev. Biol.* *110*, 440–454.
- Nishida, H., and Satoh, N. (1989). Determination and regulation in the pigment cell lineage of the ascidian embryo. *Dev. Biol.* *132*, 355–367.
- Nishida, H., and Sawada, K. (2001). *macho-1* encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis. *Nature* *409*, 724–729.
- Nishiyama, A., and Fujiwara, S. (2008). RNA interference by expressing short hairpin RNA in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Growth Differ.* *50*, 521–529.
- Noren, N.K., and Pasquale, E.B. (2004). Eph receptor–ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. *Cell. Signal.* *16*, 655–666.
- O’Neill, E.M., Rebay, I., Tjian, R., and Rubin, G.M. (1994). The activities of two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* *78*, 137–147.

- Ohta, N., and Satou, Y. (2013). Multiple signaling pathways coordinate to induce a threshold response in a chordate embryo. *PLoS Genet.* 9, e1003818.
- Omerovic, J., and Prior, I.A. (2009). Compartmentalized signalling: Ras proteins and signalling nanoclusters. *FEBS J.* 276, 1817–1825.
- Pálffy, M., Reményi, A., and Korcsmáros, T. (2012). Endosomal crosstalk: meeting points for signaling pathways. *Trends Cell Biol.* 22, 447–456.
- Pani, A.M., Mullarkey, E.E., Aronowicz, J., Assimacopoulos, S., Grove, E.A., and Lowe, C.J. (2012). Ancient deuterostome origins of vertebrate brain signalling centres. *Nature* 483, 289–294.
- Parker, M., Roberts, R., Enriquez, M., Zhao, X., Takahashi, T., Pat Cerretti, D., Daniel, T., and Chen, J. (2004). Reverse endocytosis of transmembrane ephrin-B ligands via a clathrin-mediated pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 17–23.
- Pasquale, E.B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 462–475.
- Pasquale, E.B. (2010). Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10, 165–180.
- Pera, E.M., Ikeda, A., Eivers, E., and De Robertis, E.M. (2003). Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev.* 17, 3023–3028.
- Peyker, A., Rocks, O., and Bastiaens, P.I.H. (2005). Imaging activation of two Ras isoforms simultaneously in a single cell. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 6, 78–85.
- Picco, V., Hudson, C., and Yasuo, H. (2007). Ephrin-Eph signalling drives the asymmetric division of notochord/neural precursors in *Ciona* embryos. *Dev. Camb. Engl.* 134, 1491–1497.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., and Robertis, E.M.D. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707–710.
- Pitulescu, M.E., and Adams, R.H. (2010). Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev.* 24, 2480–2492.
- Poliakov, A., Cotrina, M.L., Pasini, A., and Wilkinson, D.G. (2008). Regulation of EphB2 activation and cell repulsion by feedback control of the MAPK pathway. *J. Cell Biol.* 183, 933–947.
- Pratt, R.L., and Kinch, M.S. (2002). Activation of the EphA2 tyrosine kinase stimulates the MAP/ERK kinase signaling cascade. *Oncogene* 21, 7690–7699.
- Price, D., Jarman, A.P., Mason, J.O., and Kind, P.C. (2011). *Building Brains: An Introduction to Neural Development* (John Wiley & Sons).
- Prodon, F., Yamada, L., Shirae-Kurabayashi, M., Nakamura, Y., and Sasakura, Y. (2007). Postplasmic/PEM RNAs: a class of localized maternal mRNAs with multiple roles in cell polarity and development in ascidian embryos. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236, 1698–1715.
- Prodon, F., Sardet, C., and Nishida, H. (2008). Cortical and cytoplasmic flows driven by actin microfilaments polarize the cortical ER-mRNA domain along the a–v axis in ascidian oocytes. *Dev. Biol.* 313, 682–699.
- Prodon, F., Chenevert, J., Hébras, C., Dumollard, R., Faure, E., Gonzalez-Garcia, J., Nishida, H., Sardet, C., and McDougall, A. (2010). Dual mechanism controls asymmetric spindle position in ascidian germ cell precursors. *Dev. Camb. Engl.* 137, 2011–2021.

- Ramón Martínez-Morales, J., Rodrigo, I., and Bovolenta, P. (2004). Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *BioEssays* 26, 766–777.
- Reich, A., Sapir, A., and Shilo, B. (1999). Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Dev. Camb. Engl.* 126, 4139–4147.
- Richard, D., Beaumont, A., and Cassier, P. (2009). *Biologie animale - Les Cordés - 9ème édition - Anatomie comparée des vertébrés: Anatomie comparée des vertébrés* (Dunod).
- Robin, F.B., Dauga, D., Tassy, O., Sobral, D., Daian, F., and Lemaire, P. (2011). Creating 3D digital replicas of ascidian embryos from stacks of confocal images. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011, 1251–1261.
- Rothbacher, U., Bertrand, V., Lamy, C., and Lemaire, P. (2007). A combinatorial code of maternal GATA, Ets and beta-catenin-TCF transcription factors specifies and patterns the early ascidian ectoderm. *Dev. Camb. Engl.* 134, 4023–4032.
- Sahin, M., Greer, P.L., Lin, M.Z., Poucher, H., Eberhart, J., Schmidt, S., Wright, T.M., Shamah, S.M., O'Connell, S., Cowan, C.W., et al. (2005). Eph-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Ephexin1 Modulates Growth Cone Collapse. *Neuron* 46, 191–204.
- Salaita, K., Nair, P.M., Petit, R.S., Neve, R.M., Das, D., Gray, J.W., and Groves, J.T. (2010). Restriction of receptor movement alters cellular response: physical force sensing by EphA2. *Science* 327, 1380–1385.
- Sardet, C., Paix, A., Prodon, F., Dru, P., and Chenevert, J. (2007). From oocyte to 16-cell stage: cytoplasmic and cortical reorganizations that pattern the ascidian embryo. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236, 1716–1731.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., and De Robertis, E.M. (1995). Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 376, 333–336.
- Sato, S.M., and Sargent, T.D. (1989). Development of neural inducing capacity in dissociated *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* 134, 263–266.
- Satoh, N. (1994). *Developmental biology of ascidians* (Cambridge [England]; New York: Cambridge University Press).
- Satou, Y., Imai, K.S., and Satoh, N. (2001). Action of morpholinos in *Ciona* embryos. *Genes. N. Y. N* 2000 30, 103–106.
- Satou, Y., Satoh, N., and Imai, K.S. (2009). Gene regulatory networks in the early ascidian embryo. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 268–273.
- Sheng, G., dos Reis, M., and Stern, C.D. (2003). Churchill, a zinc finger transcriptional activator, regulates the transition between gastrulation and neurulation. *Cell* 115, 603–613.
- Sherrard, K., Robin, F., Lemaire, P., and Munro, E. (2010). Sequential activation of apical and basolateral contractility drives ascidian endoderm invagination. *Curr. Biol. CB* 20, 1499–1510.
- Shi, W., and Levine, M. (2008). Ephrin signaling establishes asymmetric cell fates in an endomesoderm lineage of the *Ciona* embryo. *Dev. Camb. Engl.* 135, 931–940.
- Shin, J., Gu, C., Kim, J., and Park, S. (2008). Transient activation of the MAP kinase signaling pathway by the forward signaling of EphA4 in PC12 cells. *BMB Rep.* 41, 479–484.
- Shirae-Kurabayashi, M., Matsuda, K., and Nakamura, A. (2011). Ci-Pem-1 localizes to the nucleus and represses somatic gene transcription in the germline of *Ciona intestinalis* embryos. *Dev. Camb. Engl.* 138, 2871–2881.

- Smith, W.C., and Harland, R.M. (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* **70**, 829–840.
- Squarzoni, P., Parveen, F., Zanetti, L., Ristoratore, F., and Spagnuolo, A. (2011). FGF/MAPK/Ets signaling renders pigment cell precursors competent to respond to Wnt signal by directly controlling Ci-Tcf transcription. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 1421–1432.
- Stern, C.D. (2001). Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 92–98.
- Stern, C.D. (2005). Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Dev. Camb. Engl.* **132**, 2007–2021.
- Stern, C.D., and Downs, K.M. (2012). The hypoblast (visceral endoderm): an evo-devo perspective. *Dev. Camb. Engl.* **139**, 1059–1069.
- Stern, C.D., Charité, J., Deschamps, J., Duboule, D., Durston, A.J., Kmita, M., Nicolas, J.-F., Palmeirim, I., Smith, J.C., and Wolpert, L. (2006). Head-tail patterning of the vertebrate embryo: one, two or many unresolved problems? *Int. J. Dev. Biol.* **50**, 3–15.
- Stolfi, A., and Christiaen, L. (2012). Genetic and genomic toolbox of the chordate *Ciona intestinalis*. *Genetics* **192**, 55–66.
- Stolfi, A., Wagner, E., Taliaferro, J.M., Chou, S., and Levine, M. (2011). Neural tube patterning by Ephrin, FGF and Notch signaling relays. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 5429–5439.
- Streit, A., Lee, K.J., Woo, I., Roberts, C., Jessell, T.M., and Stern, C.D. (1998). Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick embryo. *Dev. Camb. Engl.* **125**, 507–519.
- Streit, A., Berliner, A.J., Papanayotou, C., Sirulnik, A., and Stern, C.D. (2000). Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* **406**, 74–78.
- Studer, M., Lumsden, A., Ariza-McNaughton, L., Bradley, A., and Krumlauf, R. (1996). Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking *Hoxb-1*. *Nature* **384**, 630–634.
- Tassy, O., Daian, F., Hudson, C., Bertrand, V., and Lemaire, P. (2006). A Quantitative Approach to the Study of Cell Shapes and Interactions during Early Chordate Embryogenesis. *Curr. Biol.* **16**, 345–358.
- Taub, N., Teis, D., Ebner, H.L., Hess, M.W., and Huber, L.A. (2007). Late endosomal traffic of the epidermal growth factor receptor ensures spatial and temporal fidelity of mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4698–4710.
- Thomas, P., and Beddington, R. (1996). Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr. Biol. CB* **6**, 1487–1496.
- Tong, J., Elowe, S., Nash, P., and Pawson, T. (2003). Manipulation of EphB2 Regulatory Motifs and SH2 Binding Sites Switches MAPK Signaling and Biological Activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 6111–6119.
- Tong, J., Sydorsky, Y., St-Germain, J.R., Taylor, P., Tsao, M.S., and Moran, M.F. (2013). Odin (ANKS1A) modulates EGF receptor recycling and stability. *PLoS One* **8**, e64817.
- Venuti, J.M., and Jeffery, W.R. (1989). Cell lineage and determination of cell fate in ascidian embryos. *Int. J. Dev. Biol.* **33**, 197–212.

- Vieira, C., Pombero, A., García-Lopez, R., Gimeno, L., Echevarria, D., and Martínez, S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 7–20.
- Vihanto, M.M., Vindis, C., Djonov, V., Cerretti, D.P., and Huynh-Do, U. (2006). Caveolin-1 is required for signaling and membrane targeting of EphB1 receptor tyrosine kinase. *J. Cell Sci.* *119*, 2299–2309.
- Wagner, E., and Levine, M. (2012). FGF signaling establishes the anterior border of the Ciona neural tube. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 2351–2359.
- Wasylyk, B., Hagman, J., and Gutierrez-Hartmann, A. (1998). Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 213–216.
- Wharton, K.A., Ray, R.P., and Gelbart, W.M. (1993). An activity gradient of decapentaplegic is necessary for the specification of dorsal pattern elements in the Drosophila embryo. *Dev. Camb. Engl.* *117*, 807–822.
- Wilson, P.A., and Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* *376*, 331–333.
- Wimmer-Kleikamp, S.H., Janes, P.W., Squire, A., Bastiaens, P.I.H., and Lackmann, M. (2004). Recruitment of Eph receptors into signaling clusters does not require ephrin contact. *J. Cell Biol.* *164*, 661–666.
- Woznica, A., Haeussler, M., Starobinska, E., Jemmett, J., Li, Y., Mount, D., and Davidson, B. (2012). Initial deployment of the cardiogenic gene regulatory network in the basal chordate, Ciona intestinalis. *Dev. Biol.* *368*, 127–139.
- Wykosky, J., Palma, E., Gibo, D.M., Ringler, S., Turner, C.P., and Debinski, W. (2008). Soluble monomeric EphrinA1 is released from tumor cells and is a functional ligand for the EphA2 receptor. *Oncogene* *27*, 7260–7273.
- Yagi, K., Takatori, N., Satou, Y., and Satoh, N. (2005). Ci-Tbx6b and Ci-Tbx6c are key mediators of the maternal effect gene Ci-macho1 in muscle cell differentiation in Ciona intestinalis embryos. *Dev. Biol.* *282*, 535–549.
- Yang, Y., Han, S.M., and Miller, M.A. (2010). MSP hormonal control of the oocyte MAP kinase cascade and reactive oxygen species signaling. *Dev. Biol.* *342*, 96–107.
- Yasuo, H., and Hudson, C. (2007). FGF8/17/18 functions together with FGF9/16/20 during formation of the notochord in Ciona embryos. *Dev. Biol.* *302*, 92–103.
- Yoshida, S., Marikawa, Y., and Satoh, N. (1998). Regulation of the trunk-tail patterning in the ascidian embryo: a possible interaction of cascades between lithium/beta-catenin and localized maternal factor pem. *Dev. Biol.* *202*, 264–279.
- Zimmer, M., Palmer, A., Köhler, J., and Klein, R. (2003). EphB–ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat. Cell Biol.* *5*, 869–878.