

Rôle des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours du développement embryonnaire de Xenopus laevis

Maëlle Duperray

► To cite this version:

Maëlle Duperray. Rôle des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours du développement embryonnaire de Xenopus laevis. Génétique. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0750 . tel-01714572

HAL Id: tel-01714572 https://theses.hal.science/tel-01714572

Submitted on 21 Feb 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE PRESENTEE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité Génétique

Par Maëlle DUPERRAY

Rôle des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours du développement embryonnaire de *Xenopus laevis*

Sous la direction de Benoît PINSON

Soutenue le 01 décembre 2017

Membres du jury :

M. ARVEILER Benoît M. CHANOINE Christophe M. RIOU Jean-François Mme. GRIFONE Raphaëlle Mme. MASSÉ Karine M. PINSON Benoît Professeur Professeur Chargé de recherche Maître de conférence Maître de conférence Directeur de recherche Bordeaux Paris Paris Paris Bordeaux Bordeaux Président du jury Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Directeur de thèse

Rôle des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours du développement embryonnaire de *Xenopus laevis*.

La voie de biosynthèse des purines est une voie métabolique conservée et essentielle. Chez l'Homme, des mutations dans plusieurs gènes impliqués dans cette voie provoquent de sévères maladies neuro-musculaires à composante développementale. Cependant, le lien entre génotypes et phénotypes n'est pas connu. Afin de mieux comprendre le rôle des gènes de la voie des purines au cours du développement, nous avons utilisé Xenopus laevis comme modèle vertébré. Les principaux gènes de la voie des purines du xénope n'étaient pas connus, ils ont donc tout d'abord été identifiés in sillico, puis les fonctions enzymatiques pour lesquels ils codent ont été validées in vivo en système hétérologue chez S. cerevisiae. Des analyses d'expression spatiotemporelle chez l'embryon de xénope ont montré que ces gènes sont exprimés tout au long du développement et en particulier dans les tissus neuromusculaires, suggérant un rôle dans le développement de ces tissus. Le knock-down des gènes, ppat, hprt ou adsl, trois gènes clés de la voie des purines, conduit dans chaque cas à de sévères altérations des muscles squelettiques et en particulier des somites et des muscles hypaxiaux des embryons. Ces phénotypes musculaires sont la conséquence d'une altération précoce de l'expression des gènes MRF (Myogenic Regulatory Factors) myoD et myf5. Un défaut de migration des myoblastes précurseurs des muscles hypaxiaux a également été mis en évidence. Pour conclure, X. laevis est un modèle pertinent qui apporte de nouvelles connaissances permettant de mieux comprendre la cause des altérations musculaires développementales associées aux déficiences en purines.

Mots clés : Purines, Développement, Xenopus laevis, Muscles

Role of purine biosynthesis genes during Xenopus laevis embryogenesis.

The purine biosynthesis pathway is a conserved metabolic pathway essential for many cell functions. In Human, several mutations in genes involved in this pathway lead to severe neuromuscular diseases, which are at least in part caused by unknown developmental impairments. We established a Xenopus laevis model to decipher the role of the purine biosynthesis genes during vertebrate development. As no data was available regarding this pathway, the main Xenopus purine genes were first identified in silico and functionally validated in vivo using the yeast Saccharomyces cerevisiae as a heterologous system. Spatiotemporal analyses revealed that these genes are expressed all along the development, especially in neuromuscular tissues, suggesting an important role during their formation. The knock-down of *ppat, adsl* or *hprt*, three key purine genes, leads in each case to severe defects in skeletal muscles embryonic defects, in particular in somites and hypaxial muscles. These muscular phenotypes are the consequence of an early alteration in expression of some crucial Myogenic Regulatory Factors (MRF), such as myoD and myf5. Moreover, an alteration of the hypaxial muscles precursors was observed. In conclusion our results establish X. laevis as an ideal model to get new insights into the neuromuscular developmental alterations associated to purine deficiencies.

Keywords: Purines, Development, Xenopus laevis, Muscles

Unité de recherche

[Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, 1, rue Camille Saint Saëns, CS 61390, 33077 Bordeaux Cedex]

Remerciements

Je voudrais remercier ici chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué de près comme de loin, à l'aboutissement de ce projet.

Tout d'abord, merci à Bertrand Daignan Fornier, qui a accepté que je réalise ma thèse au sein de son équipe de recherche.

Je tiens ensuite à remercier tout particulièrement Benoît Pinson mon directeur de thèse, pour sa bienveillance, sa disponibilité et son enthousiasme. Merci pour la grande confiance que tu m'as accordée, tes nombreux encouragements, pour tout le temps que tu m'as consacré et ta grande rigueur scientifique de laquelle j'ai énormément appris.

Un grand merci à Karine Massé qui a joué un rôle très important pendant ma thèse. Merci avant tout pour ton investissement dans ce projet et ta participation importante à la supervision de ma thèse et aux expérimentations. Merci de m'avoir fait découvert l'univers du modèle xénope et pour tous tes conseils.

Merci à Camille B. toujours disponible pour apporter son aide et répondre aux questions et qui a grandement participé à ma formation technique au début de ma thèse.

Merci aussi à Christelle S.M. pour sa participation à ce projet et pour son écoute et sa bonne humeur.

Merci à José G. pour les nombreuses discussions et débats scientifiques ou non et Michel M. pour sa gentillesse et ses conseils. Merci aussi à Johanna C. et Chloé P. pour leur soutien et leurs nombreux conseils et à Roxane M. pour tous les bons moments passés. Merci également à Marion B. pour ses nombreux encouragements.

Un grand merci à Laetitia G., collègue mais amie avant tout, dont la présence et le soutien ont été d'une très grande importance. Merci d'avoir été là à tous les moments et de m'avoir aidée de nombreuses façons.

Je remercie aussi tous les membres de l'étage pour la bonne humeur générale, l'entraide et tous les bons moments partagés ainsi que les personnes que j'ai pu côtoyer pendant ces trois années et qui m'ont apporté d'une manière ou d'une autre, leur soutien et leur aide.

Un énorme merci à ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée tout au long de mon parcours et à mes amis pour leur présence.

Enfin, merci à Quentin qui m'a énormément soutenue. Merci pour tout ce que tu m'apporte au quotidien et pour la patiente et la compréhension incroyable dont tu as su faire preuve pendant cette dernière année.

Table des matières

Table des abréviations11				
Table des Illustrations13				
INTRODUCTION	17			
I. La voie de biosynthèse des purines	19			
I.1 La synthèse des purines	19			
I.2 La régulation de la synthèse des purines	19			
II. Les pathologies associées à la voie de biosynthèse des purines	23			
II.1 Présentation des différentes pathologies humaines	23			
a. Les pathologies dont l'étiologie des symptômes est connue	23			
b. Les pathologies dont l'étiologie des symptômes n'est pas connue	24			
c. Caractéristiques communes des pathologies du deuxième groupe	26			
II.2 Les modèles animaux de ces pathologies	27			
a. La drosophile	27			
b. Le poisson zèbre	27			
c. La souris	28			
d. Mise en place d'un nouveau modèle de développement	29			
III. Xenopus laevis comme modèle de développement	31			
III.1 Le développement de <i>X. laevis</i>	31			
III.2 Etudier la fonction d'un gène chez X. laevis	35			
a. Le génome de <i>X. laevis</i>	35			
b. Expériences de <i>knock-down</i>	35			
IV. La myogenèse chez Xenopus laevis	37			
IV.1 Les facteurs MRF	39			
IV.2 Mise en place du mésoderme paraxial	41			
a. Induction du mésoderme	41			
b. Le mésoderme paraxial	41			
IV.3 La somitogenèse	43			
IV.4 La formation des muscles hypaxiaux	43			
V. Le projet de thèse	45			
RESULTATS	47			
I. Caractérisation de la voie de biosynthèse des purines chez le xénope	49			

I.1	Identification bioinformatique des gènes	49
1.2	Validation fonctionnelle	52
a.	Clonage des gènes de X. laevis	52
b.	Tests fonctionnels in vivo	53
1.3	Expression au cours de l'embryogenèse	57
a.	Profils d'expression temporelle	57
b.	Profils d'expression spatiale	61
II. Implica l'embryog	tion des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours de enèse	69
ll.1 purir	Phénotypes morphologiques associés au <i>knock-down</i> de gènes de la voie des nes	; 71
a.	Phénotypes de taille	71
b.	Phénotypes oculaires	73
C.	Phénotypes de courbure	73
d.	Sauvetages phénotypiques	75
e.	Conclusion sur les phénotypes morphologique	77
II.2 purir	Phénotypes musculaires associés au <i>knock-down</i> de gènes de la voie des nes	77
a.	Altération des somites	81
b.	Altération des muscles hypaxiaux	85
III. Implica <i>laevis</i>	tion de la voie de biosynthèse des purines dans la myogenèse chez <i>Xenopus</i>	89
III.1	Altération du mésoderme paraxial	89
111.2	Implication dans la formations des muscles hypaxiaux	95
DISCUSSIC	DN ET PERSPECTIVES 1	.01
I. La voie <i>laevis</i>	de biosynthèse des purines est fonctionnelle au cours du développement de 1	<i>X.</i> 103
I.1	Identification des gènes codant les enzymes de la voie des purines1	.03
1.2	Expression des gènes de la voie des purines chez l'embryon de xénope 1	.04
a.	Elaboration d'une carte comparative d'expression spatio-temporelle 1	.04
b.	Hypothèse de régulation transcriptionnelle1	.05
II. Les gèn xénope	ies de la voie de biosynthèse des purines sont essentiels au développement d 1	u 108
II.1 injec	Avantages et limites des pertes de fonction partielles (<i>knock-down</i>) par tion de morpholinos1	108
11.2	Un rôle pléiotrope dans le développement embryonnaire1	10
a.	Rôle dans la formation des somites1	10

b. Rôle dans la formation des muscles hypaxiaux	112
c. Autres rôles dans le développement	113
II.3 Implication des purines dans les phénotypes des morphants	115
III. Xenopus laevis, nouveau modèle vertébré pour l'étude du rôle développemental de gènes de la voie des purines	s 117
III.1 Vers une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les pathologies de la voie de biosynthèse des purines	117
III.2 Vers une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement embryonnaire	118
Conclusion	121
MATERIEL ET METHODES	123
I. Liste des plasmides utilisés	124
II. Identification bioinformatiques des gènes de X. laevis	126
III. Manipulations d'acides nucléiques	126
III.1 Clonages	126
III.2 Traduction <i>in vitro</i>	127
III.3 Extraction des ARN totaux de xénope	127
III.4 Réactions de RT-PCR	129
IV. Western blot	129
V. Tests de complémentation chez la levure	130
V.1 Milieux de culture et souches	130
V.2 Transformation des levures et tests de croissance	130
VI. Manipulation d'embryons	131
VI.1 Fécondation in vitro, micro-injection et culture d'embryons	131
VI.2 Fixation et révélation de l'activité β-galactosidase	131
VII. Hybridation <i>in situ</i> des embryons	132
VII.1 Préparations préliminaires	132
VII.2 Protocole d'hybridation	133
VIII. Immuno-marquage des embryons	134
IX. Observations et acquisitions d'images	134
X. Analyses statistiques	135
Références bibliographiques	137
ANNEXES	149
Analyses bioinformatiques effectuées pour l'identification des gènes de la voie des	
purines de X. laevis : exemple du gène ppat	150

Carte du plasmide pCM189 utilisé lors des tests de complémentation fonctionnelle 153
Séquences des sondes utilisées lors des hybridations <i>in situ</i> des gènes de la voie des purines chez le xénope154
Profils d'expression spatiale des gènes de la voie des purines : contrôle des hybridations <i>in situ</i> (sonde sens)
Profils d'expression spatiale des gènes de la voie des purines : images complémentaires
Site de fixation des morpholinos à disposition163
Expression temporelle des gènes de la voie des purines de Xenopus laevis 164
Communications scientifiques effectuées lors de la thèse

Table des abréviations

- ADA : Adénosine DésAminase
- ADK : ADénosine Kinase
- ADSL : ADenyloSuccinate Lyase
- ADSS : ADényloSuccinate Synthase
- AICAR : AminoImidazole Carboxamide Riboside
- AIRC : AminoImidazole Ribonucléotide Carboxylase
- AIRS : AminoImidazole Ribonucléotide Synthase
- AMPD : AMP Désaminase
- APRT : Adénine PhosphoRibosyl Transférase
- ATIC : Aminoimidazolecarboxamide ribonucléotide formylTransférase / IMP Cyclohydrolase
- BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
- DHA : DiHydroxyAdénine
- FB : ForeBrain
- FGF : Fibroblast Growth Factor
- GARS : GlycinAmide Ribnucléotide Synthase
- GART : phosphoribosylGlycinAmide formylTransférase
- GDA : Guanine DésAminase
- GMP : Guanosine MonoPhosphate
- **GMPS : GMP Synthase**
- GTP : Guanosine TriPhosphate
- H(G)PRT : Hypoxanthin (Guanine) PhosphoRibosyl Transférase
- HPIC : Chromatographie Ionique Haute Performance
- IMP : Inosine MonoPhosphate
- IMPDH : IMP DéHyodrogénase
- KD : Knock-Down
- KO : Knock-Out
- MBT : Transition Mid-Blastuléenne
- MFB : Midbrain-Forebrain Boundary
- MHB : Midbrain-Hindbrain Boundary
- MIF : Facteurs d'Induction du Mésoderme
- MO : MOrpholino
- MRF : Myogenic Regulatory Factor

- PAICS : PhosphoribosylAminoimIdazole Carboxylase / SZMP Synthétase
- PFAS : PhosphoribosylFormylglycinAmidine Synthase
- PNP : Purine Nucléoside Phosphorylase
- PPAT : PhosphoribosylPyrophosphate AmidoTransférase
- PRPP : PhosphoRibosylPyroPhosphate
- **PRPPS** : **PRPP** Synthase
- PRT : PhosphoRibosyl Transférase
- PSM : Mésoderme PréSomitique
- S-Ado : Succinyl-Adénosine
- SAICAR : Succinyl AminoImidazole Carboxamide Riboside
- S-AMP : Succinyl-AMP
- SZMP : Succinyl Amino-Imidazole Carboxamide ribonucléotide MonoPhosphate
- $TGF-\beta$: Transforming Growth Factor β
- VO : Vésicule Otique
- XO : Xanthine Oxidase
- ZM : Zone Marginale
- ZMC : Zone Marginale Ciliaire de l'oeil
- ZMP : AminoImidazole Carboxamide ribonucléotide MonoPhosphate

Table des Illustrations

Figures :

Figure 1 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des purines chez l'Homme
Figure 2 : Le cycle de développement de <i>Xenopus laevis</i>
Figure 3 : La mise en place des axes de polarité chez <i>Xenopus laevis</i>
Figure 4 : La gastrulation chez <i>Xenopus laevis</i>
Figure 5 : Le caryotype de <i>Xenopus laevis</i>
Figure 6 : Structure et mode d'action des morpholinos de traduction et d'épissage 34
Figure 7 : Devenir des blastomères du stade 8 cellules de Xenopus laevis
Figure 8 : Schéma simplifié d'une section transversale d'un somite de Xenopus laevis 36
Figure 9 : Représentation schématique de l'expression des « <i>Myogenic regulatory factors</i> » au cours des trois vagues myogéniques chez <i>Xenopus laevis</i>
Figure 10 : La spécification du mésoderme chez Xenopus laevis
Figure 11 : La myogenèse médiane et latérale chez Xenopus laevis
Figure 12 : Segmentation et rotation des somites chez le xénope
Figure 13 : La croissance des somites antérieurs de <i>Xenopus laevis</i>
Figure 14 : La formation des muscles hypaxiaux de <i>Xenopus laevis</i>
Figure 15 : Validations fonctionnelles <i>in vivo</i> de l'activité des enzymes de la voie de biosynthèse des purines identifiées <i>in sillico</i> chez <i>Xenopus laevis</i>
Figure 16 : La voie de biosynthèse des purines chez <i>Xenopus laevis</i> 58
Figure 17 : Profils d'expression temporelle des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours du développement de <i>X. laevis</i>
Figure 18 : Mise en évidence de la protéine Atic au cours du développement de <i>Xenopus laevis</i>
Figure 19 : Profil d'expression spatiale des gènes de la voie de biosynthèse des purines de Xenopus laevis
Figure 20 : Expression spatiale des gènes de la voie de biosynthèse des purines au stade bourgeon caudal tardif
Figure 21 : Les morpholinos <i>adsl, ppat</i> et <i>hprt</i> inhibent la traduction des transcrits cibles.
Figure 22 : Site d'injection des morpholinos70
Figure 23 : Le <i>knock-down</i> des gènes <i>adsl, ppat</i> ou <i>hprt</i> induit une diminution de la taille des embryons70
Figure 24 : Le <i>knock-down</i> des gènes <i>adsl</i> ou <i>hprt</i> induit des altérations oculaires chez les embryons

Figure 25 : Le <i>knock-down</i> des gènes <i>adsl, ppat</i> ou <i>hprt</i> provoque une courbure significative du côté injecté des embryons74
Figure 26 : La surexpression de <i>hprt</i> entraîne des phénotypes comparables à sa perte de fonction
Figure 27 : Altération de la somitogenèse chez les morphants <i>adsl</i> au stade jeune bourgeon caudal
Figure 28 : Altération de la somitogenèse chez les morphants <i>adsl</i> au stade bourgeon caudal tardif
Figure 29 : Altération de la somitogenèse chez les morphants <i>ppat</i> au stade jeune bourgeon caudal
Figure 30 : Altération de la somitogenèse chez les morphants <i>ppat</i> au stade bourgeon caudal tardif
Figure 31 : Altération de la somitogenèse chez les morphants <i>hprt</i> au stade jeune bourgeon caudal
Figure 32 : Altération de la somitogenèse chez les morphants <i>hprt</i> au stade bourgeon caudal tardif
Figure 33 : Implication du gène <i>adsl</i> dans la formation des muscles hypaxiaux
Figure 34 : Implication du gène <i>ppat</i> dans la formation des muscles hypaxiaux
Figure 35 : Implication du gène <i>hprt</i> dans la formation des muscles hypaxiaux
Figure 36 : La formation du mésoderme n'est pas affectée chez les morphants <i>ppat, adsl</i> et <i>hprt</i> 90
Figure 37 : Altération du mésoderme paraxial chez les morphants adsl
Figure 38 : Altération de l'expression de <i>myoD</i> chez les morphants <i>adsl</i> au stade jeune bourgeon caudal
Figure 39 : Altération de l'expression de <i>myf5</i> chez les morphants adsl au stade jeune bourgeon caudal
Figure 40 : Altération de l'expression des gènes <i>myoD</i> et <i>myogénine</i> au niveau des muscles hypaxiaux des morphants <i>adsl</i>
Figure 41 : Le knock-down d'adsl retarde la migration des myoblastes à l'origine des muscles hypaxiaux
Figure 42 : Le retard de migration des myoblastes n'est pas la seule cause aux défauts hypaxiaux observés chez les morphants <i>adsl</i>
Figure 43 : Représentation schématique de l'hypothèse de régulation de la voie des purines au niveau transcriptionnelle

Tableaux :

Tableau 1 : Caractéristiques des principales pathologies associées à la voie de biosynthèse
des purines chez l'Homme22
Tableau 2 : Liste des principaux gènes de la voie des purines de Xenopus laevis identifié
in sillico

Tableau 3 : Pourcentage d'homologie des protéines de la voie des purines de <i>Xenopus</i> <i>laevis</i> avec celles de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Xenopus tropicalis</i> et <i>Homo sapiens</i>
Tableau 4 : Récapitulatif des résultats de validation fonctionnelle des gènes de la voie debiosynthèse des purines de Xenopus laevis.56
Tableau 5 : Récapitulatif des profils d'expression spatiale des gènes de la voie des purinesau cours du développement de Xenopus laevis64
Tableau 6 : Nombre de gènes et d'homéologues identifiés au cours de ce travail102
Tableau 7 : Liste et caractéristiques des plasmides utilisés lors de ce travail
Tableau 8 : Détail expérimental ayant permis de générer les ARN in vitro
Tableau 9 : Conditions d'amplification utilisées lors des RT-PCR. 128
Tableau 10 : Caractéristiques des souches de levures utilisées lors de ce travail
Tableau 11 : Détail expérimental ayant permis de générer les sondes d'hybridation in situ 132

INTRODUCTION



Figure 1 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des purines chez l'Homme.

Les gènes impliqués sont représentés en violet et les métabolites en noir. Les flèches rouges représentent les étapes affectées par une des pathologies humaines connues. ADA : Adénosine DésAminase. ADK : ADénosine Kinase. ADSL : ADenyloSuccinate Lyase. ADSS : ADényloSuccinate Synthase. AICAR : AminoImidazole Carboxamide Riboside. AMPD : AMP Désaminase. APRT : Adénine PhosphoRibosyl Transférase. ATIC : Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide formylTransférase / IMP Cyclohydrolase. GART : phosphoribosyl -GlycinAmide formylTransférase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosyl aminoimidazole synthetase. GDA: Guanine DésAminase. GMPS: GMP Synthase. HGPRT: Hypoxanthine Guanine PhosphoRibosyl Transférase. IMP : Inosine MonoPhosphate. IMPDH : IMP DéHyodrogénase. N : purine Nucléotidase. PAICS : PhosphoribosylAminoimIdazole Carboxylase / SZMP Synthetase. PFAS : PhosphoribosylFormylglycinAmidine Synthase. PNP : Purine Nucléoside Phosphorylase. PPAT : PhosphoribosylPyrophosphate AmidoTransférase. PRPP : PhosphoRibosylPyroPhosphate. PRPPS : PRPP Synthase. S-Ado : Succinyl-Adénosine. SAICAR : Succinyl AminoImidazole Carboxamide Riboside. S-AMP : Succinyl-AMP. (S)ZMP : (Succinyl) Amino-Imidazole Carboxamide ribonucléotide monophosphate. XO: Xanthine Oxidase.

I. La voie de biosynthèse des purines

I.1 La synthèse des purines

Les purines sont des molécules essentielles puisqu'elles participent à de multiples fonctions cellulaires. L'Adénosine TriPhosphate (ATP) et la Guanosine TriPhosphate (GTP) par exemple, sont des constituants des acides nucléiques (ADN, ARN), support de l'information génétique. Ce sont également les principaux donneurs de phosphate et la principale source d'énergie pour la cellule. De plus, les purines sont des précurseurs dans la formation de molécules intervenant dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaires (Guanosine ou Adénosine MonoPhosphate cyclique par exemple) ou qui participent à de très nombreuses réactions enzymatiques en tant que cofacteurs (NAD, coenzyme A, ...) [Theodoulou, 2014 ; Sultani 2017]. Les purines sont donc impliquées dans de nombreux processus cellulaires, tels que la division ou la mobilité cellulaire, la transcription, la traduction ou encore le transport. Enfin, chez les animaux, les purines extracellulaires (ATP, ADP, adénosine) sont activatrices de la voie de signalisation purinergique, voie qui est impliquée dans de très nombreux processus physiologiques (neurotransmission, sécretion, réponse immunitaire, prolifération cellulaire ou encore régénération tissulaire) [Abbracchio, 1998 ; Burnstock, 2011].

Les purines sont synthétisées dans la cellule par la voie de biosynthèse des purines (que nous abrégerons par la suite voie des purines) et dont les principales étapes décrites chez l'Homme sont représentées en Figure 1. Elle se divise en deux parties : la voie *de novo* et la voie de recyclage [Berg, 2002]. La voie *de novo* est entièrement conservée au sein de l'évolution et permet la synthèse d'Inosine MonoPhosphate (IMP) en dix étapes enzymatiques, à partir du Phosphoribosyl Pyrophosphate (PRPP). La voie de recyclage permet une inter-conversion entre les différentes bases, nucléosides et nucléotides puriques, principalement issus de la dégradation des acides nucléiques mais aussi de l'alimentation, du milieu extracellulaire ou de la voie *de novo* (IMP). Ce recyclage aboutit à la formation d'Adénosine MonoPhosphate (AMP) et de Guanosine MonoPhosphate (GMP). Malgré l'existence de quelques réactions espèce-spécifiques, la quasi totalité de la voie de recyclage est également conservée de la bactérie à l'Homme [Ljungdahl et Daignan-Fornier, 2011 ; Balasubramaniam, 2014].

Afin de maintenir les pools intracellulaires en purines et l'homéostasie de la cellule, l'utilisation concertée de la voie *de novo* et de la voie de recyclage doit être finement régulée.

I.2 La régulation de la synthèse des purines

La régulation de la voie de biosynthèse des purines a été largement étudiée chez les micro-organismes tels que les bactéries ou les levures. En effet, ce sont des modèles unicellulaires avec de nombreux outils génétiques à disposition et la possibilité de contrôler les concentrations en purines contenus dans le milieu de culture. Grâce à ces avantages, la voie de biosynthèse des purines a pu être très bien caractérisée et les mécanismes impliqués dans la régulation de cette voie chez ces modèles ont pu être mis en évidence.

Chez les bactéries, les gènes de la voie *de novo* sont pour la plupart en opérons et l'ensemble des gènes est co-régulé [Rolfes, 2006]. Différents mode de régulation ont pu être mis en évidence en fonction de l'espèce. Par exemple, chez *Bacillus subtilis*, l'opéron « *pur* »

Introduction

contenant les gènes de la voie de novo est réprimé de façon constitutive par le répresseur PurR. Cette répression est levée par le PRPP qui favorise la dissociation entre PurR et l'ADN, permettant la transcription des gènes de l'opéron [Weng, 1995]. Chez Lactococcus lactis, PuR fonctionne de manière opposé par rapport à B. subtilis, puisque sa fixation au PRPP lui permet de jouer son rôle d'activateur de la transcription des gènes de la voie de novo [Bera, 2003]. Enfin, chez Escherichia coli, la protéine PurR agit comme répresseur de la transcription grâce à la fixation de la guanine et de l'hypoxanthine [Rolfes, 1990]. En plus de ces différents modes de régulation, il existe également un mécanisme de régulation conservé. Un intermédiaire métabolique de la voie *de novo* : l'AminoImidazole Carboxamide ribonucléotide MonoPhosphate (ZMP) (Figure 1) régule la transcription de certains gènes par une modification de la structure secondaire de l'ARN, un « riboswitchs », qu'il fixe directement [Kim, 2015]. La majorité des gènes négativement régulés par la fixation du ZMP sur le « riboswitch » identifié chez de très nombreuses espèces bactériennes [Weinberg, 2010], sont des gènes directement impliqués dans la biosynthèse des purines ou des gènes associés à cette biosynthèse comme par exemple ceux impliqués dans la génération du 10formyl-tetrahydrofolate, molécule qui sert de cofacteurs dans plusieurs réactions de la biosynthèse des purines.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les gènes *ADE*, qui codent les enzymes de la voie des purines, sont sous le contrôle des facteurs de transcription Bas1p et Pho2p [Daignan-Fornier et Fink, 1992]. L'interaction de ces facteurs, indispensable à leur rôle d'activateur de la transcription, est stimulée par la fixation du Succinyl ZMP (SZMP) [Rébora, 2001] et du ZMP [Rébora, 2005 ; Pinson, 2009]. La transcription du gène codant l'enzyme IMPDH impliquée dans la synthèse du GMP, est quant à elle inhibée par la Guanosine DIPhosphate (GDP) [Escobar-Henriques, 2000].

Chez toutes ces espèces, bactéries et levures, la transcription des gènes de la voie des purines est donc régulée en fonction de la teneur en purines intra-et/ou extra-cellulaires. En particulier, malgré différents mécanismes mis en évidence, la transcription des gènes codant les enzymes de la voie de novo est inhibée lorsque les produits finaux augmentent. De plus, le ZMP est capable d'inhiber la transcription des gènes de la voie des purines. Ainsi, lorsque le flux de la voie de novo est ralenti, la concentration intracellulaire de ZMP diminue, entrainant une levée de l'inhibition de la transcription de ces gènes. Les mécanismes mis en jeu dans cette levée d'inhibition sont très différents entre la bactérie et la levure mais le ZMP possède un statut clé dans la régulation transcriptionnelle des gènes de la voie des purines. Un autre mode de régulation conservée chez ces espèces concerne la régulation de la voie de novo au niveau enzymatique. En particulier, l'ATP est capable d'inhiber l'activité de la première enzyme de la voie de novo : la Phosphoribosyl Pyrophosphate AmidoTransférase (PPAT) [Rebora, 2001; Rolfes, 2006]. De ce fait, chacun des différents mécanismes identifiés chez la bactérie et la levure permettent de réguler la voie des purines au niveau transcriptionnel et au niveau enzymatique par plusieurs boucles de rétroinhibition/activation.

Chez les eucaryotes multicellulaires, les mécanismes de régulation sont peu connus. Quelques études ont été réalisées sur modèles cellulaires animaux. Il a en particulier été montré que les purines produites et notamment l'AMP et le GMP, rétro-inhibent l'activité enzymatique de PPAT [Yamaoka, 2001]. A l'inverse, le flux de la voie de recyclage est ralenti par la consommation importante du PRPP par PPAT. Le PRPP n'est alors plus disponible pour les enzymes Adénine PhosphoRibosyl Transférase (APRT) et Hypoxanthine Guanine PhosphoRibosyl Transférase (HGPRT) de la voie de recyclage qui l'utilisent comme cofacteur (Figure 1) [Yamaoka, 2001]. L'utilisation de la voie *de novo* ou de la voie de recyclage est

Tableau 1 : Caractéristiques des principales pathologies associées à la voie de biosynthèse des purines chez l'Homme.

En vert les pathologies dont l'étiologie et connue et en bleu les pathologie pour lesquelles les mécanismes en jeu sont peu connus. Pour les abréviations, se référer à la table des abréviations. Sont répertoriées les caractéristiques communément admises.

Nom de la maladie	Numéro Orphanet	Gène muté	Prévalence	Symptômes	Causes	Traitements
Déficience en APRT	ORPHA:976	APRT	1/10 000 à 100 000 naissances	Troubles rénaux	Accumulation toxique de DHA	Inhibiteur de la XO
Déficience en ADA	ORPHA:277	ADA	1/100 000 à 500 000 naissances	Immunodéficience et anomalies osseuses	Accumulation toxique de déoxyATP	Transplantation de moelle osseuse et/ou supplémentation enzymatique
Déficience en PNP	ORPHA:760	PNP	?	Immunodéficience et anomalies neurologiques	Accumulation toxique de déoxyGTP	Transplantation de moelle osseuse
Déficience en myoadénylate désaminase	ORPHA:45	AMPD1	?	Faiblesse musculaire, crampes et myalgie à l'effort	Défaut de recyclage de l'AMP	Non
Maladie de Lesch-Nyhan	ORPHA:510	HPRT	1/380 000 naissances	Retard psychomoteur, dystonie, agressivité, automutilation et hyperuricémie	?	Inhibiteur de la XO et quelques autres pistes
Déficience en ADSL	ORPHA:46	ADSL	Une centaine de cas décrits	Retard de croissance, retard psychomoteur, troubles autistiques et hypotonie	?	Non
AICARibosidurie	ORPHA:250977	ATIC	Un cas décrit	Retard mental, cécité, dysmorphie et hypotonie	?	Non
Déficience en ADK	ORPHA:289290	ADK	?	Encéphalopathie, dysfonction du foie, retard psychomoteur, épilepsie, dysmorphie, hypotonie et faiblesse musculaire	?	Non
Superactivité de la PRPP Synthase	ORPHA:411543	PRPP	<1/1 000 000	Surdité, hypotonie, ataxie, atrophie optique, retard mental et hyperuricémie	?	Inhibiteur de la XO
Syndrome de Arts (déficience en PRPP synthase)	ORPHA:1187	synthase	<1/1 000 000	Surdité, hypotonie, ataxie, atrophie optique et retard psychomoteur	?	Non

donc régulée par la disponibilité en purines intracellulaires. De très nombreuses études sur différents types cellulaires montrent que la synthèse *de novo* est plus active en prolifération que dans les cellules différenciées [Natsumeda, 1989; Rowe et McEwen, 1983]. Ceci probablement pour permettre de synthétiser les purines nécessaires au cours du cycle cellulaire [Yamaoka, 1997]. La voie *de novo* est d'ailleurs nécessaire au développement de l'embryon préimplantatoire de souris en culture [Alexiou et Leese, 1992]. Pour finir, plusieurs facteurs de croissance ou d'hormones [Wang, 2009] sont impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse des purines. Par exemple, le traitement de kératinocytes en culture par de l'*epidermal growth factor* (EGF) ou du *keratinocytes growth factor* (KGF), qui stimule la migration et la prolifération des cellules épithéliales [Werner, 1994] sont capables d'entrainer l'augmentation de la transcription des gènes de la voie *de novo* sur cellules humaines en culture [Gassmann 1999].

Ainsi, la régulation interconnectée de la voie *de novo* et de la voie de recyclage permet de maintenir la quantité nécessaire en purines, molécules indispensables au fonctionnement cellulaire. De ce fait, des altérations dans le fonctionnement de la voie des purines conduisent à de nombreuses pathologies chez l'Homme.

II. Les pathologies associées à la voie de biosynthèse des purines

II.1 Présentation des différentes pathologies humaines

Des mutations dans des gènes codant les enzymes de la voie des purines (en rouge sur la Figure 1) sont responsables de maladies génétiques rares, voire très rares, dont l'incidence est majoritairement inconnue mais très faible (Tableau 1). Les mutations décrites concernent l'ensemble de la voie de biosynthèse des purines. Une dizaine de pathologies différentes ont été décrites à ce jour [Nyhan, 2005; Van den Berghe, 2006; Balasubramaniam, 2014]. Les principales pathologies et leurs caractéristiques sont répertoriées dans le Tableau 1. Ici, elles ont arbitrairement été classées en deux groupes selon que l'étiologie des symptômes soit connue (groupe 1, en vert dans le Tableau 1), ou soit très peu voire pas connue (groupe 2, en bleu dans le Tableau 1).

a. Les pathologies dont l'étiologie des symptômes est connue

Les symptômes de la plupart de ces pathologies sont causés par l'accumulation anormale d'un ou plusieurs métabolite(s) dont la forte concentration est toxique. C'est le cas de la déficience en APRT [Bollée, 2010], la déficience en Adénosine DésAminase (ADA) [Bradford, 2017], ou la déficience en Purine Nucléoside Phosphorylase (PNP) [Fairbanks, 1990] (Figure 1 et Tableau 1).

Dans la déficience en APRT (Tableau 1), l'excès d'adénine est utilisé comme substrat alternatif de l'hypoxanthine et de la xanthine par la xanthine oxidase (XO) (Figure 1) pour former du dihydroxyadénine (DHA). Le DHA est insoluble et précipite dans les reins ce qui provoque alors de graves troubles rénaux. Ces troubles sont évitables par traitement à l'allopurinol ou le fébuxostat qui sont des inhibiteurs de la XO [Bollée, 2010].

L'ADA (Figure 1) catalyse la désamination de l'adénosine et la déoxyadénosine en inosine et déoxyinosine, respectivement. Dans le cas de la déficience en ADA (Tableau 1), l'adénosine et le déoxyadénosine sont métabolisés par l'adénosine kinase, entrainant une

accumulation de déoxyATP, toxique pour la différenciation des lymphocytes [Apasov, 2001]. En découle une importante immunodéficience et une malformation osseuse qui peuvent être traitées par transplantation de moelle osseuse et/ou remplacement enzymatique [Bradford, 2017].

Il en est de même pour la déficience en PNP (Tableau 1) qui provoque notamment un excès en déoxyguanosine métabolisé alors par la déoxycytidine kinase. Cela entraine une accumulation de déoxyGTP, toxique pour les thymocytes, cellules progénitrices des lymphocytes T [Fairbanks, 1990]. Cette toxicité spécifique est expliquée par le fait que les thymocytes sont les tissus dans lequel l'enzyme PNP est la plus exprimée et de ce fait dans lequel le déoxyGTP est retrouvé le plus accumulé. Les patients atteints de déficience en PNP présentent une immunodéficience et dans certain cas des anomalies neurologiques (retard psychomoteur et ataxie) [Somech, 2013].

Pour finir, une mutation du gène AMP Désaminase (AMPD1) (Figure 1), qui s'exprime spécifiquement dans le muscle, entraine une faiblesse musculaire ainsi que des crampes et myalgies à l'effort (Tableau 1) [Gross, 1997]. Cette pathologie se classe parmi les myopathies métaboliques car il est communément admis que ces symptômes sont liés au défaut de recyclage de l'AMP, nécessaire pour la contraction du muscle [Norman 2001]. En effet, la contraction musculaire qui consomme de l'ATP est inhibée par un ratio ATP/ADP élevé. Un moyen de diminuer l'accumulation d'ADP pendant l'exercice, est de cataboliser l'AMP en IMP par l'AMPD, afin de déplacer l'équilibre de la réaction catalysée par l'adénylate kinase (2 ADP = ATP + AMP) vers la formation d'ATP. Toutefois, alors que l'activité enzymatique d'AMPD1 diminue suite à la mutation du gène AMPD1, elle ne corrèle pas avec la gravité des symptômes [Norman 2001]. En fait, Il est estimé par de nombreuses études qu'entre 2 et 3 % de la population caucasienne est homozygote pour une mutation délétère dans le gène AMPD1, ce qui indique une proportion majeure d'individus asymptomatiques. La mutation du gène AMPD1 doit donc probablement être en association avec d'autres facteurs génétiques ou environnementaux pour que les symptômes musculaires se déclarent [Morisaki, 1992].

Toutes ces pathologies, assignées ici au groupe 1, affectent donc spécifiquement un tissu ou un type cellulaire particulier. Elles ont une étiologie connue et des traitements efficaces sont souvent disponibles. Ce n'est pas le cas pour les autres pathologies que nous avons ici classées dans le groupe 2 et dont les symptômes ont une étiologie très peu connue voire inconnue.

b. Les pathologies dont l'étiologie des symptômes n'est pas connue

Ces pathologies provoquent des symptômes de nature et de sévérité très hétérogènes et dont l'étiologie est peu connue. Elles sont associées à des mutations dans des gènes intervenant dans la voie *de novo* et dans la voie de recyclage (Figure 1). En particulier, il s'agit de la maladie de Lesch-Nyhan (déficience en HGPRT) [Bell, 2016], la déficience en ADenyloSuccinate Lyase (ADSL) [Jurecka, 2015], la déficience en Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide formylTransférase /IMP Cyclohydrolase (ATIC) [Marie, 2004], la déficience en Adénosine Kinase (ADK) [Bjursell, 2011] et la déficience ou superactivité de l'enzyme PRPP synthase [Duley, 2011] (Tableau 1).

L'une des pathologies les plus fréquentes de la voie des purines est la maladie de Lesch-Nyhan (Tableau 1) provoquée par une mutation du gène *HPRT* (Figure 1) et décrite pour la première fois par les auteurs Lesch et Nyhan [Lesch et Nyhan, 1964]. C'est une maladie rare liée à l'X qui touche majoritairement les garçons avec une prévalence estimée à

1/380 000 naissances [Bell, 2016]. Cette pathologie se caractérise par une surproduction d'acide urique, produit de dégradation de l'hypoxanthine et de la guanine (Figure 1), ce qui peut entrainer des crises de goutte et des atteintes rénales. Les patients présentent également dans les premiers mois de vie un retard psychomoteur, une dystonie et des comportements d'agressivité et d'automutilation dans les formes les plus graves. Les formes plus modérées, appelées variantes atténuées de Lesch-Nyhan, conduisent à des symptômes neurologiques et moteurs moins prononcés mais pas d'automutilation [Fu, 2014a]. Enfin, certaines formes bénignes ne manifestent qu'une hyperuricémie. L'activité résiduelle mesurée de l'enzyme HGPRT est variable en fonction du type cellulaire mais aussi du test utilisé. Par exemple, chez certains patients, l'activité résiduelle est non détectable dans un lysat d'érythrocytes alors qu'il y a une activité significative dans les érythrocytes ou les fibroblastes en culture [Sampat, 2011]. Toutefois, pour un même type cellulaire, II a été montré que l'activité résiduelle de l'enzyme corrèle avec la gravité de la pathologie [Fu, 2014b]. Plusieurs hypothèses d'un rôle des purines dans la physiopathologie de cette maladie on été émises comme un rôle des métabolites SZMP ou ZMP [López, 2008] ou de l'hypoxanthine [Torrez, 2006] retrouvés accumulés chez les patients. La recherche de métabolites significativement accumulés et/ou diminués sur des échantillons de patients a permis d'identifier des marqueurs métaboliques de cette pathologie mais n'a néammoins pas permis de mettre en évidence de métabolites dont la concentration corrèle avec la gravité des symptômes [Ceballos-Picot, 2015]. La cause métabolique associée aux symptômes reste donc inconnue. De nombreuses hypothèses ont été émises pour expliquer les symptômes comportementaux. L'hypothèse la plus répandue est la réduction de la quantité et de l'activité des fonctions dopaminergiques dans les noyaux gris centraux du cerveau qui est retrouvée chez les patients [Nyhan, 2000]. En effet, une déficience en HGPRT s'accompagne d'une dérégulation des voies impliquées dans le développement et la survie des neurones dopaminergiques [Ceballos-Picot, 2009; Guibinga, 2012]. Toutefois, les mécanismes impliqués sont mal compris et le lien entre la mutation du gène HPRT et les différents symptômes reste à élucider. La surproduction toxique d'acide urique est efficacement traitée par administration d'un inhibiteur de la XO (Figure 1). De nombreuses autres pistes thérapeutiques sont envisagées et certaines sont très prometteuses [Bell, 2016]. Elles se focalisent principalement sur les symptômes comportementaux. Pour le reste des atteintes, il n'existe pas de traitements efficaces à ce jour.

L'une des seules pathologies affectant une enzyme de la voie de novo (Figure 1) est la déficience en ADSL [Jeaken et Van Den Berghe, 1984] (Tableau 1). C'est une pathologie rare à transmission autosomique récessive provoquée par une mutation du gène ADSL. Les mutations décrites altèrent partiellement l'activité de l'enzyme ADSL [Race, 2000 ; Spiegel, 2006], conduisant à une accumulation plus ou moins importante des deux substrats déphosphorylés de l'enzyme dans les fluides corporels : le SuccinylAdénosine (S-Ado) et le Succinyl-Aminolmidazole Carboxamide Riboside (SAICAR) (Figure 1) [Spiegel, 2006]. A ce jour, près d'une centaine de cas dans le monde ont été identifiés [Jurecka, 2015]. Les patients présentent divers symptômes de sévérité très variable. Trois formes ont été définies selon les phénotypes cliniques observés. Tout d'abord, une forme très sévère avec un retard de croissance prénatal qui provoque une mort du nourrisson par encéphalopathie. [Mouchegh, 2007]. La deuxième forme correspond à une forme dite de type 1 qui est une forme sévère. Celle-ci provoque en général dans les premiers mois de la vie un retard psychomoteur, des troubles autistiques et un retard de croissance qui entraînent une mort précoce [Jurecka, 2015]. Enfin, le type 2 est une forme modérée qui se développe dans les premières années de la vie et qui se caractérise en général par un retard psychomoteur, des

25

Introduction

troubles autistiques, un retard de croissance et de l'hypotonie sévère. [Jaeken, 1988 ; Valik, 1997]. Malgré cette classification, la sévérité des atteintes se place en réalité sur un *continuum* avec une très grande hétérogénéité entre les patients. Ces symptômes s'accompagnent aussi souvent d'une dysmorphie, d'épilepsie, d'anomalies du cerveau, d'une faiblesse musculaire et d'amyotrophie. Les mécanismes pathologiques à la base des manifestations cliniques de la déficience en ADSL ne sont pas connus. La sévérité du retard psychomoteur semble corréler avec le rapport S-Ado/SAICAR [Race, 2000]. Il a donc été supposé un rôle du rapport de ces métabolites dans la physiopathologie de la déficience en ADSL. Une étude plus récente montre que la sévérité phénotypique est plutôt corrélée à l'activité enzymatique résiduelle et la stabilité structurelle de la protéine mutée [Zikanova, 2010]. Malgré cette corrélation, le lien entre le génotype et le phénotype des patients déficients en ADSL reste inconnu et aucun traitement n'existe à ce jour.

La seconde pathologie affectant une enzyme de la voie *de novo* implique une mutation dans le gène *ATIC* (Tableau 1). Cette pathologie décrite chez un seul patient dans la littérature [Marie, 2004] est appelée AICA-ribosidurie car elle se caractérise par une accumulation dans les fluides corporels de l'AICAR, le substrat déphosphorylé de l'enzyme ATIC (Figure 1). Cette pathologie provoque de nombreux symptômes dont les principaux sont un retard mental, une cécité, une hypotonie musculaire, de l'épilepsie et des caractéristiques dysmorphiques.

Parmi les autres pathologies associées à la voie des purines (Tableau 1), un déficit en ADK (Figure 1) se manifeste par une encéphalopathie, une dysfonction du foie, un retard psychomoteur, de l'épilepsie, une dysmorphie, de l'hypotonie et une faiblesse musculaire [Bjursell, 2011]. Pour finir, quelques rares patients sont atteints d'une déficience ou d'une suractivité de l'enzyme PRPP synthase, enzyme qui permet la formation du PRPP intervenant dans les réactions enzymatiques catalysées par PPAT, HGPRT et APRT (Figure 1). Ces pathologies provoquent une surdité, de l'hypotonie, de l'ataxie, une atrophie optique et un retard psychomoteur. Les patients atteints meurent précocement [Duley, 2011].

Malgré des différences claires entre ces pathologies, dîtes ici du deuxième groupe, elles présentent un certains nombre de similitudes.

c. Caractéristiques communes des pathologies du deuxième groupe

Le spectre clinique de ces pathologies est très divers. Il y a également une hétérogénéité très importante dans la nature et la gravité des symptômes au sein de chaque pathologie. Malgré cela, elles présentent un ensemble d'atteintes communes, notamment des atteintes neurologiques telles que des troubles du comportement ou des déficiences mentales, mais aussi des retards psychomoteurs, de développement ou encore des hypotonies et faiblesses musculaires. Ces pathologies atteignent donc le système nerveux et les muscles, ce que nous résumerons par la suite sous le terme neuro-musculaire.

Dans la plupart de ces pathologies, les symptômes neuro-musculaires se manifestent très précocement et sont parfois détectables *in utero* dans les cas les plus sévères [Mouchegh, 2007]. Cela suggère une composante développementale, c'est-à-dire que des défauts du développement embryonnaire sont au moins en partie en cause dans ces pathologies [Spiegel, 2006]. De plus, elles sont très handicapantes et l'espérance de vie est souvent faible allant de quelques jours à quelques années en fonction des cas. Des études chez les patients atteints de déficience en ADSL et de la maladie de Lesch-Nyhan montrent une activité enzymatique résiduelle et qui est en corrélation avec la sévérité des symptômes. Enfin, ces pathologies sont très rares d'une part et d'autre part, très peu de pathologies

concernant des enzymes de la voie *de novo* sont décrites, ce qui laisse penser qu'une altération de la fonction de ces enzymes est létale *in utero*. Toutes ces données suggèrent donc que les enzymes de la voie des purines sont essentielles au développement et notamment des tissus neuro-musculaires.

Le lien entre génotype et phénotype dans ces pathologies n'est pas connu. De surcroît, le nombre très faible de patients rend difficile les études. Quelques hypothèses sont émises pour expliquer les symptômes comportementaux de la maladie de Lesch-Nyhan [Nyhan, 2000], pathologie de la voie des purines la plus fréquente [Bell, 2016], mais les mécanismes physiopathologiques mis en jeu restent à découvrir. Dans le but de mieux comprendre ces pathologies, améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients et pour un jour pouvoir mettre en place des thérapies efficaces, il est tout d'abord primordial de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'apparition des symptômes dans ces maladies et notamment les altération du développement des tissus neuro-musculaires en cause. Dans ce but, différents modèles animaux ont été mis en place en particulier chez la drosophile, le poisson zèbre et la souris.

II.2 Les modèles animaux de ces pathologies

a. La drosophile

La drosophile est certainement le modèle animal qui a été le plus étudié en ce qui concerne les gènes de la biosynthèse des purines. Chez cet organisme, différents mutants de la voie *de novo* mais également de la voie de recyclage ont été caractérisés.

Une altération de la voie *de novo* conduit à des défauts développementaux et en particulier des défauts de formation des pattes, des soies et des ailes, ainsi qu'une réduction de la drosoptérine, pigment rouge oculaire de la drosophile. Ces phénotypes sont retrouvés chez les mutants des gènes codant pour les enzymes PPAT [Clark, 1994], PFAS [Johnstone, 1985; Tiong, 1989], GART [Johnstone, 1985; Tiong, 1990] et PAICS [O'Dennel, 2000] et regroupés sous le terme de « *purine syndrome phenotype »* [Tiong, 1990]. Pour les mutants des gènes codants PPAT, il a également été montré une réduction de la fertilité des femelles [Ji, 2006] avec une durée de vie raccourcie [Malmanche, 2004]. Les mutants de la voie de recyclage *impdh* et *gmps* présentent également des défauts au niveau du guidage des axones des photorécepteurs de l'œil [Long, 2006].

Tous ces mutants présentent une létalité pupale très importante qui est en corrélation avec l'activité résiduelle mesurée. Les individus qui survivent présentent un « purine syndrome » plus ou moins marqué [Clark, 1994]. Les gènes des purines ont donc un rôle développemental spécifique chez la drosophile mais les mécanismes en cause ne sont toujours pas connus.

b. Le poisson zèbre

Le poisson zèbre est un modèle de développement très utilisé. C'est un modèle simple d'utilisation avec de très nombreux avantages comme modèle de pathologies humaines [Amsterdam et Hopkins, 2006]. En particulier, les embryons sont accessibles et transparents, ce qui facilite les observations, et peuvent être produits en grand nombre [Ekker, 1991].

Un crible par mutagenèse insertionnelle a permis d'identifier *paics* et *adss* comme gène essentiels pour le développement des yeux chez l'embryon du poisson zèbre [Amsterdam, 2004]. Il existe également une étude chez le poisson zèbre dans laquelle

différents mutants insertionnels de la voie des purines ont été caractérisés. Les mutants *gart* et *paics* de la voie *de novo* ont des yeux plus petits et des défauts de pigmentation [Ng, 2009]. De plus, le *knock-down* de *gmps* dans la voie de recyclage entraîne des défauts de pigmentation et celui d'*adss*, une réduction de la taille de l'œil. Les auteurs associent le phénotype oculaire à un défaut de la biosynthèse de l'ATP qui entraîne une augmentation de la phase S du cycle et un défaut de sortie du cycle des rétinoblastes en prolifération dans l'œil. Les défauts de pigmentation sont quant à eux la résultante d'un déficit de biosynthèse du GTP, impliqués dans la synthèse des pigments du poisson [Lister, 2002]. Tous les embryons décrits ici présentent une létalité embryonnaire très importante. Aucun autre mutant de la voie des purines n'a, à notre connaissance, été décrit ni étudié chez le poisson zèbre.

c. La souris

La souris est un modèle mammifère largement utilisé comme modèle de pathologies humaines. Dans la littérature, des *knock-out* (KO) ont été décrits pour les gènes *Ada*, *Aprt*, *Pnp*, *Ampd1*, *Adk* et *Hprt*.

Les souris KO pour les gènes *Ada, Aprt, Pnp* et *Ampd1* reproduisent les symptômes cliniques présents chez les patients, qui sont atteints de pathologies associées ici au groupe 1 (voir paragraphe II.1a). En effet, les souris KO pour *Ada* et *Pnp* sont immunodéficientes [Blackburn, 1998; Somech, 2013], tout comme les patients déficients en ADA [Bradford, 2017] ou déficients en PNP [Fairbanks, 1990]. Les souris KO pour *Aprt* excrètent dans les urines de l'adénine et sa forme de dégradation insoluble, le DHA, qui provoque de graves dommages rénaux qui sont fatals en quelques mois [Redhead, 1996; Engle, 1996a]. Ce même phénotype est retrouvé chez les patients déficients en APRT [Bollée, 2010]. Ces souris *Ada, Aprt* et *Pnp* sont donc de bons modèles pour les pathologies humaines et ont d'ailleurs permis d'améliorer la compréhension des mécanismes en jeu. Enfin, les souris KO pour le gène *ampd1* sont asymptomatiques, comme c'est le cas dans la majorité des patients déficients en AMPD1 [Cheng, 2014].

Concernant les pathologies du deuxième groupe, seuls les modèles Hprt et Adk ont été décrits. Les souris KO pour Adk présentent essentiellement une stéatose hépatique sévère [Boison, 2002] tandis que les patients sont décrits comme effectivement atteints d'une dysfonction hépatique, mais présentent surtout de fortes atteintes neuro-musculaires. Les souris KO pour Hprt [Hooper, 1987; Kuehn, 1987] sont complètement viables avec toutefois une hyperuricémie et des phénotypes neurologiques mineurs. En particulier, les souris ont une diminution du niveau de dopamine dans les noyaux gris centraux du cerveau [Jinnah, 1994] comme c'est le cas chez les patients de la maladie de Lesch-Nyhan [Nyhan, 2000]. Un modèle de la maladie de Lesch-Nyhan a également été généré chez le rat et présente les mêmes phénotypes que le modèle souris [Meek, 2016]. Néanmoins, les patients atteints de la maladie de Lesch-Nyhan présentent de nombreux autres phénotypes graves (voir paragraphe II.1b). La voie de recyclage chez la souris étant plus dépendante de l'activité APRT que HPRT, contrairement à l'Homme [Wu et Melton, 1993], le KO de Hprt pourrait être compensé par l'activité APRT. Cependant, les souris double KO Aprt Hprt combinent les phénotypes respectifs des simples KO et ne permettent donc pas d'améliorer le modèle souris de la maladie de Lesch-Nyhan [Engle, 1996b] Ces modèles peuvent cependant permettre de mieux comprendre le lien entre une déficience en HPRT et les défauts du système dopaminergique [Jinnah, 2009]. Des phénotypes d'agressivité voire d'automutilation ont pu être observés sur un modèle pharmacologique chez le rat. Une destruction sélective des neurones dopaminergiques et noradrénergiques par la 6hydroxydopamine administrée à des rats nouveaux-nés, entraine des comportements d'automutilation en réponse à la L-DOPA [Breese, 2005]. Ces observations montrent un lien entre des défauts du système dopaminergique et des comportements agressifs.

Les modèles souris des pathologies du deuxième groupe ne sont donc pertinents que pour l'étude de phénotypes particuliers de ces pathologies, puisqu'elles ne reproduisent qu'une fraction des symptômes retrouvés chez les patients. Toutefois, très peu de modèle souris KO pour les gènes impliqués dans la voie des purines ont été décrits. De très nombreux articles énoncent la perspective de construire des KO d'autres gènes et en particulier du gène *adsl* [Spiegel, 2006]. Malgré cela, aucune étude faisant référence à d'autres KO n'a jamais été publiée. De plus, une étude a montrée que la voie *de novo* est nécessaire au développement de l'embryon préimplantatoire de souris en culture [Alexiou et Leese, 1992]. Il est donc fort probable qu'une délétion d'un autre gène de la voie des purines et en particulier de la voie *de novo*, soit non viable chez la souris.

d. Mise en place d'un nouveau modèle de développement

Chez l'Homme, il existe une composante développementale importante dans les pathologies de la voie de biosynthèse des purines. De plus, ces pathologies sont majoritairement associées à une perte partielle de l'activité enzymatique, suggérant un rôle essentiel de ces enzymes, notamment lors du développement. Toutes les études réalisées sur différents modèles animaux pointent également un rôle essentiel des gènes de la voie des purines pour le développement embryonnaire, ce qui corrobore les observations faites chez l'Homme mais rend difficile l'utilisation de ces modèles de par la forte létalité engendrée. Ces études ont également permis d'apporter de nouvelles connaissances et notamment sur l'importance de la voie des purines dans certains processus développementaux spécifiques. Néanmoins, il subsiste une grande part d'inconnu et en particulier concernant le lien entre altération de la voie des purines et atteintes neuromusculaires chez les patients. En effet, en plus d'une létalité importante, peu des symptômes neuro-musculaires des pathologies de l'Homme sont retrouvés chez ces modèles. L'utilisation d'autres modèles doit donc être envisagée afin de compléter les connaissances apportées par les études sur les modèles animaux déjà en place et mieux rendre compte du rôle développemental des gènes de la voie des purines.

Pour cela, nous avons mis en place le modèle Xenopus laevis, grenouille originaire d'Afrique, qui semblait être un bon modèle pour cette étude. En effet, X. laevis présente de nombreux avantages et est évolutivement plus proche de l'Homme que la drosophile ou le poisson zèbre, ce qui fait de lui un modèle largement utilisé comme modèle de pathologies humaines [Sater, 2017]. C'est d'ailleurs le seul modèle de développement vertébré de la famille des tétrapodes dont le développement est externe. De plus, les embryons sont transparents et relativement gros, ce qui facilite les observations. Le xénope est un vertébré dont les principaux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement sont conservés avec les autres vertébrés. C'est d'ailleurs le cas de la formation des tissus musculaires (myogenèse) qui nous a en particulier intéressés au cours de cette étude. Son utilisation en laboratoire est simple et peu couteuse et il est possible d'obtenir des knockdown afin de pallier le problème de la létalité embryonnaire, mais également de mimer au mieux les pertes de fonction partielles retrouvées chez l'Homme. Le xénope offre également la possibilité de réaliser les knock-down dans un territoire particulier de l'embryon, ce qui permet notamment d'obtenir des pertes de fonction unilatérale avec un côté de l'embryon sauvage qui sert de contrôle interne. C'est un avantage majeur du xénope et en particulier



Figure 2 : Le cycle de développement de Xenopus laevis.

La fusion d'un gamète mâle et d'un gamète femelle lors de la fécondation donne naissance à la cellule œuf qui va suivre les étapes de segmentation, gastrulation, neurulation et organogenèse pour former un têtard. Les temps indiqués sont ceux observés à 23°C. pf : post fécondation. St : Stade. MBT : transition mid-blastuléenne. Les schémas des embryons sont en vue latérale pour les stades 1, 22, 26, 32 et 45 et en vue végétative pour les stades 9 et 12. Ils sont issus des tables de Nieuwkoop et Faber et tirés de [www.xenbase.org]. par rapport au poisson zèbre chez qui ce type d'approche n'est pas possible. Pour finir, nous avions la possibilité de mettre facilement en place ce modèle. Nous avons combiné l'expertise de mon laboratoire d'accueil dans le domaine du métabolisme des purines avec celle de Karine Massé (Institut des Maladies Neuro-dégénératives, CNRS UMR 5293, Bordeaux), qui étudie le rôle de la voie purinergique au cours du développement [Massé, 2007 et 2012] et qui est spécialiste du modèle X. *laevis*.

La voie purinérgique joue un rôle essentiel au cours du développement des vertébrés et en particulier sur le développement du système cardiovasculaire, gastrointestinal ou du système nerveux central et périphérique [Burnstock, 2015]. Chez le xénope en particulier, un rôle de la voie purinergique dans la formation des jonctions neuromusculaires [Fu, 1995] et de l'œil [Massé, 2007] a été mis en évidence. En revanche, la contribution de la voie de biosynthèse des purines, intracellulaire, dans le fonctionnement de la voie purinergique des vertébrés n'est pas connue et la voie de biosynthèse des purines chez le xénope n'est pas caractérisée.

Malgré l'existence de nombreux modèles animaux des pathologies de la voie de biosynthèse des purines, les mécanismes à l'origine des symptômes neuro-musculaires des patients ne sont pas connus. Dans l'objectif de mieux comprendre les altérations développementales à l'origine de ces symptômes, et plus largement, l'implication de la voie de biosynthèse des purines dans le développement embryonnaire des vertébrés, *Xenopus laevis* est apparu comme modèle pertinent de développement vertébré.

III. Xenopus laevis comme modèle de développement

Xenopus laevis présente de nombreux avantages comme modèle de développement. Afin d'utiliser *X. laevis* comme modèle, il est indispensable de connaître les étapes de son développement embryonnaire et les différents outils à disposition chez cet organisme.

III.1 Le développement de X. laevis

Xenopus laevis est un des modèles amphibiens dont le développement est le mieux décrit [Keller, 2000]. Comme chez tous les vertébrés, le développement embryonnaire (ou embryogenèse) du xénope se découpe en quatre phases succédant la fécondation : la segmentation, la gastrulation, la neurulation et l'organogenèse (Figure 2). Chez le xénope, ces phases se divisent en plusieurs stades embryonnaires décrits par les tables de Nieuwkoop et Faber selon des critères morphologiques externes [Nieuwkoop et Faber, 1994]. Le développement est externe et autonome grâce aux importantes réserves nutritives contenues dans le vitellus. Les embryons sont donc accessibles et facilement observables tout au long du développement.

La vitesse de développement du xénope est relativement rapide mais surtout dépendante de la température. En effet, elle dure environ 4 jours à 23°C (Figure 2) et 16 jours à 12°C. La température de culture de *X. laevis* s'étend entre 12 et 28°C, contrairement à celle de *Xenopus tropicalis*, qui est également un modèle très utilisé en laboratoire. En effet, *X. tropicalis* est plus sensible aux variations de température et se



Figure 3 : La mise en place des axes de polarité chez Xenopus laevis.

L'ovocyte est polarisé avec le pôle animal, très pigmenté et qui représente la future région antérieure de l'embryon et le pôle végétatif. Le point d'entrée du spermatozoïde, représenté ici par un éclair, défini la partie ventrale de l'embryon. La première division cellulaire détermine la symétrie bilatérale de l'embryon. La cellule œuf est en vue dorsale et l'embryon stade deux cellules est vu du pôle animal. PA : pôle animal. PV : pôle végétatif. D: dorsal. V : ventral. A: antérieur. P : postérieur. DR : droite. G : gauche. Barre d'échelle : 1 mm. Images tirées de [www.xenbase.org].



Figure 4 : La gastrulation chez Xenopus laevis.

A: Au début de la gastrulation l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme sont organisés en étage. **B**: Au cours de la gastrulation, les cellules subissent des mouvements internes importants. **C**: En fin de gastrulation, les trois feuillets embryonnaires sont organisés de façon concentrique. Les schémas sont des coupes transversales. Les images sont issues de [http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/] et [www.mun.ca].

cultive entre 18 et 28°C [Khokha, 2002]. Le développement embryonnaire de *X. laevis* est donc plus lent que celui de *X. tropicalis* et sa vitesse est donc plus facilement modulable, ce qui rend possible d'accéder facilement aux différents stades du développement embryonnaire.

Au laboratoire, les embryons de xénope sont obtenus à volonté par fécondation artificielle. La ponte est déclenchée par une injection d'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG). La femelle peut alors pondre plusieurs milliers d'ovocytes en l'espace de 24 heures, qui sont facilement fécondables *in vitro*. Les embryons ainsi obtenus sont donc quasi synchrones, ce qui facilite la comparaison entre différentes conditions. La quantité importante d'embryons permet d'obtenir des données statistiquement analysables.

Les ovocytes sont très gros (environ 1,4 mm contre 0,8 mm chez *X. tropicalis*), ce qui facilite grandement les observations et les manipulations. De plus, ils sont polarisés avec une pigmentation plus importante au pôle animal qu'au pôle végétatif. Cette polarité définit l'axe antéro-postérieur qui apparait lors de l'ovogenèse. L'entrée du spermatozoïde détermine la partie ventrale de l'embryon. Enfin, la symétrie bilatérale de l'embryon se détermine au moment de la première division mitotique (Figure 3). Cette première division a lieu environ 1 h 30 à 23°C après la fécondation et marque le début de la phase de segmentation. Ainsi, dès le stade deux cellules, les axes de polarité de l'embryon sont déjà établis et facilement reconnaissables.

La segmentation, ou clivage, se produit entre le stade 1 (cellule œuf) et le stade 9 (stade blastula) (Figure 2). Pendant cette période, le volume total de l'embryon ne varie pas tandis que des divisions mitotiques importantes et rapides conduisent à la formation d'un embryon composé de 6 000 à 10 000 cellules, communément appelées blastomères.

Au cours de la segmentation, l'embryon vit sur les réserves des ARN maternels présents en très grande quantité dans l'ovocyte. Au moment de la transition midblastuléenne (MBT), qui survient à un stade jeune blastula (stade 8), la transcription zygotique débute, les divisions cellulaires ralentissent et deviennent asynchrones et c'est l'acquisition de la mobilité cellulaire [Newport et Kirschner, 1982]. A partir de ce stade, les cellules subissent des mouvements de migration importants, caractéristiques de la gastrulation [Yasuo, 2001]. Durant cette période se mettent en place les trois feuillets germinatifs (Figure 4) : l'ectoderme qui est à l'origine du derme et des tissus nerveux, l'endoderme qui donnera naissance aux systèmes digestif et respiratoire et le mésoderme qui est précurseur des autres organes (muscles, squelette, reins, gonades, vaisseaux sanguins...). Ces trois feuillets ont donc un devenir précis et déterminé et vont chacun évoluer en ébauches d'organes puis en organes fonctionnels durant les phases de neurulation et d'organogenèse.

Lors de la neurulation, le tube neural se forme par épaississement, soulèvement et rapprochement des bords de la plaque neurale mise en place en fin de gastrulation. Apparait alors la région céphalique et la région troncale du système nerveux, futurs cerveau et moelle épinière, qui délimitent ainsi les régions de la tête et du tronc de l'embryon. Durant la phase d'organogenèse, comprise entre le stade 22 et le stade 45, on parle de stade « bourgeon caudal » car l'ébauche caudal se met en place. En même temps que le système nerveux poursuit sa maturation et que les autres ébauches d'organogenèse, les organes sont fonctionnels, l'embryon mesurant environ 10 mm, a épuisé ses réserves nutritives et commence à se nourrir. On ne parle alors plus d'embryon mais de têtard, ce qui marque la fin de l'embryogenèse (Figure 2).



Figure 5 : Le caryotype de *Xenopus laevis*.

Tiré de [Session, 2016].





A : Structure d'un morpholino (MO) lié à son ARN cible. B : Dans le cas d'un MO de traduction, il se lit spécifiquement à la région contenant le codon d'initiation (AUG), ce qui bloque l'avancement de la petite sous-unité ribosomale. La grande sous-unité ne peut alors pas être recrutée et la traduction n'est pas initiée, ce qui entraîne un *knock-down* du gène. C : Dans le cas d'un MO d'épissage, il se lie spécifiquement à une jonction intron-exon de l'ARN prémessager. La jonction n'est plus reconnue et l'exon en question est « sauté ». La protéine traduite est donc tronquée et potentiellement inactive, ce qui entraîne un *knock-down* du gène. down du gène cible. D'après [Schmitt, 2014].

III.2 Etudier la fonction d'un gène chez X. laevis

De très nombreux outils sont disponibles pour étudier la fonction d'un gène chez *X laevis*. Ici ne seront détaillés que ceux utilisés au cours de ma thèse.

a. Le génome de X. laevis

Xenopus laevis est une espèce pseudotétraploïde ou allotétraploïde car son génome est composé de deux sous-génomes diploïdes qui ont fusionné il y a environ 18 millions d'années pour donner un génome de 2n = 36 chromosomes (Figure 5). Chacun des sousgénomes et des gènes qui les composent ont évolué mais de façon asymétrique. Ainsi, l'un des sous-génomes a subi plus de délétions, de réarrangements et de pertes de gènes ou de leur expression [Session, 2016]. Ce sous-génome se compose des chromosomes S (pour *Short*), tandis que le génome le plus conservé se compose des chromosomes L (pour *Large*). Malgré cette divergence, au moins 56 % des gènes sont conservés en deux copies [Session, 2016]. Ces gènes, ayant une certaine redondance fonctionnelle, sont qualifiés d'homéologues et portent le nom de gènes S ou L en fonction de leur localisation chromosomique.

Toutes les données génomiques et protéiques sont regroupées sur la base de données Xenbase (www.xenbase.org). Le séquençage de *Xenopus laevis* est en phase terminale. Un premier assemblage chromosomique et les premières annotations sont désormais disponibles et en cours de finition. Le génome de *X. tropicalis* est quant à lui diploïde et entièrement séquencé [Hellsten, 2010]. Ces deux espèces étant très proches, le génome de *X. tropicalis* peut donc servir comme référence dans le cas où les annotations du génome de *X. laevis* seraient incomplètes.

La connaissance du génome de *X. laevis* et en particulier des séquences codantes qui le composent facilite notamment la réalisation des expériences de perte de fonction partielle ciblées (*knock-down*) [Harland, 2011] que nous avons utilisées lors de ce projet.

b. Expériences de knock-down

Le cycle de vie de *Xenopus laevis* est compris entre 1 et 2 ans du fait de la longue métamorphose (Figure 2). De plus, la mutagenèse chez cette espèce est difficile à mettre en œuvre du fait de l'allotétraploïdie. Malgré le gros potentiel de la technique CRISPR/Cas9 qui émerge chez *X. laevis* [Wang, 2015], les lignées mutantes sont longues et encore difficiles à obtenir et de ce fait, peu nombreuses à ce jour.

Néanmoins, *X. laevis* se prête particulièrement bien à des approches de perte de fonction par micro-injection de morpholinos (MO) [Eisen, 2008]. Les MO sont des oligonucléotides synthétiques similaires aux oligonucléotides ADN et ARN, à la seule différence qu'ils sont composés de cycles morpholines à la place des riboses (Figure 6A). Cette structure particulière les rend très stables et résistants aux nucléases. Les MO sont capables de se fixer spécifiquement sur l'ARNm cible afin d'inhiber sa traduction ou son épissage en fonction de leur séquence. Pour cela, ils agissent par encombrement stérique, empêchant l'avancement du ribosome, dans le cas d'un MO de traduction, ou entrainant un « saut d'exon », dans le cas d'un MO d'épissage (Figure 6B et C). Ceci conduit, soit à une diminution de la quantité de protéine d'intérêt, soit à la production d'une protéine tronquée, entrainant dans les deux cas un *knock-down* (KD) du gène cible.


Figure 7 : Devenir des blastomères du stade 8 cellules de Xenopus laevis.

L'embryon au stade 8 cellules se compose de deux blastomères V1 (ventraux antérieurs), deux blastomères V2 (ventraux postérieurs), deux blastomères D1 (dorsaux antérieurs) et deux blastomères D2 (dorsaux postérieurs). Ces blastomères ont chacun un devenir particulier. Schéma vu du pôle animal.





L'utilisation des MO s'est largement répandue chez le xénope depuis les années 2000 [Heasman, 2000]. En effet, du fait de la grande taille des embryons, il est facile de microinjecter un des blastomères d'embryons précoces. De plus, le devenir de chacun des blastomères étant connu, il est possible de réaliser une injection ciblée à un territoire spécifique puisque chacun des blastomères est reconnaissable par sa taille et sa pigmentation caractéristiques (Figure 7). Pour finir, au stade deux cellules, la symétrie bilatérale est déjà définie : l'un des blastomères donne le côté droit de l'embryon et l'autre blastomère le côté gauche (Figure 3). Il est donc possible de réaliser les expériences de perte de fonction d'un gène en ciblant un seul blastomère. Ainsi, chaque embryon possède un côté injecté et un côté qui sert de contrôle interne. La possibilité de pouvoir cibler l'injection du MO à un blastomère représente un avantage majeur et spécifique de ce modèle. En effet, chez le poisson zèbre par exemple, les blastomères sont connectés par des ponts cytoplasmiques ce qui ne permet pas de cibler l'injection à un seul blastomère et donc d'avoir un knock-down unilatéral. Grâce à cette spécificité du xénope, chaque embryon est son propre contrôle et le côté injecté est directement comparé au côté non injecté, ce qui permet de se départir de phénotypes dépendants des embryons mais non pécifiques du MO injecté. Des expériences de gain de fonction sont également réalisables par micro-injection d'ARNm.

Des embryons accessibles, relativement gros, dont le développement est rapide et extrêmement bien caractérisé, ainsi que des outils à disposition pour étudier la fonction d'un gène et en particulier la possibilité d'obtenir des *knock-down* ciblés, font de *Xenopus laevis* un modèle vertébré de développement de choix. Nous avons donc utilisé ce modèle pour étudier le rôle des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours de l'embryogenèse. Chez l'Homme, ces gènes jouent un rôle dans le développement des tissus neuro-musculaires. Ici, nous en sommes venus en particulier à nous intéresser à l'implication de ces gènes lors de la formation des tissus musculaires squelettiques chez *X. laevis*. En effet, malgré quelques spécificités, les grandes étapes de la myogenèse et les programmes transcriptionnels associés sont conservés avec les autres vertébrés. De plus, la myogenèse chez *X. laevis* est un processus très bien décrit, ce qui fait de *X. laevis* un modèle très pertinent pour notre étude.

IV. La myogenèse chez Xenopus laevis

La myogenèse du xénope se compose d'une myogenèse primaire, qui se déroule au cours du développement embryonnaire et d'une myogenèse secondaire, qui prend place lors de la métamorphose [Chanoine, 2003]. Ici nous nous focaliseront essentiellement sur la myogenèse primaire. Lors de ce travail, nous avons étudié l'impact des gènes de la voie de biosynthèse des purines sur la formation de différentes structures musculaires de l'embryon issus de la myogenèse primaire et notamment les somites et les muscles hypaxiaux.

Les somites sont des structures embryonnaires transitoires qui dérivent du mésoderme et se situent au niveau de la partie dorsale de l'embryon [Pourquié, 2001a]. Chaque somite se subdivise en trois parties : le myotome, le dermomyotome et le sclérotome (Figure 8). Le myotome constitue la majeure partie des somites du xénope et est à l'origine des muscles du dos. Le dermomyotome est la partie dorso-latérale des somites et est à l'origine du derme et des muscles squelettiques des membres et du tronc. Finalement,



Figure 9 : Représentation schématique de l'expression des « *Myogenic regulatory factors* » au cours des trois vagues myogéniques chez *Xenopus laevis*.

Lors de la première vague myogénique, *myf5* et *myoD* s'expriment au niveau du mésoderme paraxial puis au niveau du mésoderme présomitique tandis que *mrf4* et *myogénine* commencent à s'exprimer dans le myotome différencié, tout comme *myoD*. Pendant la seconde vague myogéniques, tous les MRF sont exprimés au niveau du dermomyotome épaxial (dorsal) puis du dermomyotome hypaxial (ventral). La troisième vague myogénique est initiée par *myf5* qui s'exprime ponctuellement dans les somites. Le vert foncé représente une expression forte et le jaune une expression plus faible. Tiré de [Sabillo, 2016].

le sclérotome se constitue d'une petite population cellulaire ventro-médiane à l'origine des vertèbres. Les muscles hypaxiaux sont des structures musculaires issues de la partie ventrale du dermomyotome et qui sont à l'origine des muscles ventraux du tronc et des muscles des membres. Les muscles du tronc se forment pendant l'embryogenèse tandis que les membres se forment ultérieurement lors de la métamorphose du têtard.

Nous verrons ici comment se mettent en place ces différentes structures lors de la myogenèse primaire et notamment les principaux événements morphologiques et moléculaires associés. Nous nous focaliserons en particulier sur les MRF *(myogenic regulatory factors)* car ce sont les facteurs de transcription dont l'expression contrôle la myogenèse des vertébrés [Pownall, 2002].

IV.1 Les facteurs MRF

Les MRF principaux sont *myoD*, *myf5*, *mrf4* (aussi appelé *myf6*) et *myogénine*. Ils contrôlent la transcription de gènes cibles spécifiques du muscle en se fixant à une séquence ADN consensus (CANNTG) appelée E-box, grâce à leur structure hélice-boucle-hélice [Berkes et Tapscott, 2005]. La majorité des gènes cibles de *myoD* chez *X. laevis* est identifiée [Maguire, 2012], mais l'ensemble des gènes régulés par les MRF n'est pas répertorié. Divers données montrent qu'ils ont chacun des gènes cibles en commun et des gènes cibles qui leur sont spécifiques [Chanoine, 2004]. Cela peut s'expliquer par le fait que chacun des MRF possède une affinité différente pour les séquences cibles et les protéines partenaires, ainsi qu'un potentiel de transactivation variable [Charbonnier, 2002]. Ils sont également capables d'auto activation et d'activation croisée [Sabillo, 2016]. Enfin, les MRF ont également chacun un profil d'expression spatiotemporel spécifique au cours du développement.

La lignée myogénique est donc sous le contrôle génétique de programmes complexes d'expression des MRF [Bismuth, 2010], eux-mêmes régulés par plusieurs voies de signalisation (détaillées plus loin). Il existe certaines redondances fonctionnelles entre les différents MRF, mais également des spécificités qui ont été principalement mises en évidence par des études chez la souris mais aussi sur différents modèles cellulaires en culture [Buckingham, 2001]. Le gène *myf5* est plutôt associé à la spécification de la lignée myogénique. Le rôle du gène *mrf4* est complexe et plus controversé mais ce gènes est plutôt un facteur determinant chez la souris [Kassar-Duchossoy, 2004] et marque la differenciation terminale chez le xénope [Della Gaspera, 2005]. Le gène *myogénine* est associé à la spécification terminale [Bergstrom, 2001]. Enfin, *myoD* intervient à la fois dans la spécification et dans la différenciation musculaire [Berkes et Tapscott, 2005]. Chaque MRF a donc un rôle unique au cours de la myogenèse [Sabillo, 2016].

La myogenèse des vertébrés se caractérise par l'apparition de vagues myogéniques successives [Tajbakhsh, 2009]. Chez *X. laevis*, trois vagues myogéniques correspondant à des programmes distincts d'expression des MRF ont été caractérisés au cours de l'embryogenèse (Figure 9) [Della Gaspera, 2012a]. La première vague conduit à la formation de cellules différenciées mononucléées constituant les somites. La deuxième vague survient au niveau du dermomyotome et entraine la formation notamment des muscles hypaxiaux. Enfin, la dernière vague qui prend place à la fin de l'embryogenèse, semble initier la formation de cellules multinuclées. La première vague myogénique, qui initie la formation des cellules musculaires de l'embryon, émane du mésoderme paraxial, domaine particulier du mésoderme.

Introduction



Figure 10 : La spécification du mésoderme chez Xenopus laevis.

Différents facteurs diffusibles (morphogènes) sont impliqués dans l'induction et la régionalisation du mésoderme dorsal et ventral au niveau de la zone marginale de l'embryon au stade blastula.



Figure 11 : La myogenèse médiane et latérale chez Xenopus laevis.

A : Localisation de l'expression de *myoD* et *myf5*, nécessaires à la myogenèse médiane et latérale, respectivement. B : Localisation des cellules issues de la myogenèse médiane et latérale. La population médiane se différencie dès le stade 12,5 et les cellules de la myogenèse latérale se différencient à partir du stade 17. Anté : Antérieur. Post : Postérieur. D : Dorsal. V : Ventral. TN : Tube neural. Nc : Notochorde. Les schémas du panel A sont des vues dorsales, tirés de [Della Gaspera, 2012a]. Les schémas du panel B sont des coupes transversales d'après [Della Gaspera 2012b].

IV.2 Mise en place du mésoderme paraxial

a. Induction du mésoderme

Le mésoderme, avec l'endoderme et l'ectoderme, forment les trois feuillets embryonnaires qui se mettent en place lors de la gastrulation. Le modèle actuel de la formation du mésoderme met en jeu quatre signaux différents impliqués dans l'induction et la régionalisation du mésoderme (Figure 10). Tout d'abord, le mésoderme est induit à un stade blastula au niveau de la zone marginale par des facteurs d'induction du mésoderme (MIF) provenant du pôle végétatif. D'une part des membres de la famille des Fibroblast Growth Factors (FGF) induisent le mésoderme ventral et d'autre part, des membres de la famille des Transforming Growth Factors- β (TGF- β), tels que l'activine ou Vg1, émanent de la partie dorsale du pôle végétatif (centre de Nieuwkoop) pour induire le mésoderme au niveau dorsal. Il en résulte alors l'activation de certains facteurs de transcription spécifiques du mésoderme comme par exemple le gène brachyury (xbra). Après cette induction primaire, des facteurs dorsalisants (Noggin et Chordin) émanent de l'organisateur de Spemann (partie dorsale du mésoderme) à un stade jeune gastrula et agissent de façon antagonistes aux facteurs ventralisants BMP4 ou Wnt8, ce qui entraine la spécification du mésoderme dorsal [Stennard, 1997 ; Harland et Gerhart 1997 ; Kimelman et Griffin, 2000], à l'origine notamment des muscles squelettiques.

b. Le mésoderme paraxial

La myogenèse est initiée au début de la gastrulation au niveau du mésoderme paraxial, lors de la première vague myogénique (Figure 9). Le mésoderme paraxial est le territoire du mésoderme dorsal à l'origine de l'ensemble des cellules musculaires. Le mésoderme paraxial du xénope se caractérise en particulier par l'expression de *myf5* dès le stade 9,5 [Hopwood, 1991], suivi par *myoD* dès le stade 10,5 [Hopwood, 1989] qui sont responsable de l'initiation de la myogenèse. L'expression précoce des MRF *myoD* et *myf5* est contrôlée par des MIF [Heasman 2015] et notamment par différents membres de la famille des protéines TGF- β [Steinbach, 1998], FGF [Fisher, 2002] et Wnt [Shi, 2002] et dépend de la répression de BMP lors de la régionalisation du mésoderme [Khokha, 2005]. Toutefois, les mécanismes en jeu sont mal connus [Chanoine, 2003].

A partir du stade 12,5, en fin de gastrulation, le mésoderme paraxial se subdivise en deux populations cellulaires différentes : une population médiane qui exprime *myoD* et *myf5* et une population latérale qui n'exprime que *myoD* (Figure 11A) [Della Gaspera, 2012a]. C'est à partir de ce stade que débute la différenciation de la population médiane qui est dépendante de *myf5* et se déroule selon une direction antéro-postérieure [Della Gaspera, 2012a]. La myogenèse médiane est donc la première à se mettre en place et est à l'origine des premières fibres musculaires différenciées qui se localisent près de la notochorde (Figure 11B) et qui se caractérisent par l'apparition de l' α -actine cardiaque, le premier marqueur structurel du muscle à s'exprimer chez les vertébrés [Sassoon, 1993].

Au cours de la neurulation, l'expression de *myf5* se restreint au niveau postérieur tandis que l'expression de *myoD* s'étend vers la partie latérale (Figure 11-A), qui se divise en une partie dorso-latérale et une partie ventro-latérale de cellules indifférenciées qui continuent à croitre (Figure 11-B). La myogenèse latérale est indépendante de *myf5* [Della Gaspera 2012a] et dépendante de *myoD*. Elle débute au stade 17-18, en même temps que la formation des somites est initiée.



Figure 12 : Segmentation et rotation des somites chez le xénope.

A : Représentation schématique du mésoderme présomitique avec la nomenclature des futurs somites au niveau du mésoderme paraxial et des somites déjà formés. **B** : Vue dorsale d'un embryon au stade 24. **C** : Vue latérale d'un embryon au stade 24. Les images ont été obtenues en microscopie confocale. La forme des cellules est schématisée en couleur ce qui permet de mettre en évidence leur rotation à 90°C conduisant à l'alignement des cellules le long de la notochorde. Les embryons sont orientés côté antérieur vers le haut. Tiré de [Afonin, 2006].





La première vague myogénique aboutit à la différenciation du myotome qui continue à croître. Le futur dermomyotome est en expansion au niveau dorso-médian (épaxial) et ventro-latéral (hypaxial). La partie hypaxiale fournit les myoblastes à l'origine des muscles hypaxiaux. Schéma en coupe transversale des somites les plus antérieurs. D : Dorsal. V : Ventral. TN : Tube neural. Nc : Notochorde. D'après [Martin, 2007].

IV.3 La somitogenèse

Les somites se forment par paires symétriques le long de l'axe antéro-postérieur, de part et d'autre de la chorde et du tube neural et possèdent une forme caractéristique dite en chevron (Figure 12). Les premiers somites se forment au stade 17 [Keller, 2000], puis une paire de somites est formée environ toutes les 50 minutes à 23°C [Sabillo, 2016] selon une direction antéro-postérieure, jusqu'à la formation de 45 paires de somites [Nieuwkoop et Faber, 1994], dont neuf somites de tronc et 36 somites de queue [Keller, 2000]. Chaque paire est issue de la segmentation du mésoderme paraxial caudal, appelé mésoderme présomitique (PSM), suivie d'une rotation à 90° des cellules [Keller, 2000] qui permet d'obtenir des cellules parallèles à la notochorde (Figure 12) [Afonin, 2006].

La segmentation est régulée par un mécanisme complexe impliquant principalement les voies de signalisation Notch, FGF et Wnt, selon le modèle « clock-and-wavefront » [Pourquié, 2001b ; Dequéant et Pourquié, 2008]. « The clock » régulée par les voies Wnt, FGF et Notch, contrôle l'activation cyclique de nombreux gènes. Le « wavefront » est un gradient le long du PSM qui contrôle la compétence des cellules à répondre au signal cyclique [Hubaud et Pourquié, 2014]. Il s'agit notamment de l'acide rétinoïque au niveau antérieur du PSM [Moreno 2004] et des protéines FGF et Wnt au niveau postérieur. La combinaison de ces différents signaux conduit à la formation périodique d'une paire de segments, formant chacun un somite individuel. Le gène *myf5* est également nécessaire à la segmentation [Keren, 2005], tout comme le gène *MyoD* qui est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes de la voie Notch au début de la somitogenèse [Maguire, 2012].

Les somites du xénope se constituent exclusivement du myotome qui se compose des premières fibres musculaires à se différencier et continue à croitre au cours du développement (Figure 13). Ces fibres sont mononucléées et deviennent fonctionnelles aux alentours du stade 24. Le dermomyotome se forme au début de la neurulation. Sa formation se caractérise par l'expression de *pax3* (Figure 13) en réponse notamment à l'expression des gènes *paraxis* et *mef2d* [Della Gaspera 2012b]. Finalement, le sclérotome du xénope se spécifie au alentour du stade 35 avec l'expression de certains marqueurs spécifiques comme *pax1* ou *pax9* [Sanchez 2013]. La prolifération et différenciation des cellules somitiques et sous le contrôle de nombreux signaux émanant des tissus adjacents comme le tube neural, la notochorde ou encore l'ectoderme dorsal. Ces signaux (voies Wnt ou Shh, par exemple), agissent comme activateurs ou inhibiteurs pour *in fine* réguler l'expression des gènes MRF [Sabillo, 2016] qui interviennent dans le maintient et la survie des myofibres [Keren, 2005].

Au cours de la somitogenèse, le PSM continue d'exprimer *myf5* qui se localise également dans le dernier somite formé. L'expression de *myoD* se situe dans le PSM et dans les somites puis décroit des somites antérieurs dès le stade 34. Les MRF *mrf4* et *myogénine* s'expriment dans les myotomes différenciés dès le début de la somitogenèse. Les somites expriment *mrf4* jusqu'à la fin de l'embryogenèse et *myogénine* jusqu'au stade 26-27 (Figure 9) [Della Gaspera, 2012a]. C'est à ce stade qu'est initiée la seconde vague myogénique qui aboutit à la formation des muscles hypaxiaux.

IV.4 La formation des muscles hypaxiaux

Le développement des muscles hypaxiaux est visible à partir du stade 31 au niveau de la partie ventro-latérale du dermomyotome des somites I à VIII du tronc, où se forment des agrégats de cellules indifférenciées qui vont ensuite migrer ventralement [Lynch, 1990].





Le développement des muscles hypaxiaux est mis en évidence par immuno-marquage avec l'anticorps 12/101 (**A**, flèches et têtes de flèches), spécifique des cellules musculaires différenciées. Ce développement est la conséquence d'un profil d'expression particulier des gènes *pax3* (**B**), *myf5* (**C**) et *myoD* (**D**), gènes clés dans la mise en place des muscles hypaxiaux. Les cellules exprimant pax3 au niveau des lèvres dorso-latérales des somites antérieurs se détachent des somites (**B**, tête de flèche) et migrent ventralement en avant du front de migration jusqu'à l'affaiblissement de l'expression au stade 41 (**B**, flèches). Les cellules exprimant *myf5* commencent à quitter la région ventro-latérale des somites au stade 31 (**C**, flèches) et continuent de migrer ventralement aux stades 37-38 et 41 (**C**, flèches). L'xpression de *myoD* est présente au niveau des somites jusqu'au stade 37-38 puis apparait en clusters séparés au stade 37-38 (**D**, flèches). Au stade 41, l'expression de *myoD* forme des bandes correspondant aux muscles hypaxiaux différenciés, avec une expression plus importante au niveau ventral, où les muscles sont les plus recenmment différenciés. Les embryons sont en vue latérale, partie antérieure vers la gauche et dorsale vers le haut. D'après [Martin et Harland, 2001].

44

Cette migration se fait selon une chronologie antéro-postérieure. Les quatre premiers clusters de cellules émergent des somites I à IV du tronc et sont visibles au stade 37 [Martin et Harland, 2001] grâce à un marquage avec l'anticorps 12/101, spécifique des cellules musculaires squelettiques différenciées (Figure 14A) [Kintner et Brockes, 1984}. Au fil du développement, les cellules provenant des somites plus postérieurs commencent à leur tour à migrer. Au stade 41, les huit clusters que constituent les muscles hypaxiaux sont en cours de migration (Figure 14A, têtes de flèches). Ils continuent à croître au cours du développement avec une extension au niveau dorsal et ventral [Martin et Harland, 2001].

La formation des muscles hypaxiaux est la conséquence principale de la deuxième vague myogénique qui émane du dermomyotome (Figure 9) (Grimaldi, 2004]. Elle se caractérise par l'expression des quatre MRF : myf5, mrf4, myoD et myogénine et débute aux environs du stade 26-27 [Della Gaspera, 2012a]. Lors de l'initiation de cette vague, les parties dorsales et ventrales des somites les plus antérieurs du tronc sont en expansion (Figure 13) [Denetclaw et Ordahl, 2000]. Cette expansion est marquée par l'expression de myf5 dans les myoblastes en prolifération au niveau des lèvres ventro-latérale et dorsomédiale du dermomyotome [Martin et Harland, 2001], mais également de pax3, dont l'expression spécifie le dermomyotome [Williams et Ordahl, 1994]. L'expression de pax3 colocalise avec celle de *myf5* et perdure tout au long de la migration des myoblastes (Figure 14). Le marquage de myf5 et de pax3 migrent en même temps que migrent les cellules hypaxiales. Leur expression se localise ventralement par rapport au marquage 12/101 car elle est en amont de la différenciation [Martin et Harland, 2001]. Le gène myogénine, associé à la différenciation terminale des cellules musculaires, s'exprime fortement dans les cellules en migration [Della Gaspera, 2012a]. Le MRF myoD quant à lui, s'exprime dans les cellules des muscles hypaxiaux ayant déjà migrées (Figure 14D) et marque les cellules différenciées [Martin et Harland, 2001]. Enfin, le gène mrf4 s'exprime tardivement au niveau ventral (Figure 9) [Della Gaspera, 2012a].

V. Le projet de thèse

Dans le but de mieux comprendre l'implication des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours du développement embryonnaire, nous avons utilisé *Xenopus laevis* comme modèle pertinent de développement vertébré.

Au commencement de ma thèse, très peu de données concernant les gènes de la voie de biosynthèse des purines étaient disponibles chez *X. laevis*. La première partie de ce projet a donc consisté à caractériser les principaux gènes de la voie de biosynthèse des purines de *X. laevis*. Ces gènes étant pour la plupart non décrits, leur séquence a tout d'abord été identifiée par des analyses bioinformatiques, puis la fonction enzymatique des protéines codées par ces gènes a été validée *in vivo*. Enfin, nous avons déterminé les profils d'expression spatiotemporelle de ces gènes au cours de l'embryogenèse.

Dans une deuxième partie, nous avons testé les effets d'un *knock-down* de gènes clés de la voie des purines, *ppat*, *adsl* et *hprt*, sur le développement embryonnaire de *X. laevis*. Ces études fonctionnelles nous ont permis de mettre en évidence une implication de ces gènes dans différents processus développementaux et notamment dans la formation des muscles squelettiques.

Pour finir, nous nous sommes en particulier intéressés à l'expression des gènes majeurs qui contrôlent le développement des tissus musculaires du xénope. Ceci afin de mettre en évidence les processus altérés lors de la myogenèse des embryons ayant un dysfonctionnement dans la voie de biosynthèse des purines.

RESULTATS

Tableau 2 : Liste des principaux gènes de la voie des purines de *Xenopus laevis* identifiés *in sillico*.

Les différents gènes sont associés à leur localisation génomique d'après les versions 7.1 et 9.1 du séquençage de *X. laevis*. (+) : brin sens. (-) : brin antisens. Sur fond orange, les gènes dont aucune annotation ni séquence codante n'étaient disponibles avant la mise en ligne de la version 9.1 du génome. Dernière mise à jour des données effectuée le 18 septembre 2017.

	Gènes X.I	scaffold génome 7.1	Locus génome 9.1	gène ID
	ppat.L	32657	chr1L:33,449,49633,468,241 (-)	398956
ppat	ppat.S	31653	chr1S:29,845,40429,874,400 (-)	108706597
gart	gart.L	6590	chr2L:13,728,52213,753,627 (+)	100101294
pfas	pfas.S	20274	chr9_10S:103,673,842103,687,214 (+)	Aucun
	paics.1.L	32657	chr1L:33,419,10233,446,155 (+)	379855
paics	paics.1.S	31653	chr1S:29,830,02329,844,591 (+)	444677
	paics.2.L	32657	chr1L:33,383,50733,412,831 (+)	431975
ant in	atic.L	13787	chr9_10L:73,740,46973,761,648 (+)	735175
atic	atic.S	310750	chr9_10S:67,456,95667,474,502 (+)	443576
adsl	adsl.L	78978	chr4L:114,462,261114,488,064 (+)	380285
	adssl1.L	230550	chr8L:76,239,54176,261,683 (+)	735084
adss	adssl1.S	236382	chr8S:9,924,1169,949,472 (-)	447329
	adss.L	256241	chr5L:59,310,79059,346,250 (+)	379780
h and	hprt1.L	50694	chr8L:47,333,59547,350,808 (+)	779138
nprt	hprt1.S	12933	chr8S:74,884,65874,897,622 (+)	Aucun
aprt	aprt.L	aprt.L 10177 Scaffold51:823,621830,697 (+)		100381150 et 733395
amaac	gmps.L	387329	chr5L:113,690,393113,707,543 (-)	100380966
ymps	gmps.S	82102	chr5S:97,419,96097,448,237 (-)	Aucun
	impdh1.L	12518	chr3L:79,479,03079,529,793 (+)	380485
imndh	impdh1.S	253809	chr3S:61,708,96461,773,017 (-)	Aucun
mpun	impdh2.L	13523	chr4L:132,041,811132,063,082 (-)	399236
	impdh2.S	277614	chr4S:109,700,489109,726,335 (-)	398453
	ampd1.L	47533	chr2L:53,354,68353,406,121 (+)	108708064
	ampd1.S	248633	chr2S:42,616,46142,657,512 (+)	108709397
ampd	ampd2.S	196263	chr2S:57,063,38757,106,748 (+)	108709466
	ampd3.L	25199	chr4L:3,728,8723,744,770 (+)	108713730
	ampd3.S	93786	chr4S:19,527,51119,542,517 (-)	108715290

I. Caractérisation de la voie de biosynthèse des purines chez le xénope

Afin de comprendre le rôle des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours du développement du xénope, il était indispensable dans un premier temps de les identifier. Or, au commencement de ma thèse, le séquençage de *X. laevis* était en cours mais les annotations peu disponibles. Autrement dit, même si le séquençage était largement avancé et les séquences génomiques accessibles, la plupart des gènes impliqués dans la voie des purines n'était pas annotée en tant que tel et très peu de séquences codantes étaient disponibles. Nous avons donc dans un premier temps utilisé des outils bioinformatiques afin d'identifier les séquences des gènes codants les enzymes de la voie de biosynthèse des purines chez *X. laevis*.

I.1 Identification bioinformatique des gènes

Nous nous sommes focalisés sur l'ensemble des gènes de la voie *de novo* (*ppat, gart, pfas, paics, adsl* et *atic*) et une partie des gènes de la voie de recyclage (*adsl, adss, aprt, gmps, hprt, impdh* et *ampd*) car ce sont des gènes clés puisque impliqués directement dans la synthèse des nucléotides (AMP et GMP) à partir des bases puriques (Figure 1). Ainsi, nous avons sélectionné 12 gènes d'intérêt (Tableau 2).

Les deux gènes homéologues *adssl1.L* et *adssl1.S*, codant pour une enzyme à activité Adss, étaient déjà annotées dans les bases de données et les séquences codantes disponibles. Dans le cas des gènes *ppat*, *adsl*, *atic*, *adss*, *paics*.1, *paics*.2, *aprt* et *hprt*, un seul gène et sa séquence codante était annoté (Tableau 2). X. laevis est une espèce pseudotétraploïde, l'éventuelle existence de gènes homéologues a donc dû être vérifiée. Enfin, dans un dernier cas, aucune information sur le gène de X. laevis n'était disponible. Or, le séquençage de X. tropicalis, espèce évolutivement proche de X. laevis, était complet. Nous avons alors utilisé la séquence codante de X. tropicalis des gènes *gart*, *pfas*, gmps, *impdh1*, *impdh2*, *ampd1*, *ampd2* et *ampd3* comme séquence de référence pour identifier le ou les gène(s) homéologue(s) de X. laevis. Pour chaque gène d'intérêt, hormis les gènes *adssl*, nous avions donc une seule séquence codante de référence correspondant soit à un gène de X. laevis soit à un gène de X. tropicalis. Nous avons alors utilisé l'outil BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponible sur la base de donné Xenbase, afin de comparer les séquences codantes de référence au génome de X. *laevis, version 7.1*.

Ces alignements ont permis de positionner la séquence de référence sur un ou plusieurs « *scaffolds* », c'est-à-dire une fraction du génome. La séquence de référence correspondant au transcrit du gène, chaque « *scaffold* » identifié se découpe en portions d'alignement qui s'alignent et en portions qui ne s'alignent pas à la séquence de référence et qui correspondent aux séquences transcrites (exons et régions non traduites) et aux introns du gène, respectivement (exemple en Annexe p 150). Dans certains cas, deux « *scaffolds* » distincts s'alignaient à la séquence de référence avec un alignement quasi-total, c'est-à-dire que l'ensemble des portions d'alignements regroupés dans un « *scaffold »* reconstituaient la quasi-totalité de la séquence codante de référence. De plus, ces « *scaffolds »* contiennaient environ le même nombre de portions (d'exons) et s'alignaient à la séquence de référence avec un fort pourcentage d'identité. Dans ce cas, il s'agissait de deux gènes homéologues. Ainsi, nous avons pu identifier 27 gènes codant potentiellement pour des enzymes de la voie des purines (Tableau 2).

Tableau 3 : Pourcentage d'homologie des protéines de la voie des purines de *Xenopus laevis* avec celles de *Saccharomyces cerevisiae, Xenopus tropicalis* et *Homo sapiens*.

Les différentes séquences protéiques ont été alignées en utilisant l'outil BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), afin de déterminer le pourcentage d'identité ou de similarité entre elles. Les protéines homéologues de *X. laevis* ont été comparées entre-elles et aux protéines homologues de *X. tropicalis, H. sapiens* et *S. cerevisiae*. Dans le cas où il y a plusieurs protéines homologues chez la levure, les résultats pour chaque protéine sont représentés avec un code couleur. Dans le cas ou plusieurs variants d'épissage ont été décrits dans les bases de données (protéines soulignées), les numéros d'accession sont ceux des séquences ayant servies à l'alignement.

Xenopus laevis (X.I)			Xenopus tropicalis			Homo sapiens			Saccharomyces cerevisiae		
Protéines	N° accession	Identité (%)	Protéines	N° accession	Identité avec X.I (%)	Protéines	N° accession	Similarité avec X.I (%)	Protéines	N° accession	Similarité avec X.I (%)
Ppat.L	NP_001083491.1	07	Durat		96	CDAT		89		ND 0140204	52
<u>Ppat.S</u>	XP_018098642.1	97	Ppat	NP_989313.1	97	GPAT	NP_002694.3	90	Ade4p	NP_014029.1	52
Control	VD 018100150 1		Cart	VD 017046996 1	02	CADT	ND 000810 1	70	Ade5,7p	NP_011280.1	65
Gart.L	XP_018100150.1		Gart	XP_01/946886.1	93	GAKI	NP_000810.1	12	Ade8p	NP_010696.3	47
Pfas.S	Aucun		<u>Pfas</u>	XP_012825644.1	93	PFAS	NP_036525.1	76	Ade6p	NP_011575.1	52
Paics.1.L	NP_001086248.1	06	Doios 1	VD 012011124 1	82			88	Ade1p et	NP_009409.1	40 et 48
Paics.1.S	NP_001080163.1	96	Paics.1	XP_012811124.1	95	PAICS	NP_001072992.1	89	Ade2p	NP_014771.3	40 et 47
Paics.2.L	XP_018085579.1		Paics.2	NP_001090685.1	86			68	Ade2p	NP_014771.3	46
Adsl.L	NP_001080593.1		Adsl	NP_001005457.1	96	<u>ADSL</u>	NP_000017.1	94	Ade13p	NP_013463.1	79
Atic.L	NP_001090100.1	06	Atio	ND 001005460 1	95	ATIC		92	Ade16p et	NP_013128.1	76 et 76
Atic.S	XP_018094436.1	90	AllC	NP_001005460.1	96	ATIC NP_004035.2	92	Ade17p	NP_013839.1	76 et 75	
Adssl1.L	NP_001090012.1	96	A deal1	ND 001004020 1	97		ND 001207252 1	97			76
Adssl1.S	NP_001087505.1		AUSSII	NP_001004939.1	96	ADSSLL	NP_001307353.1	89	Ade12p	NP_014179.1	57
Adss.L	NP_001080088.1		<u>Adss</u>	XP_012818290.1	95	<u>ADSS</u>	NP_001117.2	95			74
Hprt1.L	NP_001090235.1	99	Uprt1	L XP_012823623.1	99	HPRT1	NP_000185.1	96	Hpt1p	NP_010687.3	58
Hprt1.S	Aucun		<u>Hprt1</u>		99			96			58
Gmps.L	XP_018119257.1	97	Creares	VD 012010007.4	97	CMDC	NP_003866.1	96	Gua1p	NP_013944.1	55
Gmps.S	Aucun		Gmps	XP_012818897.1	96	GIVIPS		97			54
Aprt.L	XP_018096991.1		<u>Aprt</u>	XP_017948503.1	93	APRT	NP_000476.1	80	Apt1p	NP_013690.1	63

Pour chaque gène, à partir de la séquence génomique correspondant au « *scaffold* », nous avons reconstitué la séquence codante correspondante en plaçant les exons et les introns sur le génome grâce aux données d'alignement (Annexe p 150). Vu le nombre important de gènes *ampd* (cinq gènes) et *impdh* (quatre gènes), le peu d'information disponible pour ces gènes et le travail conséquent que demande la reconstitution de la séquence codante, nous avons décidé de ne pas reconstituer les séquences de ces gènes et de nous focaliser sur les 18 autres gènes de la voie des purines. Nous avons ainsi pu reconstituer les séquences codantes putatives de chacun de ces gènes dont huit n'étaient initialement pas annotés (Tableau 2).

En juin 2016 la version 9.1 du génome de X. laevis est devenue accessible. Cette version est un réassemblage de la version précédente où les séquences sont placées sur 18 pseudo-molécules qui représentent les 18 chromosomes de X. laevis nommés par rapport à leur orthologie avec X. tropicalis [Matsuda, 2015; Session, 2016]. De nombreux nouveaux gènes sont annotés sur cette nouvelle version. Tous les gènes de la voie des purines qui n'étaient jusque là pas annotés et que nous avions identifiés durant ma thèse, sont désormais placés à leur locus. Aucun autre homéologue non identifié jusque-là n'est annoté au génome. De plus, les séquences codantes des gènes ppat.S, gart.L, paics.1.L, amps.L, impdh1.L, impdh2 et de tous les gènes ampd sont désormais disponibles dans les bases de données (Tableau 2). Nous avons comparé les séquences initialement identifiées avec ces nouvelles séquences et nous avons pu constater qu'elles étaient identiques. Les séquences que nous avions initialement identifiées correspondent donc bien aux séquences nouvellement annotées et disponibles sur les bases de données, ce qui conforte notre stratégie d'identification. Compte tenu de l'apparition tardive de cette version par rapport à mon projet de thèse (deux ans après le début de ma thèse), tous les résultats suivants concernent la liste des 18 gènes initialement identifiés et listés en Tableau 3.

Chacune des séguences codantes identifiées ont été traduites in sillico et les séquences protéiques ainsi obtenues ont été comparées aux séquences protéiques des gènes de la voie des purines de Saccharomyces cerevisiae, Xenopus tropicalis et Homo sapiens, afin d'identifier les pourcentages d'homologie (Tableau 3). La conservation des protéines entre X. laevis et X. tropicalis est très importante avec une identité de séquence comprise entre 82 et 99 % et majoritairement supérieure à 90 %. Ce n'est pas surprenant puisque ces deux espèces ont divergé il y a environ 50 millions d'années [Schmit, 2014] et sont donc très proches d'un point de vue évolutif. La similarité est comprise entre 68 et 97 % entre les séguences de X. laevis et de l'Homme et entre 40 et 79 % entre les séguences de X laevis et de la levure. De plus, il apparait que les pourcentages d'identité entre les protéines homéologues sont relativement proches, ce qui montre qu'il y a eu peu de divergence entre les gènes codants ces protéines. Ces résultats nous montrent une bonne conservation des différentes protéines entre X. laevis et les différentes espèces. Ceci suggère que les gènes identifiés codent bien pour les enzymes attendues. D'ailleurs, les séquences primaires des protéines identifiées lors de ce travail sont bioinformatiquement prédites comme porteuses des différents domaines d'activité attendus. Toutefois, il s'agit ici de prédiction. De plus, l'ensemble des séguences protéigues des enzymes de la voie des purines chez X. tropicalis, dont une majorité a été utilisée comme séquence de référence, sont également des prédictions de séquence identifiées par homologie de séquence.

Afin de s'assurer que les séquences prédites de *xénope* codent effectivement pour les protéines attendues, et dans la mesure où les pertes de fonction des gènes S sont

fréquentes [Session, 2016], nous avons souhaité valider la fonction des gènes de la voie des purines de *X. laevis in vivo*.

I.2 Validation fonctionnelle

Afin de valider la fonction des protéines codées par les gènes de *X. laevis* que nous avons identifiés par des approches bioinformatiques (Tableau 3), nous avons tiré avantage du modèle levure *Saccharomyces cerevisiae*. La simplicité d'utilisation de ce modèle et les nombreux outils génétiques à disposition ont permis de très bien caractériser la voie de biosynthèse des purines chez cet organisme [Ljungdahl et Daignan-Fornier, 2011]. De plus, les mutants des gènes impliqués dans cette voie étaient disponibles au laboratoire. La levure a donc été utilisée comme système hétérologue afin de tester si l'expression des gènes de la voie des purines de *X. laevis* chez *S. cerevisiae*, peut complémenter la perte d'activités enzymatiques associées aux mutations des gènes homologues de la levure. Afin d'être exprimés chez la levure, les ADNc des gènes de la voie des purines que nous avons identifiés chez *X. laevis*, ont tout d'abord dû être clonés.

a. Clonage des gènes de X. laevis

Pour cloner les gènes de X. laevis, nous nous sommes tout d'abord fourni les clones qui étaient disponibles dans des banques d'ADNc et en particulier ceux référencés dans la librairie du consortium IMAGE (*Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression*) [Lennon, 1996]. Ce consortium vise notamment à construire une collection accessible de clones contenant les séquences codantes entières de tous les gènes connus des principales espèces modèles dont *Xenopus laevis*. Dans la suite du manuscrit, nous parlerons de clones IMAGE pour faire référence à ces clones. Par homologie de séquence, nous avons recherché l'existence de clones IMAGE correspondants à chacun des gènes précédemment identifiés. Pour tous les gènes, excepté pour les gènes *hprt.S, gmps.S, pfas.S* et *gart.L*, un clone IMAGE était disponible. Nous les avons donc utilisés afin de cloner les gènes d'intérêt dans un plasmide d'expression dans la levure.

Dans le cas des gènes *hprt.S* et *gmps.S*, un clone IMAGE était répertorié mais non disponible. Dans le cas de *pfas.S*, plusieurs clones étaient disponibles mais ne recouvraient que partiellement la totalité de la séquence codante. Enfin, pour le gène *gart.L*, le clone IMAGE disponible ne contenait qu'une seule activité parmi les trois activités portées par le gène entier, correspondant probablement à un variant d'épissage. Nous avons donc réalisé des expériences de RT-PCR afin d'amplifier l'ADNc entier de ces gènes pour lesquels nous ne disposions pas de clone IMAGE entier. Malheureusement, malgré de nombreux essais, cette technique n'a pas permis d'obtenir les ADNc de ces gènes. Nous avons alors pu utiliser des solutions alternatives pour les gènes *hprt.S* et *gart*.

Le gène gart code pour une enzyme à activité phosphoRibosylGlycinAmide Transformylase (GART), phosphoRibosylGlycinAmide Synthase (GARS) et phosphoRibosyl AminoImidazole Synthetase (AIRS). Il est donc impliqué dans pas moins de trois étapes de la voie *de novo* (Figure 1), c'est pourquoi il nous a semblé important de valider la fonction du gène gart prédit chez X. laevis. Chez la levure, les trois activités citées ci-dessus sont portées par deux enzymes codées par deux gènes distincts : *ADE5,7* et *ADE8*. Le gène *ADE5,7* code pour une enzyme portant les deux activités GARS et AIRS. Or, le clone IMAGE de gart disponible ne possédant que la partie du gène codant hypothétiquement pour une enzyme à activité GARS, la complémentation de la mutation *ade5,7* par ce clone IMAGE n'était pas réalisable. Cependant, nous avons pu identifier un clone IMAGE supposément porteur des activités AIRS et GART, non pas chez *X. laevis* mais chez *X. tropicalis*. En outre, les séquences protéiques de Gart chez ces deux espèces possèdent une identité de 93 % et une similarité de 96 % (Tableau 3). Nous avons donc cloné chacune des séquences codantes partielles portées par les clones IMAGE gart provenant de *X. laevis* et de *X. tropicalis* dans un plasmide d'expression dans la levure. Le but ici est donc de tester la complémentation de la mutation du gène ade5,7 (activité AIRS et GARS) par la co-expression du gène gart de *X. laevis* (activité GARS prédite) et du gène gart de X. tropicalis (activité AIRS prédite). La complémentation de la mutation du gène ade8 de levure (activité GART) a été testée par l'expression du clone IMAGE de *X. tropicalis* contenant hypothétiquement l'activité GART.

Nous avons également pu trouver une solution alternative pour étudier la fonction enzymatique du gène *hprt.S*, gène pour lequel nous ne disposions pas d'ADNc. Les séquences nucléiques des gènes *hprt.L* et *hprt.S* ont une identité de 91 % mais les séquences protéiques ne diffèrent que d'un seul acide aminé. Nous avons donc réalisé une mutagenèse dirigée de *hprt.L* afin qu'il code une protéine ayant 100 % d'identité avec la protéine Hprt.S. Nous avons cloné cette séquence mutée dans le plasmide d'expression dans la levure afin de réaliser les tests de complémentation fonctionnelle.

Ainsi nous avons donc pu cloner les différents gènes d'intérêt de *X. laevis* dans un plasmide d'expression dans la levure. Nous avons alors pu tester leur fonction *in vivo* afin de déterminer s'ils codent effectivement pour des protéines ayant les activités enzymatiques prédites.

b. Tests fonctionnels in vivo

Chez la levure, une délétion ou une combinaison de délétions de plusieurs gènes impliqués dans la voie des purines entraîne une auxotrophie pour les purines, adénine ou hypoxanthine en fonction des gènes mutés. Par exemple, la majorité des mutants des gènes de la voie de novo sont auxotrophes pour l'adénine, à l'exception des mutants ade16 et ade17. En effet, ces gènes codent chacun pour une enzyme avec une activité ATIC. Les simples mutants ont donc chacun toujours une activité ATIC, tandis que la double mutation des gènes ade16 ade17 supprime complètement l'activité ATIC de la souche qui devient de ce fait auxotrophe pour l'adénine. Nous avons testé la capacité des gènes de la voie des purines de X. laevis à complémenter la mutation du gène homologue de levure, c'est à dire à pallier l'auxotrophie de la souche mutante utilisée (Figure 15). Dans ce but, les gènes de X. laevis identifiés lors de ce travail ont été clonés comme décrit précédemment, dans le pCM189 (Annexe p 153), plasmide d'expression dans la levure. Afin de réaliser les tests de complémentation fonctionnelle, différentes souches mutantes de levure ont été transformées soit par le pCM189 vide (contrôle négatif), soit le pCM189 portant le gène sauvage de levure (contrôle positif) ou soit le pCM189 portant le gène de xénope à tester. Nous avons alors comparé la croissance des souches sur milieu supplémenté ou non en purines, en réalisant des tests de croissance, ou tests en gouttes, c'est-à-dire en déposant des dilutions sérielles de culture sur divers milieux (Figure 15).

Nous pouvons observer que la quasi totalité des gènes de xénope testés complémentent la mutation du ou des gènes homologues de levure (Tableau 4). Nous pouvons donc en conclure qu'ils codent une protéine possédant la ou les activité(s) enzymatique(s) prédite(s). Pour le gène *gart*, nous avons pu obtenir une complémentation de la mutation *ade8* par le gène de *X. tropicalis* et une complémentation de la mutation du gène *ade5,7* par la co-expression des gènes de *X. tropicalis* et de *X. laevis*. Cela montre que le clone IMAGE de *X. tropicalis* code effectivement pour une protéine à activité AIRS et GART

Résultats





Figure 15 : Validations fonctionnelles *in vivo* de l'activité des enzymes de la voie de biosynthèse des purines identifiées *in sillico* chez *Xenopus laevis*.

La levure Saccharomyces cerevisiae (S.c) a été utilisée comme système hétérologue d'expression des différents gènes de X. laevis (X.I). Des dilutions sérielles de transformants de levure ont été déposées sur milieu solide supplémenté ou non en adénine ou en hypoxanthine (Hypox) comme seule source de purines extérieures, puis les boîtes ont été scannées après plusieurs jours de croissance. Les schémas sont des représentations simplifiées de la voie des purines chez S. cerevisiae avec les différentes souches utilisées qui présentent une auxotrophie pour l'adénine ou pour l'hypoxanthine dépendante de l'activité enzymatique de la protéine codée par le gène d'intérêt. A : Les souches mutantes ayant un déficit pour une activité enzymatique de la voie *de novo* sont auxotrophes pour l'adénine. Cette auxotrophie est supprimée par l'expression des gènes ppat.L, ppat.S, paics.1.S, paics.1.L, gart X.I et gart de X. tropicalis (X.t), atic.L et atic.S, chez les mutants des gènes homologues respectifs de levure. L'expression des gènes adsl (B), adss (C) et hprt (D) supprime l'auxotrophie pour l'adénine et l'expression du gène aprt.L (E) supprime l'auxotrophie pour l'hypoxanthine des différentes souches respectives utilisées. * : clone issu de la mutagenèse dirigée de hprt.L et qui code une protéine identique à hprt.S. L'ensemble des résultats est récapitulé dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Récapitulatif des résultats de validation fonctionnelle des gènes de la voie de biosynthèse des purines de Xenopus laevis.

Les gènes de X.laevis (X.l) ont été clonés dans le pCM189, un plasmide permettant l'expression chez la levure Saccharomyces cerevisiae (S.c). Les tests de complémentations fonctionnelles réalisés chez S.cerevisiae (Figure 15) ont permis de valider la fonction des gènes du xénope. Les activités enzymatiques indiquées comme prédites sont des prédictions bioinformatiques d'après les séquences protéiques. Le gène gart de X. laevis possède deux gènes homologues chez S. c qui codent chacun des enzymes ayant des activités enzymatiques différentes, comme indiqué par le code couleur. En gris : non déterminé. * : issu de la mutagenèse dirigée de *hprt.L* et code une protéine identique à *hprt.S*. Pour la signification des abréviations, se référer à la table des abréviations.

	Gènes X.I	Gènes homologues de <i>S.c</i>	Domaines d'activité	Domaines d'activité prédits portés par le pCM189	Compléme mutatio	ntation de la n chez <i>S.c</i>	Activité effective
nnat	ppat.L		glutaminasa at DDT	glutaminasa at DPT	ade4		glutaminase et PRT
pput	ppat.S	ADE4	giulanninase et PKT	giutaminase et PNT	ade4		glutaminase et PRT
aart	aart I	ADES 7 et ADES	GARS AIRS at GART	GARS	ado5 7		GARS AIRS at GART
gun	gurt.L	ADEJ, 7 EL ADEO	GARS, AIRS EL GART	AIRS et GART (X. tropicalis)	aues	ade8	GANS, AINS EL GANT
	paics.1.S	ADE1 of ADE2			ade1 et ade2		SAICAR synthase et AIRC
paics	paics.1.L	ADEI ELADEZ	SAICAR synthase et AIRC	SAICAR synthase et AIRC	a	de2	SAICAR synthase et AIRC
	paics.2.L	ADE2			aucune		aucune
atic	atic.L	ADE16 et ADE17	ATIC	ATIC	ade16 et ade17		ATIC
	atic.S	ADE16 et ADE17	And	And	ade16 et ade17		ATIC
adsl	adsl.L	ADE13	ADSL	ADSL	ade13		ADSL
	adssl1.L				ade12		ADSS
adss	adssl1.S	ADE12	ADSS	ADSS	ade12		ADSS
	adss.L				ade12		ADSS
hprt	hprt1.L		hypeyanthing at guaning DBT	hypoyanthing at guaning DDT	hpt1		hypoxanthine PRT
	hprt1.S*		nypoxantinne et guanine PKT	hypoxanthine et guanine PKT	hpt1		hypoxanthine PRT
aprt	aprt.L	APT1	adénine PRT	adéninePRT	apt1		adéninePRT

et celui de *X. laevis* pour une protéine à activité GARS. Les deux séquences protéiques de Gart chez *X. laevis* et *X. tropicalis* sont très similaires (Tableau 3). Nous pouvons donc supposer que le gène *gart* entier de *X. laevis* code pour une protéine qui porte les trois fonctions attendues.

Le gène *paics.2.L* ne complémente pas la mutation des gènes homologues de levure et le gène *paics1.L* ne complémente qu'une seule mutation sur les deux testées. Il est donc impossible pour ces gènes de conclure s'ils codent effectivement une protéine aux activités prédites. En effet, s'agissant d'une expression hétérologue, de nombreuses raisons peuvent expliquer une non complémentation, comme par exemple le fait que la protéine en question nécessite des modifications post-traductionnelles spécifiques pour son activité, ou encore par une quantité trop faible en protéine due à un biais de codon, l'instabilité de l'ARN ou de la protéine. De ce fait, des résultats négatifs ne permettent pas de conclure quant à l'activité de l'enzyme codée par *paics.1.L* et *paics.2.L*. Un moyen de pouvoir être plus conclusif pour ces gènes serait dans un premier temps de vérifier les niveaux d'expression chez la levure et ensuite éventuellement d'augmenter la quantité de protéine en utilisant des plasmides multi-copies par exemple.

Pour tous les autres gènes, l'activité enzymatique prédite a bien été validée (Tableau 4). Il n'y a donc pas besoin de facteurs ni de modifications post-traductionnelles supplémentaires pour la fonction des enzymes de *X. laevis* par rapport aux enzymes de *S. cerevisiae*.

Ces résultats montrent donc que les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des purines du xénope, identifiés préalablement par des approches bioinformatiques, codent effectivement une protéine possédant la/les fonction(s) enzymatique(s) attendue(s). Parmi tous les gènes testés, la fonction d'au moins un gène par activité a été validée. Alors qu'au début de ma thèse, très peu de gènes de la voie des purines chez *X. laevis* n'étaient connus et qu'aucun n'était validé fonctionnellement, nous avons pu valider la fonction *in vivo* de 14 gènes de la voie des purines, qui codent pour des enzymes intervenant dans 9/10 étapes de la voie *de novo* et 5 étapes clés de la voie de recyclage (Figure 16).

Malgré des pertes de fonction fréquentes des gènes portés par les chromosomes S [Session, 2016], nous avons pu montrer ici que les gènes homéologues ont conservé leur fonction enzymatique. Il est possible en revanche que ces gènes aient des spécificités d'expression spatiale et/ou temporelle. Avant d'étudier la fonction des gènes de la voie des purines au cours du développement de l'embryon de xénope, il est donc au préalable nécessaire de déterminer leur profil d'expression, afin tout d'abord de déterminer lesquels de ces gènes sont exprimés au cours de l'embryogenèse, puis dans quels structure/tissus ils sont exprimés.

I.3 Expression au cours de l'embryogenèse

Nous nous sommes tout d'abord demandés si tous les gènes de la voie des purines identifiés s'exprimaient au cours du développement et si oui, à quel(s) stade(s) en particulier.

a. Profils d'expression temporelle

Pour étudier l'expression temporelle des gènes de la voie des purines, nous avons réalisé des RT-PCR sur des extraits d'ARN totaux obtenus sur des embryons sauvages à différents stades du développement couvrants la totalité de la phase embryonnaire. Ainsi,



Figure 16 : La voie de biosynthèse des purines chez Xenopus laevis.

Sont indiquées les différentes enzymes de la voie des purines chez *X. laevis* et identifiées lors de cette étude. Les enzymes soulignées sont celles dont l'activité enzymatique a été validée *in vivo*. Pour la signification des abréviations, se référer à la table des abréviations.

les ARN provenant de quinze stades de développement ont été extraits puis une même quantité d'ARN par extrait a été rétro-transcrit afin d'obtenir des ADNc. Enfin, les différents gènes d'intérêt ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Les conditions d'amplification optimales de chacun des 18 gènes d'intérêt ont préalablement été mises au point. En particulier, pour chaque gène nous avons déterminé la température d'hybridation et le nombre de cycles optimaux pour lesquelles le signal d'amplification corrèle avec la quantité d'ADNc de départ et sans amplification aspécifique.

En plus des 18 gènes d'intérêt, il nous fallait également amplifier un gène de ménage afin de normaliser les niveaux d'expression. Parmi les gènes de ménage les plus couramment utilisés chez le xénope, les gènes *odc* et *h4* sont les deux gènes qui s'expriment de manière la plus constante entre les quinze stades de développement que nous avons étudiés [Sindelka, 2006]. Nous avons commencé par établir les conditions optimales d'amplification de ces deux gènes puis les avons amplifiés par PCR à partir des ADNc issus des différents stades de développement. Nous avons alors choisi le gène *odc* comme gène de ménage car les conditions mises au point pour ce gène semblaient plus optimales que celles pour *h4*, pour lesquels des amplifications aspécifiques étaient détectables à certains stades. La quantité d'ADNc servant de matrice a ensuite été corrigée par stade afin d'obtenir un profil d'expression du gène *odc* le plus constant possible. Ces mêmes quantités ont été utilisées pour amplifier les gènes d'intérêt.

Chaque gène de la voie des purines du xénope a été amplifié selon les conditions préalablement définies et comme décrit précédemment. Nous ne sommes pas parvenus à mettre au point les conditions d'amplification du gène hprt.S (amplification aspécifiques ou très faible et non corrélée avec la quantité d'ADNc de départ), certainement à cause d'un niveau d'expression très faible de ce gène. Nous avons pu amplifier chacun des autres gènes puis les produits d'amplification ont été séparés sur gel d'électrophorèse (Figure 17). Tout d'abord, nous pouvons voir qu'aucune amplification n'est détectable dans les conditions contrôles -RNA (rétro-transcription réalisée sans ARN) et -RT (rétro-transcription réalisée sans polymérase). De plus, une seule bande d'amplification est visible pour chaque gène et à la taille attendue. Afin de s'assurer de la spécificité de l'amplification, les produits de PCR ont également été séquencés. Ces résultats montrent que l'amplification est spécifique et qu'il n'y a pas eu de dégradation ou de contamination des extraits. Nous avons également réalisé les PCR sur une gamme d'ADNc afin de contrôler la linéarité de l'amplification. Dans tous les cas le signal d'amplification est linéaire ce qui montre que les conditions d'amplification mises au point au préalable sont optimales. Il est alors possible de comparer les niveaux d'expression d'un même gène entre les différents stades de développement.

Les profils d'expression obtenus, c'est-à-dire la variation d'expression au cours du développement, sont la résultante de la quantité en ARN maternelle présents dans la cellule œuf, de la quantité en ARN zygotiques transcrits à partir de la MBT et de la dégradation des ARN. En comparant chacun des profils d'expression avec celui du gène *odc*, ces résultats nous ont permis de mettre en évidence différents profils distincts au cours du développement (Figure 17). Dans la plupart des cas, la quantité relative de transcrits détectée pour les différents gènes est importante aux stades jeunes, avant la MBT (expression maternelle), puis décroit pendant les stades de gastrulation et de neurulation et augmente de nouveau au cours de l'organogenèse. Dans le cas des gènes *ppat.L, ppat.S, gart.L* et *gmps.L*, les profils d'expression respectifs semblent relativement stables. Les gènes *aprt.L, adss.L*, et *pfas.S* ont chacun une expression relative qui semble augmenter au cours du développement. Enfin, les gènes *adssl1.L* et *adssl1.S* n'ont pas d'expression maternelle mais présentent une expression zygotique qui débute au stade 12,5 puis augmente en fin de



Figure 17 : Profils d'expression temporelle des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours du développement de *X. laevis*.

Les gènes de X. laevis ont été amplifiés à partir d'ADNc obtenus à partir d'ARN extraits d'embryons à différents stades du développement. Les contrôles –RT et –ARN correspondent à l'amplification d'extraits non rétrotranscrits et rétrotranscrits sans ARN, respectivement. La linéarité a été réalisée avec de l'ADNc issu des stades 11.5 pour les gènes *ppat.L* et *ppat.S* ; 19 pour *gart.L*, *paics.1.L*, *paics.1.S* et *gmps.S* ; 23 pour *gmps.L* ; 27 pour *atic.L*, *atic.S* et *aprt.L* ; 39 pour *paics.2.L*, *adsl.L*, *pfas.S*, *adssl1.L*, *adssl1.S*, *adss.L* et *hprt.L*: et 41 pour *odc.1.L*. MBT : Transition Mid-Blastuléenne.



Figure 18 : Mise en évidence de la protéine Atic au cours du développement de *Xenopus laevis*.

La protéine Atic a été mise en évidence par *western blot* réalisé sur des extraits protéiques provenant d'embryons à différents stades de développement. Pour témoin de charge, la quantité totale de protéines déposée sur le gel a été mise en évidence par coloration de la membrane au rouge ponceau.

neurulation. Ces expériences ont été réalisées indépendamment sur des extraits d'embryons issus de la fécondation d'ovocytes provenant de deux femelles différentes et les profils d'expression obtenus sont similaires, témoignant d'une bonne reproductibilité de nos résultats.

Ces résultats indiquent qu'à l'exception des gènes adss11, tous les gènes des purines testés, y compris chacun des gènes homéologues, s'expriment au cours du développement embryonnaire de X. laevis. Nous avons alors voulu déterminer ce qu'il en était au niveau protéique. Nous disposions au laboratoire de différents anticorps polyclonaux spécifiques des protéines entières humaines ou de levure de la voie des purines. Nous avons testé ces anticorps sur des extraits protéiques de xénope, en réalisant des western blot. Sur plusieurs anticorps testés, seul l'anticorps anti-Atic a permis d'obtenir un signal et ce, malgré des séquences primaires protéigues très conservées entre X. laevis, l'Homme et la levure (Tableau 3). Nous avons donc utilisé cet anticorps afin de détecter la protéine Atic par western blot, sur des extraits protéiques issus de différents stades du développement (Figure 18). Nous pouvons voir qu'Atic est détectable tout au long du développement. En comparaison avec la quantité totale de protéines déposée sur le gel qui parait équivalente entre les différents stades (coloration de la membrane au rouge ponceau), nous pouvons dire qu'Atic est exprimé de manière relativement constante au cours du développement, avec toutefois un niveau plus élevé aux stades d'expression maternelle (stades 1 et 5). Ce profil est comparable à celui obtenu en RT-PCR mais pas similaire puisque l'expression du gène atic chute pendant les stades de neurulation et de gastrulation (Figure 17).

Une étude grande échelle [Peshkins, 2015] montre qu'il existe une corrélation faible à moyenne entre les niveaux en ARN et en protéines chez le xénope. Cela a également été montré chez différents autres modèles [de Sousa Abreu, 2009]. La dynamique, c'est-à-dire la variation d'expression d'un transcrit n'est donc pas toujours représentative de la variation de la quantité en protéines, car elle ne tient pas compte du taux de traduction, de la demivie de la protéine, ni même de la quantité initiale de protéine présente dans l'ovocyte. Toutefois, sans être un reflet parfait des niveaux de protéines, elle peut cependant être une très bonne alternative lorsque, comme dans notre cas, aucun anticorps n'est disponible. En effet, la détection du transcrit est une indication forte de la présence de la protéine. Ici, nous voulions savoir si chacun des gènes d'intérêt étaient exprimés et nous avons pu observer que la quasi-totalité des gènes étudiés s'exprime tout au long du développement. Nous pouvons donc envisager que les enzymes codées par ces gènes sont également présentes pendant tout le développement chez le xénope.

Nous avons donc vu que l'ensemble des gènes de la voie des purines chez le xénope est exprimé au cours du développement embryonnaire. Ce n'est pas surprenant puisque les enzymes codées par ces gènes sont impliquées dans une même voie métabolique et doivent donc être toutes exprimées pour permettre la synthèse des purines. Aucune différence majeure n'a été observée entre les gènes de la voie de recyclage et de la voie *de novo*, suggérant l'utilisation combinée de ces voies tout au long du développement. Nous nous sommes alors demandé dans quel(s) tissu(s) en particulier ces gènes s'expriment.

b. Profils d'expression spatiale

Afin d'étudier la localisation transcriptionnelle des différents gènes impliqués dans la voie des purines, nous avons réalisé des hybridations *in situ* sur des embryons entiers à différents stades clés du développement. En particulier nous avons étudié la localisation des transcrits *ppat, gart, adsl, atic, adss, aprt* et *hprt* à six stades du développement (stades 6,5 ; 12,5 ; 19-20 ; 24 ; 29-30 et 39-40).

	St 6.5	St 12.5	St 19-20	St 23-24	St 29-30	St 39-40
ppat		, b	ve spsm	ve psm	mfb vo ab	ab h
gart		b m	cn psm ye	cn ve	ab	mfb e mhb f - vo ab
atic	-	M	ve psm	ve psm	fb mfb mhb psm— e h ab	nfb e mhb pn = vo ab
adsl		•	cn s psrr ve	Ve	e vo nt	mfb mhb pn - vo s ab r
adss		Ь		ve psm	ab mhb	mfb e mhb fh pnvos abr
hprt		, b	ve m	5	e vo s	e mhb vo s ab
aprt		P m	ve	ve	pn ab	mfb e mhb pn - h ab

Figure 19: Profil d'expression spatiale des gènes de la voie de biosynthèse des purines de *Xenopus laevis*.

La localisation des différents transcrits est mise en évidence par hybridation in situ de sondes antisens spécifiques. Les hybridations avec les sondes sens contrôles sont présentées en Annexe p 161 ainsi que quelques photos complémentaires d'embryons au stade 19-20 p 162. Un récapitulatif est présenté dans le Tableau 5. Les embrons sont présentés pôle animal vers le haut (stade 6,5), en vue postériodorsale (stade12,5) ou avec la région antérieure à gauche (stade 19-20 jusque 39-40), en vue dorsale au stade 19-20 et en vue latérale pour les autres. ab : arcs branchiaux. b : blastopore. c: cœur. cn: crêtes neurales craniennes. e: œil. fb: forebrain (cerveau antérieur). h :

hindbain (cerveau postérieur). m : mésoderme. mfb : *Midbrain-Forebrain Boundary* (frontière entre le cerveau antérieur et moyen). mhb : *Midbrain-Hindbrain Boundary* (frontières entre le cerveau postérieur et moyen). nt : notochorde. psm : mésoderme présomitique. pn : placode nasale. r : reins. s : somies. ve : vésicules optiques. vo : vésicules otiques.



Figure 20 : Expression spatiale des gènes de la voie de biosynthèse des purines au stade bourgeon caudal tardif.

La localisation des différents transcrits est mise en évidence par hybridation *in situ* à l'aide de sonde antisens spécifiques. Les embryons au stade bourgeon caudal tardif (Figure 19) ont été coupés transversalement au scalpel au niveau de la tête et des somites antérieurs, comme indiqué. Un récapitulatif des résultats est présenté dans le Tableau 5. La partie dorsale des embryons est vers le haut et la partie antérieure des embryons entiers est vers la gauche. c : cristallin. en : endoderme. r : rétine. re : reins. s : somites. zmc : zone marginale ciliaire.

Tableau 5 : Récapitulatif des profils d'expression spatiale des gènes de la voie des purines au cours du développement de Xenopus laevis.

En gris : non détectable. En gras : intensite de marquage la plus forte. FB : *ForeBrain* (cerveau antérieur). MFB : *Midbrain-Forebrain Boundary* (frontière entre le cerveau antérieur et moyen). MHB : *Midbrain-Hindbrain Boundary* (frontières entre le cerveau postérieur et moyen). PA : pôle animal. PSM : Mésoderme PréSomitique. VO : Vésicules otiques. ZMC : Zone marginale ciliaire de l'œil.

	6,5	12,5	19-20	24	29-30	39-40
	PA	Territoire présomptif	Vésicules optiques	Vésicules optiques	MHB, MFB	Rétine interne
		de l'œil	Crêtes neurales crâniennes	Crêtes neurales crâniennes	VO, Arcs branchiaux, Placode nasale	MHB, FB, Hindbrain, MFB
ppat		Mésoderme postérieur	PSM et somites	PSM	Frontières intersomitiques	VO, Arcs branchiaux
						Frontières intersomitiques
						Endoderme
	PA	Mésoderme postérieur	Vésicules optiques	Vésicules optiques	Rétine, Cristallin	Rétine interne
gart			Crêtes neurales crâniennes	Crêtes neurales crâniennes	MHB, FB, Hindbrain, MFB	MHB, FB, Hindbrain, MFB
gart			PSM		VO, Arcs branchiaux, Placode nasale	VO, A rcs branchiaux , Placode nasale
					PSM	
	PA	Mésoderme postérieur	Vésicules optiques	Vésicules optiques	Rétine, Cristallin	cristallin
atic			Crêtes neurales crâniennes	Crêtes neurales crâniennes	MHB, FB, Hindbrain, MFB	MHB, FB, Hindbrain, MFB
atic			PSM	PSM	VO, Arcs branchiaux, Placode nasale	VO, Arcs branchiaux, Placode nasale
					PSM, Somites postérieurs	Muscles hypaxiaux
	PA		Vésicules optiques	Vésicules optiques	Rétine, Cristallin	Rétine interne
			Crêtes neurales crâniennes		VO, MHB, MFB, Arcs branchiaux	MHB, FB, Hindbrain, MFB
adsl			PSM et somites		Somites	VO, Arcs branchiaux, Placode nasale
					Notochorde	Somites
						Reins, Cœur
				Vésicules optiques	rétine	ZMC
				Crêtes neurales crâniennes	MHB, FB, Hindbrain, MFB	MHB, FB, Hindbrain, MFB
Adss				PSM	VO, Arcs branchiaux, Placode nasale	VO, A rcs branchiaux , Placode nasale
					Somites	Somites, Muscles hypaxiaux
						Reins, Cœur
	PA		Vésicules optiques	Somites	Rétine	Rétine, Cristallin
			Crêtes neurales crâniennes		MHB, MFB	MHB, FB, MFB
hprt			Mésoderme dorsal		VO, Arcs branchiaux	VO, Arcs branchiaux
					Somites	Somites
						Reins, Endoderme
	PA	Mésoderme postérieur	Vésicules optiques	Vésicules optiques	Rétine, Cristallin	Cristallin, Rétine interne
			Mésoderme dorsal		MHB, FB, Hindbrain, MFB	MHB, FB, Hindbrain, MFB
aprt					VO, Arcs branchiaux, Placode nasale	VO, Arcs branchiaux, Placode nasale
					Somites	Somites
					Notochorde	Glomérules des reins

Pour réaliser les hybridations in situ, nous avons généré des sondes ARN antisens spécifiques de chacun des gènes cités (Annexe p 154) et des sondes ARN sens comme contrôles négatifs. Dans le cas de ppat et de hprt, deux gènes homéologues ont été identifiés. Les sondes antisens ppat et hprt sont conçues pour se fixer à chacun des transcrits homéologues respectifs (Annexe p 154). En effet, la similarité très importante des gènes homéologues entre eux (93 % pour les gènes ppat et 94 % pour les gènes hprt) n'a pas rendu possible de concevoir des sondes spécifiques de chacun des homéologues. Après hybridation in situ des embryons, la présence des sondes ARN, couplées à la digoxygénine, a été mise en évidence par immuno-marquage. Aucun marquage n'est detectable lors des hybridations avec les différentes sondes sens et réalisées dans les memes conditions qu'avec les sondes antisens (Annexe p 161). Ceci permet donc de conclure que tous les marquages obtenus avec les sondes antisens sont spécifiques. Les images des embryons hybridés avec les sondes antisens sont regroupées en Figure 19 et quelques images complémentaires sont présentées en Annexe p 162. Afin de compléter les observations sur embryons entiers, nous avons également réalisé des coupes d'embryons au stade 39-40 (Figure 20), ce qui permet de préciser la localisation des différents transcrits. La localisation identifiée pour chacun des transcrits aux différents stades est récapitulée dans le Tableau 5.

Tous les gènes s'expriment dans le pôle animal au stade 6,5, excepté le gène *adss* dont l'expression n'est détectable qu'à partir du stade 24. Au stade 12,5, *ppat* s'exprime dans les territoires présomptifs de l'œil, puis fortement dans les vésicules optiques au stade 24. A des stades plus tardifs, l'expression de *ppat* dans les tissus oculaires diminue et est faiblement détectable au niveau de la couche interne de la rétine à un stade 39-40. Le gène *ppat* est donc exprimé principalement dans les territoires présomptifs de l'œil plutôt que dans la rétine ou le cristallin différencié. *A contrario*, les autres gènes étudiés s'expriment faiblement dans les vésicules optiques au stade 24 et leur expression augmente au niveau des tissus de l'œil différencié. L'expression de tous ces gènes est au niveau de la rétine au stade 29-30 mais aussi au niveau du cristallin pour les gènes *gart*, *atic*, *adsl* et *aprt*. A un stade bourgeon caudal tardif, *gart*, *adsl* et *hprt* s'expriment fortement au niveau de la partie interne de la rétine (probablement au niveau des cellules ganglionnaires de la rétine), *atic* et *aprt*, plutôt dans le cristallin et *adss* au niveau de la zone marginale ciliaire (ZMC) de l'œil.

Parmi les autres tissus dérivants de l'ectoderme, les gènes de la voie des purines du xénope s'expriment également notamment au niveau des arcs branchiaux, qui dérivent des crêtes neurales crâniennes, ainsi que dans plusieurs tissus du système nerveux central. Tout d'abord au niveau des crêtes neurales crâniennes, les gènes *ppat* et *atic* y sont fortement exprimés aux stades 19-20 et 24. Le gène gart s'exprime dans ces structures au stade 19-20 et très faiblement au stade 24. L'expression d'aprt, adsl, adss et hprt au niveau de ces tissus, en revanche, est faible voire indétectable et apparait tardivement avec une expression au niveau des arcs branchiaux au stade 30 pour adss et 40 pour aprt, adsl et hprt. L'expression d'atic, de gart et de ppat est également importante dans les arcs branchiaux aux stades 29-30 et 39-40. De plus, à partir du stade 29-30, les gènes de la voie des purines sont tous exprimés au niveau de la vésicule otique, au niveau de la frontière entre le cerveau moyen et le cerveau postérieur (Midbrain-Hindbrain Boundary ou MHB) et au niveau de la frontière entre le cerveau antérieur et le cerveau moyen (Midbrain-Forebrain Boundary ou MFB). Le gène hprt s'exprime aussi dans le cerveau antérieur (ForeBrain ou FB) au stade 39-40. Les gènes gart, atic, adss et aprt s'expriment dans le FB et le cerveau postérieur (Hindbrain) dès le stade 29-30 et ppat et adsl, au stade 39-40. Enfin, la placode nasal, autre tissu ectodermique, exprime ppat, gart, atic, adss et aprt à partir du stade 29-30 et adsl au stade 39-40.

Résultats

Pour finir, l'ensemble des gènes étudiés s'exprime au niveau du mésoderme postérieur, au stade 12,5 sauf adsl, adss et hprt dont l'expression n'est pas détectable à ce stade. Au stade 19-20, le gène atic s'exprime au niveau du mésoderme présomitique (PSM) et *ppat* au niveau du PSM et des somites. Dans le cas des autres gènes, il est difficile d'être affirmatif car le marquage est faible, mais ils semblent également s'exprimer dans le mésoderme, plutôt au PSM pour gart et dans l'ensemble du mésoderme dorsal pour adsl, aprt et hprt. L'expression mésodermique de ppat et d'atic continue à se restreindre au PSM et aux somites les plus postérieurs au stade 24, tout comme adss, dont l'expression est faiblement détectable dans le PSM à ce stade. A des stades plus tardifs, atic continue de s'exprimer dans le PSM et les somites postérieurs tandis que l'expression d'adss est localisée dans l'ensemble des somites et celle de ppat dans les régions intersomitiques. A l'inverse d'atic, l'expression de hprt est faiblement détectable au stade 24 et semble se situer exclusivement au niveau des somites puis se localise au niveau des somites plutôt antérieurs aux stades plus tardifs avec une expression relativement forte. Aux stades 29-30 et 39-40, le gène hprt est transcrit dans les somites tandis qu'adsl et aprt sont principalement exprimés dans la notochorde et les somites au stade 29-30 et dans les somites au stade 39-40. Au stade 39-40, les gènes adsl et adss s'expriment également au niveau des reins et du cœur, hprt et aprt au niveau des reins et ppat et hprt au niveau de l'endoderme. Enfin, à ce stade, les transcrits atic et adss se localisent au niveau ventral où le marquage forme huit clusters distincts qui pourraient correspondre aux muscles hypaxiaux en migration.

Ces résultats montrent clairement des différences de localisation transcriptionnelle entre les gènes étudiés. L'existence de différences d'expression spatiale entre ces gènes est assez inattendue. En effet, toutes les enzymes codées par ces gènes ont pour rôle de synthétiser les purines. En particulier, l'ensemble des enzymes de la voie de novo doit être présente pour permettre la formation d'IMP. Or, chacun des gènes de la voie de novo testés ici a une expression spatiale particulière. Dans l'œil au stade tardif, par exemple, ppat est très peu exprimé, atic s'exprime principalement dans le cristallin et gart et adsl dans la rétine. Une autre différence majeure aux stades tardifs concerne les somites dans lesquels adsl s'exprime fortement tandis qu'atic est plutôt exprimé dans le PSM, ppat dans les régions intersomitiques et le transcrit gart n'y est pas détectable. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences. Tout d'abord, il peut s'agir d'une expression faible de ces gènes dans un tissu donné à un moment donné qui est sous le seuil de détection par hybridation in situ mais existante et suffisante pour maintenir la quantité en purine nécessaires. De plus, les différences entre les demi-vies respectives des chacune des protéines peuvent aussi expliquer les différences d'expression. En effet, l'expression d'un gène peut diminuer dans un tissu donné à un stade donné mais pour autant, la protéine peut y être toujours présente. Enfin, il est également possible que certaines des protéines codées par ces gènes et/ou un des métabolites stables (SZMP, ZMP et bases et nucléosides puriques), en plus de jouer un rôle dans la synthèse des purines, jouent également un autre rôle spécifique dans un tissu particulier.

Malgré ces différences de profil d'expression, des similitudes existent entre les différents gènes et il est possible d'après les résultats, de dégager un profil d'expression spatiale commun. Tout d'abord, comme nous l'avons mis en évidence par RT-PCR, la quasitotalité des transcrits testés sont abondamment présents avant la MBT et en particulier dans le pôle animal. Ces résultats paraissent cohérents puisque pendant la segmentation, les cellules se divisent très rapidement, ce qui nécessite une quantité accrue en purine notamment pour permettre la synthèse d'ADN. Aux stades de neurulation et en début d'organogenèse, le marquage est assez faible, ce qui correspond au profil d'expression que nous avons observé en RT-PCR. Il est, par contre de ce fait, difficile à ces stades de dégager un profil d'expression commun, même si la plupart des gènes semblent s'exprimer dans les crêtes neurales crâniennes, le mésoderme dorsal (somites ou PSM) ainsi que les vésicules optiques. A des stades plus tardifs, la totalité des gènes testés est exprimé dans les vésicules otiques, les arcs branchiaux et la quasi-totalité du système nerveux central. Les transcrits sont également tous retrouvés dans l'œil et dans les muscles squelettiques (somites ou PSM), malgré une localisation particulière pour chacun des transcrits dans ces tissus. De plus, il semble y avoir des similitudes entre les gènes de la voie de recyclage par rapport aux gènes de la voie *de novo*. Les gènes de la voie de recyclage sont tous retrouvés exprimés dans les reins et sont fortement exprimés dans les somites au stade 39-40. A ce stade, les gènes de la voie *de novo* s'expriment plus faiblement dans les somites ou le PSM contrairement à des stades plus jeunes. Cette spécificité suggère une utilisation et un rôle différentiel de la voie *de novo* et de la voie de recyclage au cours du développement du xénope.

Nous avons donc caractérisé les profils d'expression spatiale de sept gènes de la voie des purines (ppat, gart, atic, adsl, adss, hprt et aprt) au cours du développement du xénope. Quelques données d'expression de gènes de la voie de recyclage étaient disponibles avant le début de ma thèse. Le gène adk s'exprime notamment au niveau des arcs branchiaux, de l'œil, des somites, des reins et des muscles hypaxiaux [Données de Karine Massé non publiées] et le gène pnp s'exprime essentiellement au niveau du PSM et de la vésicule otique [Bourdelas 2009]. L'expression de ces deux gènes est donc comparable à celle que nous avons identifiée pour d'autres gènes de la voie des purines, ce qui renforce nos résultats. Malgré des spécificités d'expression spatiale des gènes de la voie des purines au cours du développement du xénope, ces gènes s'expriment majoritairement et de façon commune dans les tissus neurals et musculaires, abrégés tissus neuro-musculaires. Or, chez l'Homme, une altération de la voie des purines entraine notamment des défauts du développement des tissus neuro-musculaires. Nous pouvons donc nous demander si ces gènes jouent un rôle dans le développement neuro-musculaire du xénope. Dans le cas ou le marquage apparait tardivement dans un tissu déjà différencié comme dans les reins ou le système nerveux central par exemple, il est plus probable que les gènes qui s'y expriment soient plutôt impliqués dans la survie des cellules differenciées ou le fonctionnement de ces tissus. Une expression plus précoce, comme dans le mésoderme présomitique par exemple, suggère en revanche une implication dans le développement des tissus qui en dérivent : le muscle squelettique. Tous ces résultats suggèrent donc un rôle des gènes de la voie des purines dans la mise en place en particulier des tissus neuro-musculaires du xénope.

Dans cette première partie, nous avons donc caractérisé les gènes de la voie de biosynthèse des purines chez *Xenopus laevis*. En particulier nous avons tout d'abord identifié *in sillico* les gènes de *X. laevis* puis validé leur fonction enzymatique *in vivo*. Nous avons ensuite montré que tous ces gènes s'expriment au cours de l'embryogenèse et en particulier dans les tissus neuro-musculaires des embryons. Nous nous sommes alors demandé quel est le rôle des gènes de la voie des purines sur le développement embryonnaire du xénope et notamment s'ils ont un rôle dans la formation des tissus neuro-musculaires.



Figure 21 : Les morpholinos *adsl, ppat* et *hprt* inhibent la traduction des transcrits cibles.

Dans chaque condition, une même quantité d'ARN a été traduite *in vitro* en présence de méthionine marquée au ³⁵S afin de tester l'effet des différents morpholinos (MO) sur l'efficacité de traduction des gènes cibles. Les produits de traduction ont migré sur gel SDS-PAGE qui a été autoradiographié. ARN* : ARN dont la séquence a été modifiée pour ne plus être reconnue par le MO spécifique.

II. Implication des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours de l'embryogenèse

Pour étudier le rôle des gènes de la voie des purines, nous nous sommes demandé quel est l'impact d'une dysfonction de ces gènes sur le développement du xénope et en particulier ce qu'il en est du rôle de la voie de novo par rapport à celui de la voie de recyclage. Au vu du nombre important de gènes impliqués dans la biosynthèse des purines, nous avons choisi de nous focaliser sur l'étude du rôle de trois gènes clés par des approches de perte de fonction partielle (knock-down) : un gène de la voie de novo (ppat), un gène de la voie de recyclage (hprt) et un gène intervenant dans les deux voies (adsl) (Figure 1). Le gène ppat est particulier puisqu'il code pour la première enzyme de la voie de novo qui catalyse l'étape limitante de cette voie [Yamaoka, 1997] et qui est régulée en fonction de la disponibilité en purines [Yamaoka, 2001]. L'inhibition de ppat provoque donc une interruption en amont de la totalité de la voie de novo, ce qui permet d'étudier le rôle de la voie de novo dans son ensemble et sans « interférence » avec la présence de métabolites intermédiaires potentiellement biologiquement actifs qui pourraient donc provoquer des effets délétères [Keller, 2014 ; Albrecht, 2016]. Ensuite, nous avons choisi le gène hprt pour différentes raisons. Premièrement, il code pour une enzyme clé de la voie de recyclage. C'est via l'activité de cette enzyme que le flux de la voie de recyclage est régulé [Yamaoka, 2001]. De plus, des analyses métaboliques réalisées sur embryons de xénope suggèrent que l'hypoxanthine, métabolisée par l'enzyme Hprt, est la source de purine privilégiée [Tocco, 2015], en accord avec les résultats obtenus sur fibroblastes de hamster en culture [Kondo, 2000]. Enfin, chez l'Homme, une déficience en enzyme HGPRT conduit à la maladie de Lesch-Nyhan, une des maladies neuro-musculaires les plus fréquentes associées à un dysfonctionnement de la voie des purines (Introduction, paragraphe II.1b). Pour finir, nous avons choisi d'étudier le rôle du gène adsl qui code pour la seule enzyme intervenant à la fois dans la voie de novo et dans la voie de recyclage. La déficience en enzyme ADSL conduit également à une pathologie neuro-musculaire chez l'Homme (Introduction, paragraphe II.1b).

Afin d'étudier l'implication des gènes *ppat, adsl* et *hprt* lors du développement de *X. laevis,* nous avons utilisé des approches de *knock-down* (KD) par micro-injection de morpholinos (MO). Les MO que nous avons choisis ont été conçus pour se lier spécifiquement à leur(s) transcrit(s) cible(s) au niveau du codon d'initiation et inhiber leur traduction. Nous avons à notre disposition un MO *ppat,* un MO *hprt* et deux MO *adsl* (MO1 et MO2). Chacun des MO est théoriquement capable de se fixer sur chacun des homéologues identifiés cibles (Annexe p 163).

Il est indispensable de vérifier qu'un MO est effectivement efficace pour inhiber la traduction de son/ses gène(s) cible(s). Pour tester l'efficacité de chaque MO à disposition, nous avons réalisé une traduction *in vitro* avec méthionine marquée au ³⁵S. Nous avons traduit soit l'ARN cible, soit l'ARN cible dont la séquence a été modifiée pour ne plus être reconnue par le MO (Annexe p 163). Cette traduction *in vitro* a été faite en présence ou non du MO contrôle (cMO) ou du MO à tester. La quantité de protéine traduite a été détectée par autoradiographie d'un gel SDS-PAGE sur lequel les produits de traduction ont été séparés (Figure 21). Pour tous les MO testés, nous pouvons observer une diminution de la quantité de protéines marquées en présence du MO d'intérêt tandis qu'il n'y a pas de différence visible avec le cMO. Dans tous les cas, cette diminution est également dose dépendante. De plus, lorsque la séquence théoriquement reconnue par le MO est modifiée, la quantité de protéine traduite n'est plus diminuée en présence de MO. Nous pouvons donc



Figure 22 : Site d'injection des morpholinos.

Les morpholinos (MO) ont été co-injectés avec l'ARNm *LacZ* dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules. L'ARN *LacZ* sert de traceur et permet d'identifier le côté injecté (ici marqué en bleu, flèche) du côté non injecté. L'embryon injecté est à un stade bourgeon caudal tardif en vue dorsale, tête vers la gauche. PA : pôle animal. PV : pôle végétatif. ZM : zone marginale.



Figure 23 : Le *knock-down* des gènes *adsl, ppat* ou *hprt* induit une diminution de la taille des embryons.

Les embryons ont été injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellule (**A**, **B** et **C**) ou dans une cellule du pôle animal dorsal au stade quatre cellules (**D**) avec le MO *adsl, ppat, hprt* ou le cMO puis cultivés jusqu'au stade 39-40 (**A** et **B**) ou 42 (**C** et **D**). Les embryons présentés en **D** sont un exemple parmi les embryons dont la taille a été mesurée et représentée en plot avec la moyenne +/- SEM (**E**). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test t de student avec correction de Welch le cas échéant. Il n'y a pas de différence significative entre les conditions contrôles. *** : p value < 0,0001. Les photos sont des vues latérales du côté non injecté avec la région antérieure à gauche et la région dorsale en haut. Barre d'échelle : 1 mm.

en conclure que les MO *adsl, ppat* et *hprt* sont efficaces pour inhiber spécifiquement la traduction de leur ARN cibles.

Nous avons donc utilisé ces différents MO afin de tester l'effet d'une perte de fonction des gènes *ppat, adsl* et *hprt* sur le développement du xénope. Les embryons ayant reçu une dose de MO sont qualifiés de morphants et les embryons injectés par le cMO (qui n'a théoriquement pas de sequence cible ni d'activité biologique) seront désignés embryons contrôles dans la suite du manuscrit.

II.1 Phénotypes morphologiques associés au *knock-down* de gènes de la voie des purines

Un des avantages majeurs de *X. laevis* lors des expériences de KD par micro-injection de MO, c'est la possibilité d'injecter un seul côté de l'embryon. D'après les profils d'expression des gènes de la voie des purines, nous avons supposé un rôle de ces gènes dans la mise en place des tissus neuro-musculaires et en particulier dans la formation des tissus musculaires qui dérivent du mésoderme. Nous avons donc micro-injecté le MO *ppat, adsl, hprt* ou le cMO dans la zone marginale (ZM) d'une cellule à un stade deux cellules (Figure 22) afin de cibler l'ensemble des tissus dans lesquels les gènes *ppat, adsl* et *hprt* s'expriment le plus et en particulier le mésoderme. Ainsi, chaque embryon possède un côté qui a reçu le MO et l'autre côté qui sert de contrôle interne. Le MO est co-injecté avec l'ARNm *LacZ* qui sert de traceur et permet d'identifier le côté injecté mais aussi de contrôler le site d'injection (Figure 22).

Lors de nos différentes expériences de micro-injection, nous avons suivi la mortalité des embryons injectés avec les différents MO et à différentes doses. Le suivi de la mortalité au cours du développement embryonnaire montre une létalité allant de 1 à 30 % en fonction des pontes, mais sans aucune différence entre les morphants et les embryons contrôles issus de mêmes parents. Aux différentes doses de MO utilisées, le KD des gènes *ppat, adsl* ou *hprt* n'entraine donc pas de létalité embryonnaire. Cela représente un avantage certain du modèle *X. laevis* par rapport aux autres modèles animaux existants et permet d'obtenir un nombre important de morphants à un stade tardif. Dans un premier temps, nous avons étudié les phénotypes morphologiques des morphants à un stade bourgeon caudal tardif. Lors de ces observations exploratoires, nous avons notamment pu constater chez les morphants *ppat, adsl* et *hprt*, une diminution de la taille des embryons, une altération oculaire et un phénotype de courbure.

a. Phénotypes de taille

Le premier phénotype que nous avons pu observer chez les morphants, est un phénotype de diminution de la taille des embryons. Ce phénotype peut être constaté par simple observation des embryons (Figure 23) et il est retrouvé chez les morphants *adsl, ppat* et *hprt*. Une analyse quantitative de la taille des embryons a été réalisée sur des morphants *ppat*. Cette quantification montre un effet dose dépendant et significatif par rapport aux embryons contrôles (Figure 23E), ce qui confirme la validité de nos observations. Le KD des gènes *ppat*, *adsl* ou *hprt* provoque donc une diminution de la taille des embryons.

Le contrôle de la taille de l'embryon de xénope est complexe et de très nombreux processus, pour la plupart mal connus, sont impliqués. Les gènes de la voie des purines pourraient donc être impliqués dans un ou plusieurs de ces processus (Discussion paragraphe II.2c). Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour comprendre le


Figure 24 : Le *knock-down* des gènes *adsl* ou *hprt* induit des altérations oculaires chez les embryons.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO *adsl, hprt* ou le cMO puis cultivés jusqu'au stade 39-40 (**A** et **C**) ou 42 (**B** et **D**). Un phénotype d'altération oculaire a été observé chez les morphants *adsl* (**A**) et *hprt* (**B**) dont un exemple est montré en **C** (malformation) et **D** (réduction de taille), respectivement. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur les graphiques et correspondent à des embryons obtenus après fécondation d'ovocytes issus de deux femelles dans chaque condition. Seuls ont été pris en compte les embryons dont l'œil du côté non injecté paraissait sauvage. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test de Xhi². rôle des gènes de la voie des purines dans le contrôle de la taille de l'embryon mais n'ont pas été réalisées au cours de ma thèse.

b. Phénotypes oculaires

En plus d'un phénotype de taille, nous avons pu observer un phénotype oculaire du côté injecté des morphants.

Une altération de l'œil a été observée du côté injecté chez les morphants ppat et semble être dose dépendant. Chez les morphants adsl et hprt, nous avons pu quantifier le nombre d'embryons présentant un phénotype oculaire (Figure 24A et B). Si on ne considère que les embryons pour lesquels l'œil apparait sauvage du côté non injecté (en comparaison avec des embryons sauvages), 75 % des morphants adsl et 100 % des morphants hprt, présentent une altération de l'œil du côté injecté par rapport au côté non injecté, contre respectivement 2 % et 7.5 % des embryons contrôles. Toutes les altérations oculaires observées correspondent en particulier à une réduction de la taille ou à une malformation de l'œil et particulièrement de la rétine. Ces deux phénotypes ont pu être observés chez les différents morphants. Cependant, les morphants ppat et adsl semblent majoritairement présenter des malformations oculaires (Figure 24C) tandis que les morphants hprt semblent présenter plutôt une réduction de la taille de l'œil (Figure 24D). A des doses plus élevées de MO (20 ng pour les MO adsl et ppat), les yeux du côté non injecté des embryons sont également tous affectés. A ces doses, les embryons présentent une altération très générale (Figure 25) témoignant d'un effet toxique des MO et les phénotypes oculaires n'étaient donc pas analysables.

Ces résultats nous indiquent donc que les gènes *ppat, adsl* et *hprt* sont impliqués dans le développement oculaire du xénope, mais semblent intervenir sur des processus différents dans la formation de l'œil. Ceci est en adéquation avec les résultats d'expression spatiale, qui montrent une expression différentielle de ces gènes dans les tissus oculaires, et qui laissent penser qu'ils pourraient jouer un rôle dans la formation de l'œil. Il serait donc très intéressant de caractériser plus précisément ces différents phénotypes oculaires afin de mettre en évidence le rôle spécifique des gènes *ppat, hprt* et *adsl* dans le développement de l'œil chez l'embryon de xénope. Toutefois, nous n'avons pas poussé plus loin les investigations sur ce phénotype, car nous nous sommes essentiellement intéressés au phénotype de courbure décrit ci-après et que nous avons également pu observer chez les morphants.

c. Phénotypes de courbure

Le dernier phénotype morphologique que nous avons observé est un phénotype de courbure du côté injecté des morphants (Figure 25). Nous nous sommes en particulier intéressés à ce phénotype que nous avons caractérisé sur les morphants injectés avec différentes doses de MO.

A une dose de 10 ng de MO1 *adsl*, un tiers des embryons sont courbés de façon modérée du côté injecté (37/110 embryons) contre aucun embryon contrôle (Figure 25A et B). A une dose de 20 ng de MO, la quasi-totalité des morphants sont courbés (85/95 embryons contre 3/120 embryons chez les contrôles). La majeure partie de ces embryons (64/95) sont fortement courbés, avec la queue qui s'enroule latéralement le long de l'axe antéro-postérieur (Figure 25A) et une proportion moindre (21/95 embryons) est plus modérément courbée (Figure 25B, courbure moyenne). De plus, un second MO *adsl* ciblant une séquence différente du MO1 (Annexe p 163) a également été testé à une dose de 10 ng.



Figure 25 : Le *knock-down* des gènes *adsl, ppat* ou *hprt* provoque une courbure significative du côté injecté des embryons.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO *adsl*, *hprt*, *ppat* ou le cMO puis cultivés jusqu'à un stade bourgeon caudal tardif. Le phénotype de courbure a été analysé chez les morphants *adsl* (**A**), ppat (**C**) et *hprt* (**E**) selon l'ampleur de la courbure comme illustré en **B**, **D** et **F**, respectivement. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur les graphiques et correspondent à des embryons obtenus après fécondation d'ovocytes issus d'une (**C** et **A** MO2) ou deux femelles (**A** sauf MO2 et **E**). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test de Xhi² ou d'un test exact de Fisher. Aucune différence significative n'a été observée entre les conditions contrôles. ns : pas de différence significative (p value = 1). *** : p value < 0,0001. Barre d'échelle : 1 mm.

74

A cette dose, la plupart des embryons sont courbés (29/31) dont une majorité (20/31) fortement courbés. Le MO2 *adsl* semble donc être plus efficace que le MO1 puisque les phénotypes de courbure (proportion d'embryons courbés et ampleur de la courbure) des embryons injectés avec 10 ng de MO2, semblent comparables à ceux des morphants injectés avec 20 ng de MO1 (Figure 25A). Le *KD* d'*adsl* provoque donc une courbure significative des embryons et ce, de manière dose dépendante.

Les morphants injectés avec 2,5 ng de MO *ppat* ne présentent aucun phénotype de courbure (Figure 25). En revanche, à une dose de 10 ng, une proportion significative d'embryon sont courbés du côté injecté (46/65 embryons), avec une majorité d'embryons faiblement courbés (36/65) et un nombre non négligeable d'embryons fortement courbés (10/65 embryons) (Figure 25D). A une dose de 20 ng, la quasi-totalité des morphants est courbée (25/26), avec une proportion majeure d'embryons qui sont très fortement courbés (22/26), tandis qu'aucun embryon contrôle ne présente de courbure du côté injecté (Figure 25D). Le phénotype de courbure des morphants *ppat* est donc significatif par rapport aux contrôles et est lui aussi dépendant de la dose de MO.

Enfin, l'injection du MO *hprt* entraîne également une courbure modérée et significative des embryons (Figure 25E et F). Un tiers des morphants *hprt* (23/65) sont courbés dont une majorité (18/65) faiblement courbés et une minorité (5/65) fortement courbés tandis que les embryons contrôles sont droits.

Nous avons donc pu observer une courbure similaire et significative du côté injecté des morphants *adsl, ppat,* et *hprt* et ce, de manière dose dépendante puisque l'ampleur de la courbure ainsi que le nombre d'embryons courbés augmentent avec la dose de MO. Cela suggère que ce phénotype est spécifique d'une déficience de la voie des purines. En effet, il a été observé avec deux MO distincts ciblant le gène *adsl* ainsi qu'avec les MO ciblant les gènes *ppat* et *hprt*. Il est donc très peu probable que les phénotypes des morphants soient le résultat d'un effet aspécifique de quatres MO distincts qui ciblent trois gènes différents. Cependant, nous avons tout de même souhaité vérifier la spécificité des MO.

d. Sauvetages phénotypiques

Dans le but de vérifier la spécificité des phénotypes observés chez les morphants, nous avons réalisé des expériences de sauvetage phénotypiques par injection d'ARNm. Nous avons commencé par tester le sauvetage des phénotypes des morphants *hprt*. Nous avons co-injecté le MO *hprt* ou le cMO avec un ARN codant la protéine Hprt.L. Cet ARN a été muté pour ne plus être reconnu par le MO et sa traduction *in vitro* n'est effectivement pas diminuée par la présence du MO *hprt* (Figure 21). Le but ici est de determiner si la surexpression de la protéine Hprt.L sauvage permet de sauver les phénotypes des morphants *hprt*.

Dans la condition de surexpression (co-injection de l'ARN avec le cMO), seuls 32 % des embryons possèdent un phénotype sauvage, contre 83 % des embryons injectés avec le cMO seul (Figure 26). Les embryons non sauvages présentent soit un phénotype d'altération de l'œil du côté injecté (principalement une réduction de la taille de l'œil), soit un phénotype plus général avec une réduction de la taille de l'embryon et/ou une courbure plus ou moins importante du côté injecté (Figure 26). Dans les conditions utilisées, la surexpression de *hprt* induit donc des phénotypes similaires au KD du gène *hprt* suggérant un rôle critique de la quantité en *hprt* au cours du développement. De plus, la quasi-totalité des embryons co-injectés avec l'ARN et le MO *hprt* présentent des phénotypes similaires avec 67 % des



Figure 26 : La surexpression de *hprt* entraîne des phénotypes comparables à sa perte de fonction.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellule avec le MO *hprt* ou le cMO seul ou en co-injection avec de l'ARN *hprt.L* non reconnu par le MO. Ils ont ensuite été cultivés jusqu'à un stade bourgeon caudal tardif et des analyses de la morphologie des embryons ont permis d'identifier différents phénotypes illustrés en **A** et dénombrés en **B**. Les embryons ont été classés selon trois types de phénotypes : un phénotype sauvage, un phénotype d'altération générale et un phénotype correspondant uniquement à une altération de l'œil du côté injecté par rapport au côté non injecté (**A**, flèche). Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique et correspondent à des embryons obtenus après fécondation d'ovocytes issus de deux femelles pour chaque condition. Les photos de l'embryon de phénotype sauvage représentent un embryon injecté avec 20 ng de cMO en vue latérale, avec le côté gauche correspondant au côté injecté (image du bas). Les autres photos représentent des embryons injectés avec 20 ng de cMO et 4 ng d'ARN, dont la région antérieure est vers la gauche, en vue latérale pour les embryons de phénotype d'altération général et en vue dorsale, côté injecté vers le bas pour l'embryon présentant un phénotype oculaire. Barre d'échelle : 1 mm.

embryons présentant une altération générale, contre 31 % des embryons injectés avec le MO *hprt* seul. La surexpression de *hprt* ne permet donc pas de sauver les phénotypes des morphants et aggrave même les phénotypes dans ces conditions. Il est cependant impossible de conclure sur la spécificité des phénotypes induits par le MO *hprt* dans la mesure où la surexpression de *hprt* provoque des phénotypes similaires. Il est donc indispensable de tester des doses plus faibles d'ARN. Néanmoins, une dose plus faible d'ARN ne sera peut être pas suffisante pour contrebalancer l'effet du MO et sauver les phénotypes des morphants. La faisabilité des expériences de vérification de la spécificité du MO *hprt* par cette méthode s'avère donc complexe. La vérification de la spécificité des phénotypes des morphants *ppat* et *adsl* est en cours de réalisation.

e. Conclusion sur les phénotypes morphologique

Lors de ces analyses morphologiques, nous avons pu observer une diminution de la taille des embryons, une altération de l'œil ainsi qu'une courbure des morphants *adsl, ppat* et *hprt*. La validation de la spécificité de ces phénotypes en lien avec l'injection des MO est à l'état préliminaire. Toutefois, nous avons pu observer des phénotypes morphologiques très comparables chez les morphants *ppat, hprt* et *adsl*. Un dysfonctionnement de la voie de biosynthèse des purines provoqué par l'injection de quatre MO différents, ciblant trois gènes distincts, entraîne donc dans tous les cas des phénotypes similaires. Nous pouvons donc supposer que les phénotypes observés chez les morphants *ppat, adsl* et *hprt* sont bien la conséquence d'une altération spécifique de la voie de biosynthèse des purines. Nous avons également pu montrer qu'un dysfonctionnement dans la voie *de novo* a les mêmes conséquences sur la morphologie des embryons qu'une altération de la fonction de la voie de voie de recyclage. Ceci suggère que l'utilisation de ces deux voies est requise au cours du développement du xénope.

Le phénotype de courbure a particulièrement retenu notre attention. En effet, il évoque une altération musculaire du côté injecté des embryons [Kragtorp, 2007; Della Gaspera, 2012b]. De plus, nous avons pu observer, mais non quantifier, un retard de sortie de la membrane vitelline des morphants *adsl* par rapport aux embryons contrôles. Cette sortie est possible grâce à des mouvements de contraction coordonnés. Ce retard de sortie suggère donc un retard de pleine fonctionnalité des muscles squelettiques [Maguire, 2012]. Ces résultats sont cohérents avec la localisation des transcrits *ppat, adsl* et *hprt* au niveau du PSM et/ou des somites qui laissent également supposer un rôle de ces gènes dans le développement musculaire. Dans la suite de ce travail, nous avons donc choisi de nous intéresser particulièrement au développement du muscle squelettique chez les morphants. Ce choix est d'autant plus cohérent que les patients déficients pour ADSL ou HPRT présentent des altérations neuro-musculaires.

II.2 Phénotypes musculaires associés au *knock-down* de gènes de la voie des purines

Afin de tester l'hypothèse d'un rôle des gènes de la voie des purines du xénope dans le développement musculaire, nous avons réalisé, sur les morphants à un stade bourgeon caudal jeune et tardif, une analyse par immuno-histochimie, en utilisant l'anticorps 12/101 spécifique des cellules musculaires squelettiques différenciés [Kintner et Brockes, 1984]. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence une altération des somites et des muscles hypaxiaux chez les différents morphants.



Figure 27 : Altération de la somitogenèse chez les morphants *adsl* au stade jeune bourgeon caudal.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellule avec le MO *adsl* ou le cMO. Ils ont été cultivés jusqu'au stade 27 puis une immuno-histochimie avec l'anticorps 12/101 a permis de mettre en évidence les cellules musculaires différenciées (marron). **A** : Exemples représentatifs des différents phénotypes qui ont pu être observés dans les différentes conditions. Les embryons sont en vue latérale, région dorsale en haut et région antérieure à gauche ou à droite dans le cas du côté injecté ou non injecté, respectivement. Les têtes de flèches indiquent les parties segmentées visibles sur l'embryon. **B** : Les embryons ont été transversalement coupés au scalpel comme indiqué sur le schéma. La région dorsale des embryons est vers le haut et le côté injecté est reconnu grâce à la co-injection de l'ARN *LacZ* (coloration bleu) et indiqué par un astérisque rouge. **C** : Evaluation qualitative des phénotypes somitiques. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique. Les p value indiquées ont été obtenues par des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test exact de Fisher. Aucune différence significative n'a été observée entre les conditions contrôles.



Figure 28 : Altération de la somitogenèse chez les morphants *adsl* au stade bourgeon caudal tardif.

Les embryons issus ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO *adsl* ou le cMO. Ils ont été cultivés jusqu'au stade 40 puis une immuno-histochimie avec l'anticorps 12/101 a permis de mettre en évidence les cellules musculaires différenciées (marquage marron). **A** : Exemples de différents phénotypes somitiques qui ont pu être observés chez les embryons injectés avec 10 ng de MO1 *adsl*. Les embryons sont en vue latérale, partie dorsale en haut et partie antérieur à gauche ou à droite dans le cas du côté injecté ou non injecté, respectivement. **B** : Zoom au niveau des somites antérieurs d'un embryon représentatif ayant des somites altérés (10 ng) ou des chevrons absents (20 ng) du côté injecté. La partie antérieure des embryons est à gauche et la partie dorsale en haut. **C** : Evaluation qualitative des phénotypes somitiques. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique et correspondent à des embryons obtenus après fécondation d'ovocytes issus de deux femelles dans chaque condition. Les p value indiquées ont été obtenues par des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test exact de Fisher (10 ng) ou un test de Xhi² (20 ng). Aucune différence significative n'a été observée entre les conditions contrôles.



Figure 29 : Altération de la somitogenèse chez les morphants *ppat* au stade jeune bourgeon caudal.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO *ppat* ou le cMO. Ils ont été cultivés jusqu'au stade 27-28 puis une immuno-histochimie avec l'anticorps 12/101 a permis de mettre en évidence les cellules musculaires différenciées (marquage marron). **A** : Exemples représentatifs des différents phénotypes qui ont pu être observés dans les différentes conditions. Les embryons sont en vue latérale, région dorsale en haut et région antérieure à gauche ou à droite dans le cas du côté injecté ou non injecté, respectivement. L'embryon injecté par 20 ng de MO est vu dorsale et présente un faible marquage (flèche) du côté injecté indiqué par un astérisque. **C** : Evaluation qualitative des phénotypes somitiques. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique. Les p value indiquées ont été obtenues par des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test exacte de Fisher. Aucune différence significative n'a été observée entre les conditions contrôles.

a. Altération des somites

Chez les morphants adsl injectés avec 10 ng de MO1 adsl, presque tous les embryons au stade 26 (25/26 embryons) présentent une altération des somites du côté injecté par rapport au côté non injecté (Figure 27). Les somites paraissent majoritairement moins larges selon l'axe antéro-postérieur et également plus petits dans l'axe dorso-ventral. Il est possible de distinguer les chevrons mais ils sont moins bien individualisés, avec des fibres mal alignées. Ils apparaissent également moins nombreux. A une dose plus élevée de MO, le marquage avec l'anticorps 12/101 est toujours présent mais faible du côté injecté. Le territoire marqué est restreint, voire très restreint au niveau dorso-ventral et antéropostérieur, par rapport au côté non injecté. La structure caractéristique en chevron n'est pas présente chez une grande partie des embryons (12/14 embryons) même si quelques somites segmentés sont parfois encore visibles (Figure 27, têtes de flèches). Des coupes transversales des embryons ont permis de mettre en évidence un myotome plus petit du côté injecté des morphants par rapport au côté non injecté, ainsi qu'un marquage plus faible à la dose la plus élevée (Figure 27B). Ces résultats indiquent donc une implication du gène adsl dans la formation des somites chez le xénope et en particulier sur la segmentation mais aussi sur la formation du myotome différencié. A un stade bourgeon caudal tardif, les mêmes phénotypes somitiques observés au stade 26 sont retrouvés, avec 58/72 et 59/62 embryons présentant des somites désorganisés à la suite de l'injection de 10 ng et 20 ng de MO adsl, respectivement (Figure 28). Néanmoins, ces phénotypes sont très hétérogènes entre les embryons, avec une sévérité de phénotypes plus ou moins importante. En plus des phénotypes décrits précédemment, les somites sont également souvent plus arrondis ou droits du côté injecté et ne présentent majoritairement pas la forme caractéristique en chevrons retrouvée du côté non injecté. A la dose la plus forte, les cellules sont différenciées mais ne sont pas alignées et les chevrons sont absents chez 50/62 embryons, montrant que la segmentation n'a pas eu lieu. Alors que le phénotype de désorganisation somitique est très clair au niveau antérieur, la structure des somites postérieurs semble peu affectée chez les morphants adsl injectés avec 10 ng de MO. Le gène adsl joue donc un rôle lors de la formation des somites avec une implication plutôt précoce dans la somitogenèse.

Les morphants ppat au stade jeune bourgeon caudal présentent eux aussi une structure somitique altérée du côté injecté (Figure 29). Les embryons injectés avec 2,5 ng de MO ont pour la plupart (14/21 embryons) des somites fins dans l'axe antéro-postérieur et moins nombreux par rapport au côté non injecté. De plus, les somites les plus antérieurs présentent des défauts d'organisation avec des chevrons déstructurés. Il en est de même avec 10 ng de MO chez 15/22 embryons, mais la déstructuration des somites est plus importante et visible également au niveau des somites postérieurs. De plus, chez 6/21 embryons, aucune structure en chevron n'est visible, mais le marguage avec l'anticorps 12/101 est toujours présent. A une dose plus importante de MO ppat, tous les embryons ont des somites altérés avec un marquage faible (Figure 29, flèche) et la proportion d'embryons qui ne présentent pas de structure en chevrons du côté injecté (12/16) augmente par rapport à une dose plus faible de MO. A un stade bourgeon caudal tardif, nous retrouvons les mêmes atteintes somitiques du côté injecté des morphants et dans les mêmes proportions qu'au stade 25 (Figure 30), ce qui est cohérent avec les résultats précédents. Les phénotypes sont également plus prononcés au niveau antérieur et les somites apparaissent plus petits dans l'axe dorso-ventral.



Figure 30 : Altération de la somitogenèse chez les morphants *ppat* au stade bourgeon caudal tardif.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO *ppat* ou le cMO. Ils ont été cultivés jusqu'au stade 40 puis une immuno-histochimie avec l'anticorps 12/101 a permis de mettre en évidence les cellules musculaires différenciées (marquage marron). A : Exemples représentatifs des différents phénotypes somitiques qui ont pu être observés dans les différentes conditions. Les embryons sont en vue latérale, région dorsale en haut et région antérieure à gauche ou à droite dans le cas du côté injecté ou non injecté, respectivement. C : Evaluation qualitative des phénotypes somitiques. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique. Les p value indiquées ont été obtenues par des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test exacte de Fisher. Aucune différence significative n'a été observée entre les conditions contrôles.



Figure 31 : Altération de la somitogenèse chez les morphants *hprt* au stade jeune bourgeon caudal.

Les embryons issus ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO *hprt* ou le cMO. Ils ont été cultivés jusqu'au stade 26 puis une immuno-histochimie avec l'anticorps 12/101 a permis de mettre en évidence les cellules musculaires différenciées (marquage marron). **A** : Exemples représentatifs de différents phénotypes qui ont pu être observés. Les embryons sont en vue latérale, région dorsale en haut et région antérieure à gauche ou à droite dans le cas du côté injecté ou non injecté, respectivement. **B** : Les embryons ont été transversalement coupés au scalpel comme indiqué sur le schéma. La partie dorsale des embryons est vers le haut et le côté injecté est reconnu grâce à la co-injection de l'ARN *LacZ* (coloration bleu) et indiqué par un astérisque rouge. **C** : Evaluation qualitative des phénotypes somitiques. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique. La p value indiquée a été obtenue par une analyse statistique réalisée à l'aide d'un test exact de Fisher.



Figure 32 : Altération de la somitogenèse chez les morphants *hprt* au stade bourgeon caudal tardif.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO *hprt* ou le cMO. Ils ont été cultivés jusqu'au stade 42 puis une immuno-histochimie avec l'anticorps 12/101 a permis de mettre en évidence les cellules musculaires différenciées (marquage marron). A : Exemples représentatifs de différents phénotypes somitiques qui ont pu être observés. Les embryons sont en vue latérale, région dorsale en haut et région antérieure à gauche ou à droite dans le cas du côté injecté ou non injecté, respectivement. C : Evaluation qualitative des phénotypes somitiques. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique et correspondent à des embryons obtenus après fécondation d'ovocytes issus de deux femelles pour chaque condition. La p value indiquée a été obtenue par une analyse statistique réalisée à l'aide d'un test de Xhi².

Enfin, les somites des morphants *hprt* au stade 26 sont eux aussi fins selon l'axe antéro-postérieur et dorso-ventral (Figure 31). Ils sont également moins nombreux du côté injecté que du côté non injecté. Leur structure est très altérée avec des fibres mal alignées et/ou des chevrons déstructurés pour 19/23 embryons et absents chez 3/23 embryons. Une coupe transversale des embryons montre que le myotome du côté injecté est plus court selon l'axe dorso-ventral mais semble également plus élargi (Figure 31B). De même, au stade 42, les somites des morphants *hprt* sont fins et déstructurés chez deux tiers des embryons injectés, c'est-à-dire avec des somites plus droits et dont les fibres sont mal alignées. Comme chez les autres morphants, le phénotype de malformation des somites est hétérogène et se localise principalement au niveau antérieur, tandis que les somites postérieurs semblent de phénotype sauvage.

Le *KD* des gènes *ppat*, *adsl* et *hprt* altère donc significativement la formation des somites, avec un effet dose dépendant sur le nombre d'embryons atteints mais aussi sur la sévérité du phénotype. Il provoque une altération de la segmentation qui semble plutôt concerner les somites antérieurs, laissant supposer un rôle de ces gènes plutôt au début de la somitogenèse, ainsi qu'une réduction de la taille des somites avec des défauts d'alignement des fibres.

b. Altération des muscles hypaxiaux

Au cours de ce travail, en plus de défauts somitiques, nous avons également pu observer une altération au niveau des muscles hypaxiaux des morphants aux stades bourgeon caudal tardifs. En effet, les embryons injectés par le MO1 *adsl* présentent une altération importante et significative des muscles hypaxiaux (Figure 33). A 10 ng de MO1, le marquage par l'anticorps 12/101 au niveau des muscles hypaxiaux est majoritairement absent chez les embryons (50/72 embryons) (Figure 33A, flèche rouge), tandis que sept clusters de cellules différenciées sont visibles chez les embryons (12/72) qui présentent donc quelques fibres musculaires différenciés réparties en sept clusters plus petits et désorganisés par rapport aux côtés non injectés des morphants et aux embryons contrôles (Figure 33A, flèche bleue). A une dose plus élevée (20 ng) de MO, la quasi-totalité des embryons (60/62) présentent une absence de marquage avec l'anticorps 12/101 au niveau des muscles hypaxiaux. L'effet du KD du gène *adsl* sur les muscles hypaxiaux est donc dose dépendant. Le gène *adsl* est donc impliqué dans la formation des muscles hypaxiaux.

De même, les morphants *ppat* injectés par 2,5 ng de MO *ppat*, présentent une réduction significative du marquage au niveau des muscles hypaxiaux (10/21 embryons) avec des clusters plus petits et moins marqués, voire une absence de marquage dans certains cas (3/21 embryons) (Figure 34). A 10 ng, la majorité des embryons ont des muscles hypaxiaux absents (39/53 embryons) (Figure 34A, flèche rouge) ou réduits (12/53 embryons) (Figure 34A, flèche rouge) ou réduits (12/53 embryons) (Figure 34A, flèche bleue). Les embryons injectés avec 20 ng de MO *ppat* ont quasi tous une absence de muscles hypaxiaux (26/27 embryons). Enfin, l'injection de MO *hprt* provoque également principalement une absence de muscle hypaxiaux chez les morphants (29/59 embryons) (Figure 35A, flèche rouge) ou un marquage réduit (22/59 embryons), révélant des fibres déstructurées et moins nombreuses (Figure 35A, flèche bleue) en comparaison avec le côté non injecté, dont le marquage montre des fibres alignées le long de l'axe antéropostérieur. Ces défauts de marquage sont significatifs par rapport aux contrôles (Figure 35B).



Figure 33 : Implication du gène *adsl* dans la formation des muscles hypaxiaux.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO *adsl* ou le cMO. Ils ont été cultivés jusqu'au stade 40 puis une immuno-histochimie avec l'anticorps 12/101 a permis de mettre en évidence les cellules musculaires différenciées (marquage marron). **A** : Exemples des différents phénotypes qui ont pu être observés chez les embryons : une réduction (flèche bleue) ou une absence (flèche rouge) des muscles hypaxiaux du côté injecté. Les embryons sont en vue latérale, région dorsale en haut et région antérieure à gauche. **B** : Evaluation qualitative des phénotypes observés au niveau des muscles hypaxiaux. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique et correspondent à des embryons obtenus après fécondation d'ovocytes issus de deux femelles pour chaque condition. Les p value indiquées ont été obtenues par des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test de Xhi².



Figure 34 : Implication du gène *ppat* dans la formation des muscles hypaxiaux.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO *ppat* ou le cMO. Ils ont été cultivés jusqu'au stade 40 puis une immuno-histochimie avec l'anticorps 12/101 a permis de mettre en évidence les cellules musculaires différenciées (marquage marron). **A** : Exemples des différents phénotypes qui ont pu être observés chez les embryons : une réduction (flèche bleue) ou une absence (flèche rouge) des muscles hypaxiaux du côté injecté. Les embryons sont en vue latérale, région dorsale en haut et région antérieure à gauche. **B** : Evaluation qualitative des phénotypes observés au niveau des muscles hypaxiaux. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique. Les p value indiquées ont été obtenues par des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test exact de Fisher. Aucune différence significative n'a été observée entre les conditions contrôles.



Figure 35 : Implication du gène *hprt* dans la formation des muscles hypaxiaux.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO *hprt* ou le cMO. Ils ont été cultivés jusqu'au stade 42 puis une immuno-histochimie avec l'anticorps 12/101 a permis de mettre en évidence les cellules musculaires différenciées (marquage marron). **A** : Exemples des différents phénotypes qui ont pu être observés chez les embryons : une réduction (flèche bleue) ou une absence (flèche rouge) des muscles hypaxiaux du côté injecté. Les embryons sont en vue latérale, région dorsale en haut et région antérieure à gauche. **B** : Evaluation qualitative des phénotypes observés au niveau des muscles hypaxiaux. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique et correspondent à des embryons obtenus après fécondation d'ovocytes issus de deux femelles pour chaque condition. La p value indiquée a été obtenue par une analyse statistique réalisée à l'aide d'un test de Xhi².

88

Le KD des gènes *ppat, adsl* et *hprt* provoque donc une altération des muscles hypaxiaux de manière dose dépendante, allant d'une réduction de muscles hypaxiaux différenciés à une absence de myofibres aux doses les plus élevées. Nous pouvons conclure que le fonctionnement de la voie des purines est requis dans la formation des muscles hypaxiaux chez le xénope.

Ces études nous ont donc permis de mettre en évidence une implication des gènes de la voie de biosynthèse de purines dans la formation des muscles squelettiques des embryons et en particulier dans la formation des somites et des muscles hypaxiaux. Nous avons également observé mais non analysé de manière quantitative, une altération des muscles cranio-faciaux chez les différents morphants (visible sur la Figure 30). Il existe donc une très forte similitude entre les conséquences phénotypiques d'un KD de ppat, de hprt et d'adsl. La perte de fonction d'un gène de la voie de novo semble donc avoir des conséquences similaires à la perte de fonction d'un gène de la voie de recyclage, ce qui laisse penser que les phénotypes observés sont spécifiques et qu'un dysfonctionnement de la voie des purines conduit à des défauts musculaires chez le xénope. Ceci est en accord avec les profils d'expression de ces gènes au niveau des tissus musculaires qui suggère un rôle dans le développement de ces tissus. De plus, le KD de ces gènes semble affecter les mêmes tissus que chez l'Homme chez qui une altération de la voie des purines provoque des défauts du développement des tissus neuro-musculaires. Ces résultats renforcent donc la pertinence de l'utilisation de X. laevis comme modèle d'étude. Nous avons alors voulu comprendre le rôle des gènes de la voie des purines au cours du développement des muscles squelettiques en identifiant à quelle(s) étape(s) de la myogenèse du xénope ils sont impliqués.

III. Implication de la voie de biosynthèse des purines dans la myogenèse chez *Xenopus laevis*

III.1 Altération du mésoderme paraxial

Afin d'étudier l'implication des gènes de la voie des purines lors de la myogenèse du xénope, nous nous sommes premièrement intéressés à la mise en place du mésoderme. Le mésoderme est précurseur des toutes les cellules musculaires. Une altération générale du mésoderme pourrait donc expliquer les différents phénotypes musculaires retrouvés lors du KD d'un gène de la voie des purines. Nous nous sommes donc demandé si le mésoderme est altéré chez les morphants *ppat*, *adsl* et *hprt*. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des hybridations *in situ* sur les morphants à un stade 11, afin de révéler l'expression du gène *xbra*, marqueur pan mésodermique. Nous pouvons observer que le *knock-down* des trois gènes d'intérêt n'altère pas l'expression de *xbra* en comparaison avec le côté non injecté (Figure 36), tandis qu'aux mêmes doses de MO, la formation des muscles squelettiques est significativement altérée (paragraphes précédents). Nous pouvons donc en conclure que la mise en place du mésoderme n'est pas atteinte chez ces embryons. Les gènes *ppat*, *adsl* et hprt ne sont donc pas nécessaires à la formation du mésoderme et les défauts myogéniques en jeu dans les altérations musculaires des différents morphants sont donc en aval de l'induction du mésoderme.



Figure 36 : La formation du mésoderme n'est pas affectée chez les morphants *ppat, adsl* et *hprt*.

L'expression du marqueur pan mésodermique *xbra* a été mise en évidence par hybridation *in situ* sur des morphants pour *ppat*, *hprt* et *adsl*. Le *knock-down* a été réalisé par micro-injection des morpholinos (MO) *ppat*, *adsl*, *hprt* ou du morpholino contrôle (cMO) dans une cellule (zone marginale) d'embryons au stade deux cellules issus de la frécondation d'ovocytes provenants d'une (N=1) ou deux femelles (N=2). Le côté injecté est reconnu grâce à l'ARNm traceur de la béta-galactosidase (coloration rouge, astérisques blanches). Vues du pôle végétatif avec le côté dorsal vers le haut. Dans chacune des conditions, 100 % des embryons ont un phénotype sauvage. Barre d'échelle : 0,5 mm.





L'expression de *myoD* (**A**) et de *myf5* (**C**) a été mise en évidence par hybridation *in situ* sur des morphants *adsl*. Le marquage a été analysé sur chaque morphant hybridé avec la sonde spécifique de *myoD* (**B**) ou de *myf5* (**D**). Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique. Le *knock-down* a été réalisé par micro-injection des MO1 et MO2 *adsl* ou du morpholino contrôle (cMO) dans la zone marginale dans une cellule d'embryons au stade deux cellules issus de la fécondation d'ovocytes provenant d'une (N = 1) ou deux femelles (N = 2). Le côté injecté est reconnu grâce à l'ARNm *LacZ* qui sert de traceur (coloration rouge, astérisques). Les embryons sont en vue dorsale avec le côté postérieur vers le haut. Les p value indiquées a été obtenues par des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test de Xhi². Barres d'échelle : 0,5 mm.



Figure 38 : Altération de l'expression de *myoD* chez les morphants *adsl* au stade jeune bourgeon caudal.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO1 *adsl* ou le cMO. Ils ont été cultivés jusqu'au stade 26 puis l'expression de *myoD* a été mise en évidence par hybridation *in situ* (marquage violet). **A** : Exemples représentatifs d'embryons présentant une réduction de marquage du côté injecté aux différentes doses de MO. Les embryons sont en vue dorsale, région antérieure à gauche et côté injecté vers le haut. **B** : Un embryon injecté avec 10 ng de MO1 *adsl* a été transversalement coupé au scalpel comme indiqué sur le schéma. La partie dorsale de l'embryon est vers le haut et le côté injecté est reconnu grâce à la co-injection de l'ARN *LacZ* (coloration rouge) et indiqué par un astérisque. **C** : Le marquage a été analysé sur chaque morphant hybridé avec la sonde spécifique de *myoD*. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique et correspondent à des embryons obtenus après fécondation d'ovocytes issus d'une (20 ng) deux (cMO 10 ng) ou trois femelles (MO *adsl* 10 ng). Les p value indiquées ont été obtenues par des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test exact de Fisher (20 ng) ou un test de Xhi² (10 ng).

Pour aller plus loin dans la compréhension des phénotypes, nous avons choisi de nous focaliser sur l'étude d'un seul gène. En effet, nous avons pu montrer que tous les phénotypes étudiés jusqu'à présent sont retrouvés chez les morphants *ppat, adsl* et *hprt,* ce qui montre que l'ensemble de la voie des purines joue un rôle au cours du développement, sans spécificité de la voie *de novo* ou de la voie de recyclage. Nous avons choisi le gène *adsl* qui a l'avantage d'intervenir dans la voie *de novo* et dans la voie de recyclage, son KD provoque donc une altération de l'ensemble de la voie des purines. Ce choix est également motivé par le fait que la déficience en ADSL est une des pathologies les plus fréquentes de la voie des purines chez l'Homme.

Puisque le mésoderme n'est pas altéré chez les morphants adsl, nous nous sommes intéressés au mésoderme paraxial qui est à l'origine de tous les muscles squelettiques et initiateur de la première vague myogénique (Della Gaspera, 2012a). Pour cela, nous avons étudié l'expression de myoD et myf5, les deux facteurs myogéniques (MRF) marqueurs du mésoderme paraxial et impliqués dans la spécification du myotome. Nous avons réalisé des hybridations in situ sur les morphants adsl en fin de gastrulation (stade 12.5). L'expression de myoD est fortement réduite du côté injecté chez une grande majorité des morphants adsl injectés avec le MO1 (49/54 embryons) (Figure 37). Cette réduction correspond à une diminution du territoire marqué et à une baisse d'intensité du marquage. Elle est visible aussi bien dans la partie médiane que latérale, mais est plus prononcée au niveau antérieur et est significative par rapport aux embryons contrôles. Ce phénotype est tout à fait comparable à celui observé avec le MO2 adsl puisqu'une réduction similaire du marquage a été observée chez la totalité des embryons injectés avec ce second MO. De plus, l'expression de myf5, spécifique de la population cellulaire médiane du mésoderme paraxial, est également significativement réduite du côté injecté chez 63/71 des morphants adsl, avec une réduction plus prononcée au niveau antérieur (Figure 37).

Alors que le mésoderme est correctement mis en place chez les morphants, le mésoderme paraxial est, quant à lui très affecté. Les phénotypes musculaires des morphants *adsl* ne sont donc pas la conséquence d'un défaut général du mésoderme mais seraient plutôt la résultante d'une atteinte spécifique du mésoderme paraxial.

Nous avons alors étudié l'expression de *myoD* à un stade jeune bourgeon caudal. A ce stade chez les embryons sauvages, le gène myoD s'exprime dans le mésodemre présomitique (PSM) et le myotome différencié des somites. Chez les morphants adsl, l'expression de myoD est réduite du côté injecté (Figure 38). A une dose de 10 ng de MO1 adsl, la moitié des embryons présentent une réduction de marquage (27/59 embryons). A 20 ng de MO1 adsl, l'expression de myoD est réduite chez la totalité des morphants adsl, tandis que tous les embryons contrôles ont une expression sauvage. Les morphants adsl présentent donc une réduction significative et dose dépendante de l'expression de myoD à un stade jeune bourgeon caudal. De plus, nous pouvons voir sur une coupe d'embryon, que le myotome est plus petit du côté injecté des morphants adsl (Figure 38B), ce qui confirme les résultats d'immuno-marquage obtenus avec l'anticorps 12/101 des morphants adsl (Figure 27). De façon intéressante, la réduction de l'expression de myoD est plus prononcée au niveau antérieur que postérieur chez les morphants et le PSM ne semble pas être affecté à une dose de 10 ng de MO. A contrario, à cette même dose, l'expression de myoD est fortement altérée au niveau du mésoderme paraxial des morphants adsl au stade 12,5 (Figure 37). De plus, seule la moitié des morphants présentent une réduction de l'expression de myoD à un stade jeune bourgeon caudal contre la quasi-totalité des embryons au stade 12,5. Le KD du gène adsl induit donc une réduction précoce et transitoire de l'expression de *myoD*, expression qui est restaurée à un stade plus tardif.



Figure 39 : Altération de l'expression de *myf5* chez les morphants adsl au stade jeune bourgeon caudal.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO1 *adsl* ou le cMO. Ils ont été cultivés jusqu'au stade 26 puis l'expression de *myf5* a été mise en évidence par hybridation *in situ* (marquage violet). **A** : Exemples représentatifs d'embryons. Les embryons sont en vue latérale, région dorsale en haut et région antérieure à droite ou à gauche dans le cas du côté injecté ou non injecté, respectivement. **B** : Les embryons ont été transversalement coupés au scalpel comme indiqué sur le schéma. La partie dorsale de l'embryon est vers le haut et le côté injecté est reconnu grâce à la co-injection de l'ARN *LacZ* (coloration rouge) et indiqué par les astérisques. **C** : Le marquage a été analysé sur chaque morphant hybridé avec la sonde spécifique de *myf5*. Le phénotype de marquage augmenté est indiqué par une flèche en **B**. Pour chaque catégorie, les effectifs sont indiqués sur le graphique et correspondent à des embryons obtenus après fécondation d'ovocytes issus de deux femelles pour chaque condition. Les p value indiquées ont été obtenues par des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test de Xhi².

Nous nous sommes alors demandé si l'expression du facteur myogénique *myf5*, spécifique du PSM, était également sauvage chez les morphants *adsl* à un stade jeune bourgeon caudal. De façon surprenante, l'expression de *myf5* est augmentée de manière significative du côté injecté chez les morphants adsl (27/41 embryons), avec un territoire d'expression plus étendu mais plus diffus (Figure 39, flèche). Des hypothèses pouvant expliquer ce phénotypes sont discutés dans la partie Discussion (Discussion Paragraphe II.2a).

Les altérations au niveau des muscles squelettiques des morphants *adsl* peuvent donc s'expliquer par une altération précoce de l'expression des MRF *myf5* et *myoD* au niveau du mésoderme paraxial au stade 12,5. Cette altération semble transitoire, ce qui pourrait également expliquer les défauts somitiques plus prononcés au niveau antérieur des morphants et suggérent donc une implication plus importante du gène *adsl* au début de la première vague myogénique. En plus d'une altération des somites, nous avons également identifié une altération des muscles hypaxiaux, issus de la deuxième vague myogénique et nous avons donc voulu comprendre le rôle du gène *adsl* dans la formation de ces muscles.

III.2 Implication dans la formations des muscles hypaxiaux

Les muscles hypaxiaux sont à l'origine des muscles du tronc et des muscles des membres et sont majoritairement absents chez les morphants *adsl, ppat* et *hprt*. Les muscles hypaxiaux sont issus de la migration puis la différenciation des myoblastes de la partie ventro-latérale du dermomyotome des huit premiers somites du tronc [Martin et Harland, 2001]. Le marquage avec l'anticorps 12/101 des morphants montre une absence ou une réduction des muscles hypaxiaux (Figure 33). Cet anticorps étant spécifique des cellules différenciées, nous avons supposé qu'une altération de la voie des purines était à l'origine d'un défaut de différenciation des muscles hypaxiaux

Pour étudier l'hypothèse d'une altération de la différenciation des muscles hypaxiaux chez les morphants adsl, nous nous sommes intéressés à l'expression des MRF myoD et myogénine, impliqués dans la différenciation terminale des muscles hypaxiaux (Figure 40). Nous pouvons observer que l'expression de myoD au niveau des muscles hypaxiaux est significativement altérée du côté injecté chez 45/52 embryons, avec dans la plupart des cas une absence de marquage au niveau des muscles hypaxiaux (34 embryons) ou alors une réduction de marquage (11 embryons) avec un territoire marqué plus restreint et des clusters marqués plus petits ou moins nombreux (Figure 40A et B). En revanche, au niveau des somites et du PSM, myoD s'exprime à un niveau comparable entre les morphants et les embryons contrôles, ce qui confirme l'effet transitoire de KD d'adsl que nous avions précedemment supposé, sur l'expression de myoD qui est restaurée au niveau du PSM à des stades plus tardifs. De plus, l'expression du gène myogénine est principalement absente (41/50 embryons), ou réduite (8/50 embryons) au niveau des muscles hypaxiaux (Figure 40E et F) des morphants adsl. Les défauts des muscles hypaxiaux chez les morphants adsl sont donc liés à des défauts d'expression des MRF myoD et myogénine. Toutefois, il est à noter que lorsque l'expression de myoD ou de myogénine est detectable chez les morphants au niveau des muscles hypaxiaux, celle-ci parait plus dorsale que du coté injecté dans la majorité des cas (Figure 40A, flèche bleue). Nous nous sommes alors demandé si ces défauts d'expression de myoD et myogénine au niveau des muscles hypaxiaux ne pouvaient pas être la conséquence d'un défaut de migration des myoblastes.



Figure 40 : Altération de l'expression des gènes *myoD* et *myogénine* au niveau des muscles hypaxiaux des morphants *adsl*.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec 10 ng du MO1 *adsl* ou le cMO puis ont été cultivés jusqu'au stade 39-40. L'expression de *myoD* (**A** et **B**) et de *myogénine* (**C** et **D**) a été mise en évidence par hybridation *in situ* (marquage violet). Dans chaque condition, les différents phénotypes hypaxiaux ont été dénombrés, ce qui a permis de mettre en évidence des réductions (flèches bleues) ou des absences (flèches rouges) de marquages. Les embryons sont en vue latérale, région dorsale en haut et région antérieure à gauche ou à droite dans le cas du côté injecté ou non injecté, respectivement. Les effectifs pour chaque catégorie sont indiqués sur le graphique et correspondent à des embryons obtenus après fécondation d'ovocytes issus de deux femelles pour chaque condition. Les p value indiquées ont été obtenues par des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test de Xhi².

96



Figure 41 : Le *knock-down* d'*adsl* retarde la migration des myoblastes à l'origine des muscles hypaxiaux.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec le MO1 *adsl* ou le cMO. Ils ont été cultivés jusqu'au stade 38 ou 39-40 puis l'expression de *pax3* a été mise en évidence par hybridation *in situ*. **A** : Exemples de marquages obtenus chez les morphants au stade 39. Le profil d'expression de *pax3* montre la migration des myoblastes (doubles flèches) chez les morphants *adsl* avec soit une migration absente ou réduite par rapport aux côtés non injectés et aux embryons contrôles. Les embryons sont en vue latérale, région dorsale en haut et région antérieur à gauche ou à droite dans le cas du côté injecté ou non injecté, respectivement. **B** : Le marquage au niveau des myoblastes en migration a été analysé sur chaque morphants hybridés avec la sonde spécifique de *pax3*. Les effectifs pour chaque catégorie sont indiqués sur le graphique. Les p value indiquées ont été obtenues par des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test exact de Fisher. Barre d'échelle : 0,5 mm.



Figure 42 : Le retard de migration des myoblastes n'est pas la seule cause aux défauts hypaxiaux observés chez les morphants *adsl*.

Les embryons ont été micro-injectés dans la zone marginale d'une cellule au stade deux cellules avec 10 ng du MO1 *adsl* ou le cMO puis ont été cultivés jusqu'au stade 39-40. L'expression de *pax3* a été mise en évidence par hybridation *in situ* (marquage violet) puis les cellules musculaires différenciées des muscles hypaxiaux ont été immuno-marqués avec l'anticorps 12/101 (marquage marron). Ce double marquage montre que les phénotypes d'altération des muscles hypaxiaux chez les morphants *adsl* ne sont pas tous en corrélation avec un défaut de migration des myoblastes. En particulier des altérations des muscles hypaxiaux sont observées sans défaut de migration, comme indiqué par la flèche rouge en **A** et dénombré en **B**. Les embryons sont en vue latérale, région dorsale en haut et région antérieure à gauche ou à droite dans le cas du côté injecté ou non injecté, respectivement. Les effectifs pour chaque catégorie sont indiqués sur le graphique. Barre d'échelle : 0,5 mm.

Pour étudier la migration des myoblastes, nous avons réalisé des expériences d'hybridation *in situ* sur des morphants *adsl* afin de mettre en évidence l'expression de *pax3* qui s'exprime dans les myoblastes en migration [Martin et Harland, 2001]. Au stade 38, chez les embryons sauvages, la migration des myoblastes est largement entamée et *pax3* y est détectable. Le même profil est observé chez 100 % des embryons injectés avec le cMO (Figure 41). En revanche, aucune migration des myoblastes n'est observable chez une très grande majorité des morphants *adsl* (21/23 embryons). A un stade plus avancé (stade 39-40), plus que 11/29 morphants ne présentent aucune migration des myoblastes (Figure 41, flèche verte foncée) au profil de morphants dont la migration est retardée (10/29 embryons, Figure 41, flèche verte claire) ou sauvage (8/29 embryons, Figure 41, flèche noire). Nous pouvons donc conclure que la migration des myoblastes est initiée tardivement chez les morphants *adsl*.

Pour lier le défaut de migration à l'altération des muscles hypaxiaux des morphants, nous avons réalisé un immuno-marquage avec l'anticorps 12/101 sur les morphants marqués par hybridation *in situ* avec la sonde *pax3* au stade 40 (Figure 42). La proportion d'embryons dont le marquage 12/101 au niveau des muscles hypaxiaux est absent (19/29 soit 65 %) ou réduit (4/29 embryons soit 14 %) (Figure 42B) est similaire aux proportions retrouvées précedemment (50/72 embryons soit 70 % et 12/72 embryons soit 17 %, respectivement, Figure 33). En revanche, le double marquage des morphants nous montre que chez certains embryons qui présentent une migration sauvage ou retardée des myoblastes, le marquage avec l'anticorps 12/101 est réduit (3/29 embryons) voire absent (2+6 soit 8/29 embryons) (Figure 42, flèche rouge). Ceci suggère que le défaut de migration ne peut expliquer à lui seul les phénotypes observés avec le marquage avec l'anticorps 12/101 mais est tout de même en grande partie responsable de l'absence d'expression des gènes *myoD* et *myogénine* impliqués dans la différenciation terminale des muscles hypaxiaux.

Dans cette dernière partie, nous avons donc montré une implication du gène *adsl* dans la mise en place spécifique et précoce du mésoderme paraxial. Le *knock-down* d'*adsl* altère l'expression précoce des MRF *myf5* et *myoD* pouvant expliquer l'altération observée de la somitogenèse. De plus, le *knock-down* du gène *adsl* provoque une absence des muscles hypaxiaux, majoritairement causée par une altération de la migration des myoblastes. Nous n'avons pas testé l'expression des facteurs myogéniques chez les morphants *ppat* et *hprt* mais des phénotypes musculaires (somitiques et hypaxiaux) similaires ont également été observés, ce qui laisse penser qu'ils pourraient être également du à un défaut précoce de l'expression des MRF du mésoderme paraxial et à une altération de la migration des myoblastes. La voie des purines est donc impliquée lors de l'initiation de la première vague myogénique, au niveau du mésoderme paraxial, mais aussi lors de la deuxième vague myogénique, dans la migration des myoblastes et joue donc un rôle majeur sur le développement des muscles squeletiques de l'embryon de *X. laevis*.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Tableau 6 : Nombre de gènes et d'homéologues identifiés au cours de ce travail.

Lors de ce travail, nous nous sommes focalisé sur 12 enzymes clés de la voie des purines et avons pu identifier 27 gènes codant pour ces enzymes chez *Xenopus laevis*. En rouge, les gènes présents en deux copies (homéologues). Les gènes soulignés sont ceux pour lesquels la fonction enzymatique de la protéine correspondante a été validée *in vivo*.

	Enzymes X.I	Gènes X.I	homéologues
	Ppat	ppat	<u>ppat.L</u>
			<u>ppat.S</u>
	Gart	gart	<u>gart.L</u>
	Pfas	pfas	
			pfas.S
	Paics —	paics.1	paics.1.L
			paics.1.S
		paics.2.	paics.2.L
	Atic	atic	<u>atic.L</u>
			<u>atic.S</u>
	Adsl	adsl	<u>adsl.L</u>
	Adss Hprt	adssl1	adaal1 I
			<u>adssl1.L</u>
		adss hprt1	<u>uussii.s</u>
			<u>uuss.L</u>
			hnrt1 l
			hprt1.E
	Aprt	aprt	aprt.L
			<u></u>
	Gmps	gmps	gmps.L
			gmps.S
	Impdh Ampd	impdh1	impdh1.L
			impdh1.S
		limpdh2	impdh2.L
			impdh2.S
		ampd1	ampd1.L
			ampd1.S
		ampd2	
			ampd2.S
		ampd3	ampd3.L
			ampd3.S
TOTAL	12	17	27

Pendant ma thèse, nous nous sommes intéressés au rôle des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours du développement embryonnaire. En effet, chez l'Homme plusieurs pathologies associées au dysfonctionnement d'un gène de la voie des purines sont en partie causées par des altérations dans le développement des tissus neuro-musculaires. Afin de comprendre les mécanismes impliqués, nous avons mis en place *Xenopus laevis* comme modèle de développement vertébré pour ses nombreux avantages. Notre premier objectif a été de caractériser l'ensemble des gènes de la voie des purines chez le xénope, pour lesquels très peu de données étaient disponibles. Dans un second temps, nous avons réalisé des études fonctionnelles qui nous ont notamment permis de mettre pour la première fois en évidence, un rôle des gènes de la voie des purines dans le développement des muscles squelettiques. Ce travail a donc, d'une part apporté de nouvelles connaissances sur l'implication des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours du développement et ouvre d'autre part, de très nombreuses perspectives. Ces deux aspects seront discutés dans les chapitres suivants.

I. La voie de biosynthèse des purines est fonctionnelle au cours du développement de *X. laevis*

I.1 Identification des gènes codant les enzymes de la voie des purines

Au commencement de ma thèse, très peu de données concernant les gènes de la voie de biosynthèse des purines étaient disponibles chez *X. laevis*. Nous avons donc débuté par l'identification *in sillico* des principaux gènes impliqués dans cette voie. Nous nous sommes en particulier intéressés à douze enzymes et avons identifié 27 gènes codant pour ces enzymes (Tableau 6). Le génome de *X. laevis* possède plus de 56 % de gènes conservés en deux copies L et S [Session, 2016]. Ici, 10/17 gènes soit 59 % sont présents en deux copies (Tableau 6). De plus, tous les gènes en une seule copie sauf les gènes *pfas* et *ampd2* sont localisés sur le chromosome L. Or, le génome L est celui qui a été le plus conservé au cours de l'évolution de *X. laevis* [Session, 2016]. Ces observations sont donc cohérentes avec les données de la littérature et II est donc probable que les gènes identifiés en une seule copie n'aient effectivement pas de gène homéologue, d'autant qu'aucun gènes supplémentaires n'a été annoté sur la dernière version du génome mise en ligne en août 2017. Le séquençage n'étant pas totalement complet, il n'est toutefois pas exclu, même si peu probable, que les homéologues soient dans des régions qui n'ont pas encore été séquencées.

Il est important de montrer que les gènes identifiés par des analyses bioinformatiques codent effectivement pour les protéines à la fonction attendue et en particulier si des études fonctionnelles *in vivo* sont envisagées. C'est d'autant plus vrai lorsqu'il y a plusieurs gènes prédits pour coder une même activité, afin de savoir si ceux-ci sont tous fonctionnels. Connaître l'ensemble des gènes fonctionnels participant à la biosynthèse des purines est primordial pour avoir tous les outils nécessaires afin d'étudier la fonction et la régulation de la voie des purines et ainsi mieux comprendre son rôle et son fonctionnement au cours du développement. Lors de ce travail, nous avons validé la fonction des différentes enzymes de la voie des purines du xénope *in vivo* et ainsi pu montrer que les gènes identifiés bioinformatiquement codent effectivement pour les enzymes aux activités prédites (Figure 15). Pour tester la fonction des gènes *in vivo*, nous avons utilisé la levure comme système hétérologue d'expression. Nous avons pu montrer que la quasi-totalité des gènes testés

complémentent les mutations des gènes homologues de levure, ce qui montre l'efficacité de la méthode employée. Il sera également important de valider la fonction enzymatique *in vivo* des gènes identifiés chez *X. laevis* pour lesquels cela n'a pas encore été fait (Tableau 6). Au vu de l'identité très importante entre les séquences protéiques de *X. laevis* et de *X. tropicalis* (Tableau 3), il est fort probable que les protéines de *X. tropicalis*, elles mêmes identifiées par des prédictions bioinformatiques, soient également des protéines aux fonctions enzymatiques attendues.

I.2 Expression des gènes de la voie des purines chez l'embryon de xénope

a. Elaboration d'une carte comparative d'expression spatio-temporelle

Lors de ma thèse, nous avons étudié les profils d'expression spatio-temporelle des différents gènes de la voie des purines au cours du développement de *X. laevis* par des expériences de RT-PCR et d'hybridation *in situ*.

Nous voulions savoir si chacun des gènes d'intérêt s'expriment au cours du développement et avons donc réalisé des expériences de RT-PCR, méthode semiquantitative simple à mettre au point et qui nous a permis de mettre en évidence la présence des ADNc de chacun des gènes identifiés, tout au long du développement embryonnaire du xénope (Figure 17). Très récemment, les niveaux d'expression d'une grande majorité des gènes de la voie des purines au cours du développement du xénope ont été quantifiés lors d'analyses par RNAseq chez X. laevis [Session, 2016]. Ces résultats sont disponibles sur la base de données Xenbase depuis juin 2017 et regroupés en Annexe p 164. Quelques différences de profil d'expression sont à noter entre nos résultats et les résultats obtenus par RNAseq. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que ces deux techniques comportent chacune certaines limites et biais particuliers. Par exemple, le RNAseq est une technique quantitative mais grande échelle et le pourcentage de non fiabilité est estimé dans cette étude à 2 % [Session, 2016]. A l'inverse, la méthode de RT-PCR est une approche gène par gène avec une mise au point pour chaque gène, mais dont la normalisation a été réalisée sur un seul gène, le gène odc, ce qui peut entrainer des biais. Toutefois, ces résultats de RNAseq confirment ceux que nous avons obtenus par RT-PCR. En effet, dans tous les cas nous pouvons observer que l'ensemble des gènes de la voie des purines s'expriment tout au long du développement, sauf les gènes adss1/ qui sont les seuls gènes de la voie des purines dont l'expression n'est détectable qu'à partir du stade 12. Les gènes adss1 sont les seuls annotés dans les bases de données comme étant spécifique du muscle, dont la différenciation débute en fin de gastrulation (Introduction paragraphe 0). Nos résultats d'expression et ceux de RNAseq laissent donc penser que ces gènes sont bien spécifiques du tissu musculaire.

De manière surprenante, aucun des gènes étudiés par hybridation *in situ* n'a d'expression détectable dans certains tissus, comme par exemple la majorité des tissus dérivants de l'endoderme (Figure 19). Pourtant nous pourrions au contraire nous attendre à ce que des gènes impliqués dans une voie métabolique essentielle pour les cellules s'expriment de façon relativement constante et surtout dans tous les tissus. Il est donc probable que ces gènes s'expriment mais que les niveaux d'expression soient en dessous du seuil de détection de la méthode d'hybridation *in situ*. Un moyen de le vérifier serait par exemple de réaliser des RT-PCR sur des dissections d'embryons puisque cette méthode est plus sensible et que les conditions utilisées sont optimisées pour détecter la présence du

transcrit d'intérêt. Il est également possible que les métabolites puriques diffusent à travers les membranes et notamment les nucléobases et les nucléosides.

Etonnamment, le gène gart présente un profil d'expression différent de celui des autres gènes testés, avec aucune expression détectable au stade 6,5 et très faible dans les tissus musculaires (Figure 19). Cependant, de très nombreux isoformes d'épissage semblent exister chez Xenopus laevis, comme chez l'Homme, chez qui il existe de très nombreux variants d'épissage codant une seule ou plusieurs des trois activités GARS, GART et AIRS portées par la protéine GART (plateforme NCBI, gène ID 2618). La sonde d'hybridation in situ utilisée ici ne reconnait probablement pas toutes les isoformes puisqu'elle a été synthétisée à partir d'une isoforme particulière qui code pour une seule activité enzymatique sur trois (activité GARS) (Annexe p 154). Les résultats d'expression spatiale ne sont donc probablement pas représentatifs de l'ensemble des transcrits de gart codant pour une protéine Gart aux trois activités enzymatiques, mais d'une seule isoforme. D'ailleurs chez l'Homme, il a été montré que le cervelet humain n'exprime pas les mêmes isoformes du transcrit GART au cours du développement [Brodsky, 1997]. Il serait donc intéressant de déterminer si les différents gènes homéologues et/ou les différentes isoformes d'épissage que nous avons identifiés s'expriment de façon différentielle dans certain tissus au cours du développement, comme cela a récemment été montré chez le xénope adulte [Session, 2016]. Des RT-PCR sur des dissections d'embryons pourraient permettre d'avoir une première idée puisque des conditions d'amplification ont été mise au point pour détecter spécifiquement l'expression de chacun des gènes homéologues identifiés et pourrait également permettre de détecter spécifiquement les éventuels variants d'épissage.

Pour finir, il faudrait également préciser ou confirmer la localisation des transcrits par des coupes au microtome ainsi que par des doubles marquages avec des gènes spécifiques de certains tissus. Cela permettrait d'avoir une carte comparative plus précise et détaillée de l'expression des gènes de la voie des purines au cours du développement du xénope.

b. Hypothèse de régulation transcriptionnelle

Nous avons pu mettre en évidence que les gènes de la voie des purines du xénope s'expriment différentiellement dans les tissus de l'embryon au cours du développement et avec une expression principalement dans les tissus neuro-musculaires. Cela suggère l'existence de mécanismes de régulation de l'expression de ces gènes en fonction des besoins en purines, besoins qui sont très importants dans les tissus neuro-musculaires. Il serait donc important de mettre en lumière ces mécanismes pour mieux comprendre le fonctionnement de la voie des purines au cours du développement.

Alors que les mécanismes de régulation de l'expression des gènes de la voie des purines ont été identifiés chez la levure et la bactérie, ils sont peu connus chez les eucaryotes multicellulaires. Comme indiqué dans l'introduction (Paragraphe I.2), chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Il a été montré que les métabolites intermédiaires stables SZMP et ZMP sont capables d'activer la transcription des gènes de la voie *de novo* en stimulant l'interaction des facteurs de transcriptions Bas1p et Bas2p [Rébora, 2001 ; Rébora, 2005 ; Pinson, 2009]. Le ZMP joue également un rôle majeur dans la régulation de la transcription des gènes de la voie des purines chez les bactéries [Kim, 2015]. Ces régulations sont complexes, avec des mécanismes variés mais qui font tous intervenir une régulation par le ZMP.



Figure 43 : Représentation schématique de l'hypothèse de régulation de la voie des purines au niveau transcriptionnelle.

A : Une quantité importante en purines pourrait entraîner une inhibition des gènes *ppat* et *paics,* entrainant une diminution de la quantité en ZMP et SZMP, ce qui provoquerait une diminution de la transcription des gènes cibles de la voie des purines et donc une diminution du flux de la voie *de novo.* **B** : A l'inverse, une quantité plus faible en purines permettrait une levée d'inhibition de la transcription des gènes *ppat* et *paics,* entraînant une augmentation du SZMP et du ZMP et donc une augmentation de la transcription des gènes cibles de la voie *de novo* et la quantité en purines.

Chez le xénope, les gènes ppat.S et paic1.S se localisent au même locus sur le chromosome 1S et les gènes ppat.L, paics1.L et paics2.L, au même locus sur le chromosome 1L (Tableau 2). Ce phénomène est conservé puisque les gènes orthologues PPAT et PAICS sont localisés au même locus sur le chromosome 4 chez l'Homme (4q12). Cette colocalisation génomique étant conservée, il est possible qu'elle ait un sens biologique. En particulier, nous pouvons imaginer l'existence d'une corégulation transcriptionnelle de ces deux gènes impliqués dans la voie de novo. D'ailleurs, il a été montré une régulation de l'expression de PPAT et de PAICS en lien avec la prolifération et l'invasion de cellules cancéreuses du poumon [Goswami, 2015]. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse de l'existence d'une corégulation des gènes ppat et paics, en fonction de la quantité en purines (Figure 43). Or, l'enzyme Paics synthétise le SZMP qui peut alors être métabolisé en ZMP. Une diminution de la quantité en purine pourrait alors entrainer l'augmentation de la transcription des gènes ppat (qui code l'enzyme limitante de la voie de novo) et paics et de ce fait l'augmentation du SZMP et du ZMP qui a leur tour joueraient, comme chez les microorganismes, un rôle sur la transcription de l'ensemble des gènes impliqués dans la voie des purines, jusqu'à restaurer les niveaux en purines nécessaires, créant ainsi une boucle d'autorégulation (Figure 43).

Afin de tester cette hypothèse, des expériences préliminaires ont été réalisées au cours de ma thèse sur des cellules en culture provenant de la calotte animal d'embryons de xénope d'un stade blastula (culture d'« animal cap »). Ces cellules ont été cultivées dans un milieu contenant de l'AICAR, qui est soluble est capable de traverser les membranes pour ensuite être phosphorylé en ZMP. Nous avons ensuite réalisé des expériences de RT-PCR afin de déterminer si l'ajout d'AICAR pouvait activer l'expression des gènes de la voie des purines. Nous avons notamment testé l'expression des gènes atic et ppat et avons constaté une augmentation de la quantitté en ADNc de ces transcrits en réponse à l'ajout d'AICAR. Cette première expérience s'est donc avérée prometteuse mais reste à l'état préliminaire. En effet, il faudrait maintenant refaire ces expériences que nous n'avons pas eu le temps de continuer, en utilisant cette fois d'une part, plusieurs dose d'AICAR et d'autre part, en contrôlant la présence de ZMP intracellulaire par Chromatographie Ionique Haute Performance (HPIC), après différents temps d'incubation, en parallèle des RT-PCR. Il serait même envisageable de réaliser non pas des RT-PCR mais des RT-qPCR pour pouvoir quantifier l'effet éventuel du ZMP sur la transcription. Le ZMP joue un rôle clé chez la levure et la bactérie dans la régulation des gènes de la voie des purines mais aussi des voies métaboliques associées (métabolisme du phosphate ou voie de synthèse du tétrahydropholate) [Pinson, 2009; Kim, 2015]. Il serait donc intéressant dans un second temps de déterminer si le ZMP joue également des rôles similaires chez le xénope, par des approches transcriptomiques (microarrays) par exemple.

A la régulation transcriptionnelle dont les mécanismes sont encore peu connus, s'ajoute les autres modes de régulation connus. Au niveau enzymatique, il a été montré sur différents modèles cellulaires que la première étape de la voie *de novo*, codée par *PPAT*, est l'étape limitante régulée en fonction de la concentration en purines [Yamaoka, 2001], comme c'est également le cas chez les bactéries [Rolfes, 2006] et la levure [Rébora, 2001]. Enfin une régulation se fait également au niveau de la localisation subcellulaire des enzymes [Pedley et Benkovic, 2016]. Même si tous les mécanismes ne sont pas caractérisés, il apparait donc clair que la régulation de la voie de biosynthèse des purines s'effectue à plusieurs niveaux grâce à des boucles d'autorégulation. L'identification de ces boucles de régulation est primordiale pour comprendre comment, dans un tissu donné par exemple, les cellules régulent la quantité intracellulaire en purines qu'il leur est nécessaire, en réponse à

107
leur environnement. Afin d'identifier les mécanismes de régulation transcriptionnelle, l'utilisation de gènes rapporteurs couplés au gène endogène de la voie des purines d'intérêt ou l'utilisation d'un système rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène d'intérêt pourraient permettre d'étudier l'expression de ce gène en réponse à différentes concentrations externes en purines par exemple. Ces études jusqu'alors difficilement applicables en culture cellulaire ou sur organisme entier deviennent aujourd'hui possibles grâce à l'émergence de nouvelles technologies telles que le CRISPR/Cas9. Des études de ce type chez l'embryon de xénope entier ou sur culture cellulaire pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la voie des purines au cours du développement embryonnaire des vertébrés, pour lequel peu de données sont connues. En outre, identifier ces mécanismes et ainsi mieux comprendre le fonctionnement de la voie des purines au cours du développement aurai un impact direct dans la compréhension des altérations développementales liées à une déficience en purine.

Lors de ce travail, nous avons donc identifié et caractérisé les principaux gènes de la voie des purines au cours du développement du xénope, pour lesquels peu de données étaient disponibles au début de ma thèse. Ces résultats nous ont permis notamment de mettre en évidence une expression tout au long du développement de ces gènes et en particulier dans les tissus neuro-musculaires. Les expériences futures auront donc pour but de finaliser la caractérisation des gènes de la voie des purines du xénope et mieux comprendre comment, au cours du développement d'un vertébré, ces gènes s'expriment en fonction des besoins en purines.

II. Les gènes de la voie de biosynthèse des purines sont essentiels au développement du xénope

II.1 Avantages et limites des pertes de fonction partielles (*knock-down*) par injection de morpholinos

Chez l'Homme, de nombreuses données suggèrent que les gènes de la voie des purines sont essentiels et notamment lors du développement (Introduction Paragraphe II.1c). C'est également le cas chez la drosophile et le poisson zèbre chez qui des pertes de fonctions partielles ou totales d'un gène de la voie des purines provoquent une létalité embryonnaire importante (Introduction Paragraphe II.2). Chez le xénope, nos conditions expérimentales n'induisent pas de létalité embryonnaire. Toutefois, aux doses élevées de MO pour l'ensemble des gènes ciblés, le développement des embryons est très fortement altéré et ceux-ci ne seront probablement pas viables à des stades plus avancés. Il est également possible qu'à des doses encore plus élevées de MO, les embryons meurent avant la fin de l'embryogenèse. La voie de biosynthèse des purines est donc essentielle pour le développement de X. laevis. L'utilisation de knock-down (KD) est donc un gros avantage puisque cela permet de réduire partiellement la quantité en protéine en conservant une activité enzymatique résiduelle, comme c'est également observé chez les patients. Ainsi, à des doses peu élevées de MO, la voie des purines est suffisamment active pour la survie de l'embryon et nous pouvons nous départir d'une altération générale des embryons (Figure 25, aux doses les plus importantes de MO) et qui peut parfois rendre difficile les analyses et les interprétations. De plus, chez X. laevis, l'injection du MO se fait d'un seul côté de l'embryon ce qui permet également de limiter l'impact potentiellement létal du KD des gènes des purines puisque la diminution éventuelle dans la quantité en purine du côté injecté peut être partiellement compensée par certaines bases puriques ou nucléosides provenant du côté non injecté et qui traversent les membranes.

L'utilisation de MO est un outil de perte de fonction puissant [Blum, 2015] largement utilisé chez le xénope et le poisson zèbre. Cependant, l'injection d'un MO peut parfois entraîner des effets aspécifiques (« *off-target* ») [Kok, 2015]. Un guide de recommandation a l'utilisation des MO et des contrôles nécessaires a été publié [Eisen et Smith, 2008] et préconise notamment de vérifier l'efficacité des MO, d'utiliser deux MO par gène et de vérifier la spécificité des phénotypes par des expériences de sauvetage.

Lors de nos expériences de KD, nous avons pu observer des phénotypes morphologiques et musculaires très comparables suite à l'injection des MO ciblant *ppat*, hprt et adsl. Ces trois gènes sont des gènes clés intervenant dans une même voie de biosynthèse. Un dysfonctionnement de la voie de biosynthèse des purines provoqué par la perte de fonction de trois gènes distincts, entraîne donc dans tous les cas des phénotypes similaires. De plus, nous avons testé un deuxième MO ciblant adsl, qui provoque des phénotypes comparables à ceux induit par l'injection du premier MO. Nous pouvons donc supposer que les phénotypes observés chez les morphants ppat, adsl et hprt, sont bien spécifiques d'une altération de la voie des purines. Il est toutefois nécessaire de vérifier la spécificité des phénotypes par des expériences de sauvetage. La co-injection du MO hprt et de l'ARN hprt non reconnu par le MO n'a pas permis de sauver les phénotypes des morphants (Figure 26), mais il n'est pas possible de conclure quant à la spécificité des phénotypes puisque nous avons également montré que la surexpression de hprt entraîne des phénotypes comparables à ceux provoqués par la perte de fonction (Figure 26). Le sauvetage phénotypique des morphants hprt par cette méthode sera donc difficile à mettre en œuvre. Concernant le sauvetage des phénotypes des morphants ppat et adsl, les études sont en cours, mais des expériences préliminaires ont montré que la surexpression d'adsl ne provoque aucun phénotype morphologique. Un moyen alternatif pour vérifier la spécificité des phénotypes pourrait être par un sauvetage métabolique. Lors d'expériences préliminaires, nous avons pu montrer que l'adénine, l'hypoxanthine, l'inosine ou l'AICAR (précurseur du ZMP) ajoutés au milieu extérieur, pouvaient être internalisés dans l'embryon sauvage sans provoquer de phénotypes morphologiques visibles. Il serait donc possible de tester si les phénotypes retrouvés chez les morphants peuvent être sauvés pas l'ajout de purines dans le milieu extérieur. Une telle expérience permettrait de montrer que les phénotypes observés chez les morphants sont bien la conséquence d'une altération du métabolisme des purines.

Ici nous avons pu montrer que chacun des MO dont nous disposions est efficace *in vitro* (Figure 21). Il serait également pertinent de vérifier l'efficacité des MO *in vivo* et en particulier tout au long du développement. En effet, la concentration de MO se dilue au fil des divisions cellulaires ce qui pourrait expliquer le phénotype plus prononcé sur les somites antérieurs des morphants. Cette hypothèse est toutefois peu probable puisque nous avons pu observer des phénotypes tardifs (défauts de différenciation des muscles hypaxiaux, Figure 42). Afin d'éliminer définitivement cette possibilité, il est envisageable de vérifier l'efficacité des MO chez les morphants *adsl* et *hprt* à différents stades de développement, car nous sommes capable de doser l'activité *in vitro* des enzymes codées par ces gènes. Nous avons d'ailleurs mis au point les conditions de dosage sur des extraits protéiques d'embryons sauvages. Le dosage de l'activité PPAT n'est pas faisable *in vitro* mais la vérification de l'efficacité du MO *ppat in vivo* à l'aide d'un système rapporteur GFP est

envisagée. Le dosage des activités HPRT et ADSL chez les morphants permettrait de déterminer l'activité résiduelle de ces enzymes chez les embryons à différents stades de développement et de la corréler aux phénotypes observés.

II.2 Un rôle pléiotrope dans le développement embryonnaire

a. Rôle dans la formation des somites

Lors de ce travail, nous nous sommes attardés à étudier la formation des muscles squelettiques chez les morphants *ppat, adsl* et *hprt* et nous avons pu mettre en évidence des défauts de segmentation des somites ainsi qu'une diminution de la taille du myotome. De plus, nous avons montré une altération de l'expression précoce de certains facteurs de transcription myogéniques (MRF) chez les morphants *adsl*. Il est maintenant nécessaire de caractériser plus précisément ces phénotypes (au niveau cellulaire notamment) et d'identifier les mécanismes liants dysfonction d'un gène de la voie des purines, altération de l'expression précoce des MRF et défauts somitiques.

Le phénotype le plus précoce que nous avons identifié est une réduction de l'expression de myoD et myf5 au niveau du mésoderme paraxial des morphants adsl (Figure 37). L'expression de myf5 est en amont de celle de myoD [Hopwood, 1989 et 1991], mais myoD est ensuite nécessaire à l'expression de myf5 au niveau du mésoderme paraxial puisque le KD du gène myoD entraine une diminution de l'expression de myf5 [Maguire, 2012], tandis que le KD du gène myf5 n'altère pas l'expression de myoD [Keren, 2005]. De plus, le KD du gène myf5 conduit notamment à une absence de segmentation des somites [Keren, 2005]. Le KD du gène myoD conduit quant à lui, à une réduction de la taille du myotome [Della Gaspera, 2012b], des défauts de segmentation des somites antérieurs ainsi qu'un retard de sortie de la membrane vitelline des embryons [Maguire, 2012]. D'après ces données, la diminution de l'expression des MRF et en particulier celle de myoD, pourrait expliquer les phénotypes somitiques des morphants adsl puisque l'ensemble des phénotypes décrits chez les morphants myoD, ont été observés chez les morphants adsl. Afin, de tester cette hypothèse il faudrait tester la capacité de la surexpression de myoD, par rapport à celle de myf5, à sauver les phénotypes somitiques retrouvés chez les morphants adsl. Ceci est très important puisque cela permettrait de déterminer si la diminution de l'expression de myoD au niveau du mésoderme paraxial des morphants est bien la cause principale des altérations somitiques observées.

Alors que la diminution de l'expression de *myoD* et de *myf5* est très importante au niveau du mésoderme paraxial chez les morphants *adsl*, chez les morphants au stade jeune bourgeon caudal injectés avec une même dose de MO, l'expression de *myoD* au niveau du PSM n'est pas altérée tandis que le territoire d'expression de *myf5*, plus dorsal que *myoD*, parait augmenté et plus diffus du coté injecté. De plus, nous avons pu observer que le phénotype somitique des morphants est plus prononcé au niveau antérieur. Ceci suggère que la voie des purines joue un rôle plus important au début de la première vague myogénique. D'ailleurs, c'est le cas du gène *myoD* qui n'est lui-même nécessaire que pour la segmentation des somites antérieurs [Maguire, 2012]. Il serait donc très intéressant d'étudier l'expression des MRF *myoD* et *myf5* à un stade intermédiaire (stade 17 par exemple) afin de confirmer un effet précoce et transitoire d'*adsl* sur l'expression des MRF. Dans ce cas, l'expression des MRF devrait être restaurée à des niveaux sauvages en début de neurulation [Maguire, 2012].

L'expression de *myf5* au niveau du PSM des morphants *adsl* au stade bourgeon caudal, augmentée et diffuse, est plutôt inattendue puisqu'elle apparait au contraire réduite au stade 12,5. Une hypothèse simple pouvant expliquer ce profil, est un défaut d'alignement des cellules du PSM le plus postérieur. En effet, les cellules s'alignent perpendiculairement à la notochorde et des défauts d'alignement pourraient donner cet aspect diffus du PSM. Il est également possible que ce phénotype soit la conséquence, soit d'une augmentation de la prolifération des cellules, soit d'un recrutement de nouvelles cellules dans le PSM [Ludolph, 1994]. Des études sont donc nécessaires pour caractériser le PSM postérieur des morphants au niveau cellulaire et ainsi mieux comprendre les mécanismes à l'origine des défauts somitiques.

Les mécanismes liant l'altération de la voie des purines avec la diminution de l'expression des MRF myoD et myf5 sont inconnus. Les signaux qui régulent l'expression des MRF lors de la spécification du mésoderme paraxial sont nombreux et les mécanismes complexes et pas toujours établis [Heasman, 2015]. Certains facteurs d'induction du mésoderme sont impliqués dans l'expression précoce de myf5 et myoD tels que des membres de la famille Wnt [Shi, 2002] ou BMP [Khokha, 2005]. De plus, le facteur de croissance bFGF et l'activine (membre de la famille des TGF- β) activent l'expression de *myoD* [Harvey, 1991], de façon dépendante de la voie de signalisation FGF [Cornell et Kimelman, 1994]. Cette voie de signalisation joue un rôle majeur dans le contrôle de l'expression des MRF et plus généralement lors de la somitogenèse. En effet, le KD d'efgf provoque une diminution précoce et transitoire de l'expression de myoD [Fisher, 2002]. De plus, le KD de la MAP kinase Xp38 α , un activateur de *myf5*, affecte le gradient de FGF8 au niveau du PSM ce qui conduit à des défauts de segmentation des somites [Keren, 2005]. D'ailleurs, le gène fgf8 est également impliqué dans l'expression de myoD [Della Gaspera, 2012b] et la voie MAPK dans l'activité de MyoD [Zetser, 2001]. La voie de signalisation FGF est également impliquée dans la segmentation du PSM ainsi que la voie Notch [Dequéant, 2006] dont certains acteurs sont régulés par myoD [Maguire, 2012]. Pour finir, il existe de nombreux facteurs en amont des MRF impliqués dans la spécification, la croissance et la différenciation des différentes structures des somites (Wnt, Shh ou Bmp4) [Sabillo, 2016]. Tous ces acteurs sont donc imbriqués dans un réseau complexe et leur fonctionnement pourraient potentiellement être altérés par le KD du gène adsl, conduisant à une diminution de l'expression précoce des MRF et à des défauts somitiques. Il sera indispensable à terme, d'identifier les signaux directement altérés chez les morphants et qui sont en cause dans les phénotypes myogéniques que nous avons observés.

Pour finir, dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les phénotypes somitiques des morphants, il serait envisageable de réaliser un crible pharmacologique. Tous les morphants courbés du coté injecté présentent un phénotype d'altération des somites. La courbure des embryons est donc un bon indicateur d'une altération musculaire chez les morphants. De plus, aux doses de MO utilisées, une proportion très importante d'embryons présentent une courbure du coté injecté (Figure 25). Un crible de molécules thérapeutiques pourrait donc être envisagé chez le xénope afin d'identifier des molécules capables d'atténuer le phénotype de courbure. Plusieurs cribles de molécules ont été réalisés sur des embryons de xénopes sauvages [Kälin, 2009; Tomlinson, 2009] et pourrait être appliqué sur des embryons micro-injectés par un MO [Schmitt, 2014]. Un tel crible chez les morphants pourrait permettre d'identifier des cibles potentiellement impliquées dans les phénotypes d'altération musculaire, permettant de mieux comprendre les mécanismes en jeu, mais aussi d'ouvrir des pistes thérapeutiques pour les patients déficients pour un gène de la voie des purines.

b. Rôle dans la formation des muscles hypaxiaux

Lors de ma thèse, nous avons pu observer une altération des muscles hypaxiaux chez les morphants *ppat*, *adsl* et *hprt* et nous avons montré qu'elle est causée principalement par un défaut de migration des myoblastes chez les morphants *adsl*.

Il est maintenant nécessaire de comprendre les causes des défauts de migration des myoblastes chez les morphants *adsl*. La migration des myoblastes est initiée si la quantité de cellules est suffisante [Martin, 2006] et aussi s'il existe le bon équilibre entre cellules en prolifération et cellules différenciées [Amthor, 1999 ; Martin, 2007]. Plusieurs hypothèses simples pourraient donc expliquer les défauts au niveau des muscles hypaxiaux chez les morphants : 1) une altération des processus de migration cellulaire, 2) une différenciation prématurée des myoblastes, 3) une quantité trop faible en myoblastes.

Les myoblastes des muscles hypaxiaux co-migrent avec les mélanophores issus des crêtes neurales ce qui a amené l'hypothèse d'un contrôle de la migration de ces deux populations cellulaires par les mêmes mécanismes [Martin, 2001]. Or, nous n'avons pas observé d'altération de la migration des mélanophores chez les morphants (pigmentation sauvage des embryons, Figure 23), ce qui rend peu probable l'hypothèse d'un défaut des processus de migration cellulaire chez les morphants.

Une différenciation prématurée des myoblastes devrait se caractériser par une augmentation de l'expression de *myoD* au niveau des lèvres ventro-latérales des somites en expansion, aux alentours d'un stade 31 [Martin, 2007]. En effet, *myoD* induit l'expression de *p21* ce qui provoque la sortie du cycle cellulaire et donc la différenciation des myoblastes en myocytes {Halevy, 1994]. Il serait donc pertinent d'étudier l'expression de *myoD* au stade 31 chez les morphants. Toutefois, nous avons pu montrer une altération de la différenciation des muscles hypaxiaux chez les morphants *adsl* (Figure 42). L'hypothèse d'une différenciation prématurée des myoblastes avant la migration cellulaire n'est donc probablement pas celle à privilégier.

Il est donc plus probable que l'altération de la migration des myoblastes chez les morphants soit due à une quantité trop faible de myoblastes. D'ailleurs, nos données suggèrent un retard de migration (Figure 41) qui pourrait correspondre à une apparition plus tardive de la quantité en myoblastes nécessaire à l'initiation de la migration. Les lèvres dorso-médianes et ventro-latérales des somites en expansion sont marquées par l'expression de myf5 dans les myoblastes en prolifération. Dans le cas d'une quantité cellulaire plus faible que la normale, nous pourrions alors nous attendre à une diminution de l'expression de myf5 au niveau des lèvres ventro-latérales des somites. Cette éventuelle diminution de *myf5* pourrait alors s'expliquer par un défaut de prolifération des myoblastes, qu'il est possible de mettre en évidence par un immuno-marquage de l'histone H3 phosphorylée. D'ailleurs, les somites des morphants sont plus petit dans l'axe dorso-ventral (Figure 28 B) ce qui pourrait être le reflet d'une expansion moindre du myotome au niveau dorso-médian et ventro-latéral, cohérente avec notre hypothèse. De nombreux exemples illustrent une implication de la voie des purines dans la prolifération cellulaire. D'abord, la voie de novo est limitante dans la prolifération de cellules en culture [Kondo, 2000; Yamaoka 2001] et plus active dans les cellules en prolifération [Natsumeda, 1989 ; Rowe et McEwen, 1983]. Chez le poisson zèbre, les pertes de fonction des gènes qart, paics et adss provoquent des défauts de prolifération des rétinoblastes [Ng, 2009] et chez la souris, le knock-out de l'IMPDH inhibe la prolifération des lymphocytes [Gu, 2003]. Un défaut de prolifération des myoblastes chez les morphants adsl pourrait donc être à l'origine des défauts de migration des muscles hypaxiaux.

c. Autres rôles dans le développement

En plus de phénotypes musculaires, nous avons pu également observer des altérations de la taille ainsi que des défauts oculaires chez les différents morphants. La voie des purines est donc impliquée dans de nombreux processus développementaux chez le xénope. Lors de ce travail, nous nous sommes focalisé sur l'étude des phénotypes musculaires et il est nécessaire en premier lieu d'identifier les mécanismes en jeu, mais à plus long terme, il serait important de caractériser également d'autres phénotypes retrouvés chez les morphants et ainsi mieux comprendre les différentes implications de la voie des purines au cours du développement.

Tout d'abord, des défauts de formation de l'œil ont été observés chez les différents morphants. Chez le poisson zèbre, les pertes de fonction des gènes paics et gart (voie de novo) et le knock-down du gène adss (voie de recyclage) provoquent une diminution de la taille de l'œil, liée à un défaut du cycle cellulaire [Ng, 2009]. Chez le xénope nous avons également pu observer une diminution de la taille de l'œil chez les différents morphants et principalement chez les morphants ppat et hprt. Les gènes de la voie des purines semblent donc être impliqués dans le contrôle de la taille de l'œil chez ces deux espèces et un défaut du cycle cellulaire pourrait également être à l'origine d'une diminution de la taille de l'œil chez les morphants de xénope. Toutefois, nous avons aussi observé des malformations de l'œil chez les morphants et en particulier chez les morphants adsl, ce qui laisse penser qu'une perte de fonction d'un gène de la voie des purines chez le xénope pourrait en plus d'un défaut du cycle cellulaire, entrainer un défaut lors du développement de l'œil. Il est donc important de mieux caractériser les différents phénotypes oculaires au niveau morphologique (préciser les atteintes oculaires) puis au niveau cellulaire (étudier les couches cellulaires de l'œil avec marqueur de différenciation ainsi que le cycle cellulaire) et enfin au niveau moléculaire (étude des facteurs de transcription impliqués dans la mise en place des tissus oculaires). Chez la levure, le ZMP module l'activité du facteur de transcription BAS2 [Rébora, 2005] dont un des homologues chez le xénope est le facteur de transcription Pax6, impliqué dans la spécification des tissus oculaires. Durant ma thèse, nous avons étudié l'expression et l'activité du gène pax6 en réponse à l'ajout d'AICAR, précurseur du ZMP, par des approches in vitro, à l'aide d'un système rapporteur et in vivo, sur des cultures « d'animal cap ». Ces expériences se sont avérées prometteuses, avec des effets notables de l'AICAR, mais nous ne sommes pas allés plus loin dans cette étude car nous nous sommes focalisé sur l'étude des atteintes musculaires. Les gènes de la voie des purines et/ou certains métabolites intermédiaires pourraient moduler certains facteurs de transcription impliqués dans la mise en place des tissus oculaires, tels que pax6. Il serait donc très intéressant de poursuivre ces études afin de déterminer le rôle de la voie des purines dans le développement oculaire du xénope.

De plus, nous avons pu observer une taille réduite des morphants *ppat*, *adsl* et *hprt* par rapport aux embryons contrôles. Une diminution de la taille est également visible chez le poisson zèbre, suite à la perte de fonction d'un gène de la voie des purines [Ng, 2009]. De plus, certain patients déficients pour ADSL présentent un retard de croissance. La taille d'un organisme et des tissus qui le composent sont la résultante d'un équilibre entre prolifération, croissance cellulaire et apoptose mais son contrôle est complexe et implique des signaux intra et extracellulaires qui sont encore mal connus [Amodeo et Skotheim, 2016 ; Leevers et McNeill, 2005]. Une altération précoce de l'un ou l'autre de ces trois processus pourrait donc conduire à une réduction de la taille des embryons. Comme nous l'avons évoqué précédemment, la voie des purines est impliquée dans la prolifération cellulaire, tandis qu'une perte de fonction du gène codant l'enzyme PPAT ou PAICS de la voie

de novo, provoque l'apoptose chez la drosophile [Holland, 2011]. Toutefois, la diminution de taille que nous avons observée est assez conséquente à un stade tardif mais aucune différence n'est visible avant la fin de la neurulation, au moment ou l'embryon commence à s'allonger. Il est donc probable que les gènes de la voie des purines jouent plus précisément un rôle sur un signal particulier qui interviendrait sur l'élongation antéro-postérieur de l'embryon. Par exemple, *via* la voie de signalisation purinérgique (adénosine), la voie FGF ou la MAP kinase p38 qui sont tous impliqués dans l'élongation antéro-postérieure de l'embryon de xénope [Shiotsugu, 2004 ; Keren, 2005 ; Lijima, 2008]. Or, comme discuté précedement, une altération du fonctionnement de la voie FGF ou une altération de la voie MAP kinase pourrait être à l'origine de la réduction de l'expression des MRF chez les morphants. Des mécanismes en communs pourraient donc être impliqués dans les phénotypes musculaires et les phénotypes de taille. L'étude du phénotype de taille, très complexe car multifactoriel, pourrait néanmoins venir en complément du phénotype musculaire.

Il serait également très interessant d'étudier l'impact d'une perte de fonction d'un gène de la voie des purines sur le développement du système nerveux central. En effet, il est également très probable que les gènes de la voie des purines soient impliqués dans la formation du tissu neural, d'abord car les gènes de la voie des purines s'expriment tous au niveau du système nerveux central de l'embryon de xénope (Figure 19), reflétant potentiellement un rôle des ces gènes dans ces tissus nerveux. Des défauts dans la formation des tissus nerveux chez le xénope peuvent conduire à des défauts au niveau de la formation des yeux, organe dérivant également de l'ectoderme. De plus, les patients déficients pour un gène de la voie des purines présentent des symptômes neuronaux liés à des défauts développementaux et quelques études montrent que certains gènes de la voie des purines pourraient être impliqués dans des processus de développement des neurones ou de tissus dérivants des crêtes neurales [Lake, 2015; Ceballos-Picot, 2009]. La neurogenèse du xénope est très bien caractérisée [Papapopulu, 1994 ; Chitnis, 1995 ; Stern, 2005] et l'étude chez les morphants de différents marqueurs spécifiques régulant les différentes étapes de la neurogenèse (ncam, sox2/3, neuroD, neurogénine ou n-tubuline) pourrait permettre de mieux caractériser ce phénotype. L'étude des atteintes neuronales chez les morphants est importante pour mieux comprendre le rôle de la voie des purines sur le développement neuronal et ainsi mieux comprendre la physiopathologie des déficiences des gènes de la voie des purines chez l'Homme, qui se caractérisent par des atteintes neurologiques majeures.

Pour finir, Il serait intéressant d'étudier si les pronéphros, les reins embryonnaires du xénope, se forment correctement chez les morphants. En effet, certains gènes de voie des purines, comme *adsl*, s'expriment dans les reins et pourraient donc être impliqués dans le développement de ces tissus. La formation du pronephros du xénope est plutôt bien connue [Chan, 2006]. Un point intéressant est que la formation correcte des somites antérieurs est requise pour la spécification du pronéphros [Seufert, 1999 ; mitchell 2007]. De plus, de nombreux signaux impliqués au cours de la myogenèse sont également impliqués dans la mise en place du rein chez le xénope. Par exemple, l'inhibition de la voie de signalisation FGF, qui est impliquée dans l'expression précoce de *myoD*, est nécessaire à la mise en place du champ pronéphrique [Cartry 2006 ; Colas, 2008]. Cette voie ferait intervenir la voie de l'acide rétinoïque [Le Bouffant, 2012] impliquée également dans la segmentation des somites. Il est donc possible que les morphants des gènes de la voie des purines présentent également des altérations dans la formation du pronephros chez le xénope et qui pourraient étre étroitement liées aux défauts myogéniques que nous avons identifiés.

II.3 Implication des purines dans les phénotypes des morphants

Lors de ce travail, nous n'avons pas observé de différences phénotypiques entre les embryons contrôles et les morphants avant la gastrulation. Pourtant, au cours de la segmentation, avant la MBT, les divisions cellulaires sont très importantes et rapides ce qui nécessite une quantité importante d'ATP et de GTP essentiels pour la réplication de l'ADN ou la synthèse protéique [Yamaoka, 2001]. De plus, la quantité relative des transcrits des gènes de la voie des purines est très importante avant la MBT comparativement aux autres stades de développement, suggérant une importance particulière de ces gènes lors de la segmentation. Il est donc possible que les protéines maternelles présentent initialement dans la cellule œuf soient en quantité suffisante chez les morphants, au moins jusqu'à la MBT. Les demi-vies des enzymes de la voie des purines ne sont pas connues. Sur des lymphocytes humains en culture, la demi-vie de l'enzyme HPRT a été estimée à plus de 48 h et celle de l'ARN à seulement 5 h [Steen, 1991]. La MBT se produisant au bout de quelques heures après la fécondation chez le xénope (environ 6h à 23°C), il est donc probable qu'une quantité suffisante en protéines Hprt perdure au-delà de la MBT et que les MO n'aient donc pas d'effet avant la gastrulation. Une autre hypothèse possible et non exclusive de la première serait un effet seuil, cohérent avec les profils d'expression des gènes de la voie des purines. En effet, l'abondance de transcrits de ces gènes est importante avant la MBT puis est plus faible pendant la gastrulation. Suite à l'injection de nos différents MO de traduction, la quantité de transcrit cible traduit et donc l'activité résiduelle devrait être moindre à des stades de gastrulation plutôt qu'à des stades pré-MBT, où la quantité en ARN est comparativement plus importante. L'activité enzymatique résiduelle de Ppat, Hprt ou Adsl chez les morphants réspectifs serait alors suffisante pour le développement précoce des embryons.

De nombreuses études montrent que la voie *de novo* est très active dans les cellules en prolifération et que son activité est limitante pour la division cellulaire [Kondo, 2000]. Néanmoins, il a également été montré que l'utilisation de la voie de recyclage est privilégiée tant que l'hypoxanthine est disponible [Kondo, 2000]. Or au début de l'embryogenèse de xénope, l'hypoxanthine est fortement accumulée puis décroit rapidement au cours du développement jusqu'à atteindre des niveaux relativement stables en fin de neurulation [Tocco, 2015]. Ici, nous avons observé des phénotypes similaires entre les morphants *ppat* (voie *de novo*), *hprt* (recyclage de l'hypoxanthine) et *adsl* (voie *de novo* et voie de recyclage). Ceci suggère que c'est l'homéostasie des purines qui est requise au cours du développement du xénope, quelle que soit la voie de synthèse utilisée pour maintenir le contenu en purines. Il est donc aussi probable que les mécanismes en jeu dans les phénotypes des morphants soient comparables quelques soit le gène des purines ciblé.

Afin de déterminer l'impact métabolique d'une dysfonction de la voie des purines lors de l'injection des différents MO, des analyses métaboliques seraient pertinentes. Des conditions d'extractions métaboliques ont été mises au point sur embryons entiers sauvages [Tocco, 2015] et permettent de détecter par HPIC, la majorité des bases, nucléotides et nucléosides puriques de la voie de recyclage, ainsi que les dérivés du ZMP de la voie *de novo*. Ces analyses pourraient permettre dans un premier temps de valider l'efficacité des MO et en particulier en mettant en évidence la présence de certains métabolites retrouvés accumulés chez les patients déficients en adsl (SAICAR, S-AMP et dérivés) ou déficients en hprt (ZMP, ATP et S-AMP notamment) [Ceballos-Picot, 2015]. D'autre part, des hypothèses pourraient être émises quant à l'implication éventuelle d'un manque en purines sur les phénotypes observés. Par exemple, chez le poisson zèbre, il a été suspecté un rôle spécifique de la synthèse des nucléotides A par rapport à celle des nucléotides G au cours du

développement [Ng, 2009]. Il serait alors ensuite intéressant de tester quelles purines ajoutées dans le milieu de culture (adénine, guanine, hypoxanthine ou AICAR) peut sauver quel(s) phénotype(s) des morphants. Un ajout à partir de différents stades du développement pourrait permettre de mieux comprendre l'implication des purines dans les phénotypes précoces (mésoderme paraxial) et tardifs (muscles hypaxiaux). Ces études pourraient permettre de lier les purines aux phénotypes et ainsi mieux comprendre l'implication de celles-ci dans les atteintes associées à la déficience d'un gène de la voie des purines.

Les purines jouent un rôle intracellulaire mais interviennent également au niveau extracellulaire. En particulier, l'ATP, l'ADP et l'adénosine extracellulaires jouent un rôle via la voie purinérgique. La contribution de la voie des purines dans la voie purinérgique n'est pas connue mais un dysfonctionnement de la voie des purines pourrait provoquer une altération dans la concentration en purines extracellulaires et affecter ainsi le fonctionnement de la voie purinérgique. L'activation de la voie purinérgique via l'ATP inhibe la prolifération et stimule la différenciation musculaire sur modèle cellulaire mammifère [Ryten, 2002] et joue aussi un rôle dans la formation des jonctions neuromusculaires [Ryten, 2007]. Chez le xénope, l'ATP extracellulaire semble avoir un rôle dans la formation des jonctions neuromusculaires [Fu, 1995] et l'adénosine extracellulaire est impliquée dans le contrôle de la taille de l'embryon, la mise en place de l'axe antéro-postérieur et l'expression de myoD au niveau des somites antérieurs [Lijima, 2008]. De plus, chez le xénope, la voie purinérgique est impliquée dans le développement oculaire [Massé, 2007]. Or, chez les morphants ppat, adsl et hprt, nous avons pu observer des phénotypes d'altération oculaires, musculaires et une diminution de la taille des embryons. Il est donc possible que les phénotypes observés chez les morphants soient en partie en lien avec un dysfonctionnement dans la voie purinérgique. Une étude sur des cellules pluripotentes humaines en culture a montrée qu'une déficience en HPRT entraîne une réduction significative de l'expression du récepteur purinérgique p2Y1 et un signal purinérgique aberrant (réduction du facteur de transcription pCREB et de la β -caténine phosphorylée et activation constitutive de la MAP kinase phospho-ERK1/2) [Mastrangelo, 2012]. Afin de determiner l'implication de la voie purinérgique dans les phénotypes des morphants, nous pourrions dans un premier temps étudier l'activité de cette voie chez les morphants en étudiant ces différents acteurs puis lier les éventuelles altérations avec les phénotypes des morphants par des expériences de sauvetage par exemple.

Enfin, il est possible que les enzymes de la voie des purines jouent des rôles non métaboliques au cours du développement. Par exemple, l'enzyme GMPS, qui intervient dans la voie de recyclage, joue également un rôle dans la régulation de l'activité d'une protéase d'ubiquitine qui intervient dans la déubiquitylation sélective de l'histone H2B chez la drosophile [Van der Knaap, 2005]. Il est donc possible que les différents phénotypes des morphants ne soient pas exclusivement la conséquence d'un défaut en purines mais soient également du à une autre altération.

L'ensemble de nos résultats a donc permis de montrer un rôle essentiel de la voie des purines pour le développement de *X laevis* et notamment pour le développement des muscles squelettiques. Nous avons en particulier montré des défauts somitiques qui pourraient être la conséquence directe d'une altération précoce de l'expression des MRF *myoD* et *myf5*. De plus, des défauts de migration des myoblastes sont principalement en cause dans les altérations au niveau des muscles hypaxiaux que nous avons mis en évidence.

Il est maintenant essentiel de décrypter les mécanismes à l'origine de ces phénotypes, et de les lier aux dysfontionnements du métabolisme purique et ainsi mieux comprendre le rôle développemental de la voie des purines.

III. *Xenopus laevis*, nouveau modèle vertébré pour l'étude du rôle développemental des gènes de la voie des purines

III.1 Vers une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les pathologies de la voie de biosynthèse des purines

Les résultats de cette étude nous ont permis de mettre en évidence pour la première fois un rôle des gènes de la voie de biosynthèse des purines dans le développement des muscles squelettiques chez un modèle vertébré. La myogenèse de tous les vertébrés possède de nombreuses caractéristiques communes. La myogenèse du xénope est comparable à celle des autres vertébrés, mais possède néanmoins quelques spécificités {Elinson, 2007] qu'il est nécessaire de prendre en compte pour pouvoir éventuellement transposer les phénotypes observés chez les morphants, aux autres vertébrés déficients pour un gène de la voie des purines et notamment dans les pathologies humaines qui entraînent des symptômes neuro-musculaires.

Tout d'abord, la myogenèse du xénope a cette particularité de se décomposer en une myogenèse primaire, qui se déroule lors de l'embryogenèse et une myogenèse secondaire, qui prend place lors de la métamorphose [Chanoine, 2003]. Lors de la myogenèse secondaire, l'ensemble des muscles de la queue disparaissent, ceux du tronc sont remplacés [Alley, 1989; Nishikawa et Hayashi, 1995] et de nouveaux muscles apparaissent lors de la formation des membres. Toutefois, la myogenèse primaire du xénope est comparable avec la myogenèse des autres vertébrés tant au niveau de la morphogenèse que du contrôle transcriptionnel myogénique [Sabillo, 2016]. L'autre particularité majeure chez le xénope est que la myogenèse est indépendante de la formation du dermomyotome, qui se forme après l'apparition des fibres musculaires les plus précoces [Grimaldi, 2004], contrairement aux amniotes (mammifères, reptiles et oiseaux) chez qui toutes les cellules musculaires du tronc et des membres dérivent du dermomyotome [Buckingham et Vincent, 2009). De ce fait, la myogenèse médiane et latérale qui entraîne la formation de cellules musculaires différenciées avant la formation du premier somite chez le xénope [Della Gaspera, 2012a], pourraient avoir disparu chez les amniotes. L'expression de myf5 et de myoD qui apparait au niveau du mésoderme paraxial chez le xénope n'apparait donc pas avant la formation des somites chez les amniotes [Pownall, 2002]. Il semble cependant que certains aspects du programme d'expression des MRF associés à la myogenèse médiane et latérale ont été conservés. Par exemple, l'existence de lignées myogéniques dépendantes et indépendantes de myf5 est également retrouvée chez la souris [Haldar, 2008; Gensch, 2008] et cette dernière pourrait correspondre aux cellules exprimant myoD dans la myogenèse latérale chez le xénope [Della Gaspera, 2012a].

La formation des muscles hypaxiaux, issus de la deuxième vague myogénique chez le xénope, est particulièrement conservée [Elinson, 2007]. En effet, les processus impliqués dans le développement des muscles hypaxiaux, précurseurs des muscles des membres, sont les mêmes chez le xénope et chez les amniotes avec tout d'abord l'expression de *pax3* au niveau de la région ventro-latérale du dermomyotome des somites [Williams et Ordahl,

1994]. Les myoblastes exprimant *pax3* migrent ventralement et se différencient avec l'expression de *myf5* puis de *myoD* [Bajard, 2006]. Tandis que la formation des muscles hypaxiaux et des membres se produisent en même temps chez le poulet et la souris, ces deux processus sont découplés chez le xénope. Les mêmes mécanismes sont néanmoins également mis en jeu chez ces espèces [Elinson, 2007]. Il est donc possible que les défauts retrouvés au niveau des muscles hypaxiaux chez les morphants des gènes de la voie des purines du xénope, se retrouvent également chez d'autres vertébrés ayant une déficience dans la voie des purines.

Chez les patients atteints d'une pathologie de la voie des purines (Introduction paragraphe II.1b), les symptômes neuro-musculaires en commun dans ces pathologies, sont en partie provoqués par des défauts développementaux. Alors que la plupart des études se focalisent à mieux comprendre les symptômes neurologiques des patients, la composante musculaire de ces pathologies est peu étudiée. Ici, nous avons pu montrer un rôle des gènes de la voie des purines dans le développement musculaire du xénope. De plus, il est fort probable que ces gènes soient également impliqués dans la formation du système nerveux chez le xénope. *Xenopus laevis* est donc un bon modèle pour étudier l'impact d'une dysfonction de la voie des purines sur le développement embryonnaire. Poursuivre les études chez le modèle vertébré simple *X. laevis*, peut permettre de lier l'altération de la voie des purines à des défauts développementaux tels que des défauts de formation des muscles squelettiques, en identifiant les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu chez cette espèce et pouvant ainsi expliquer comment une déficience d'un gène de la voie des purines peut altérer des processus particuliers du développement.

Il sera également nécessaire par la suite de compléter ces études sur d'autres modèles. Par exemple, il serait possible de générer des souris *knock-out* dans un tissu ou cellules particuliers, ce qui permettrait d'éviter la létalité embryonnaire et de confirmer dans un tissu spécifique, la conservation des mécanismes altérés par la perte de fonction d'un gène de la voie des purines au cours du développement.

Tous ces résultats permettront de mieux comprendre la physiopathologie des maladies humaines. La compréhension de ces mécanismes est essentielle pour améliorer la prise en charge des patients et à terme, fournir des pistes thérapeutiques qui pourraient permettre de réduire au moins en partie, les symptômes des patients et améliorer leurs conditions de vie.

III.2 Vers une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement embryonnaire

Au-delà d'une meilleure compréhension des pathologies humaines de la voie des purines, cette étude s'inscrit dans un domaine plus large dont les travaux visent à mieux comprendre les processus qui régulent le développement des vertébrés.

Premièrement, cette étude a permis d'identifier de nouveaux acteurs, les gènes de la voie des purines, comme impliqués lors de la myogenèse. Elle apporte donc de nouvelles données pour la compréhension des mécanismes régissant la myogenèse des vertébrés. Tous nos résultats ainsi que les résultats obtenus avec d'autres organismes modèles (Introduction Paragraphe II.2) suggèrent un rôle de la voie de biosynthèse des purines dans le développement de tissus spécifiques, comme l'œil ou les muscles squelettiques. Le métabolisme des purines semble donc avoir un rôle majeur dans la régulation du développement.

Alors que le métabolisme des purines et plus largement le métabolisme cellulaire est souvent exclusivement associé à la question de l'homéostasie de la cellule, l'hypothèse qu'il puisse intervenir dans des processus développementaux émerge. En effet, l'apparition de nouvelles technologies de pointe a permis d'améliorer notre connaissance du métabolome et en particulier au cours du développement [Lombard-Banek, 2017]. Des études ont permis de mettre en évidence des variations métaboliques importantes au cours de l'embryogenèse du xénope [Vastag, 2011] et du poisson zèbre [Huang, 2013]. De plus, il a été montré que le contenu en métabolites varie au sein de l'embryon de xénope au stade cellule œuf [Shrestha, 2014] et également d'une cellule à l'autre au stade 8 cellules, 16 cellules et 32 cellules [Onjiko, 2016; Onjiko, 2017]. Ces résultats ont amené les auteurs à émettre l'hypothèse d'un rôle particulier du contenu métabolique pour le développement spécifique de chacune de ces cellules et il semblerait en effet qu'il soit impliqué dans le devenir cellulaire [Onjiko, 2015]. D'autres études ont également permis de mettre en évidence un rôle du métabolisme dans des processus développementaux tels que la spécification des cellules souches hématopoïétiques [Oburoglu, 2016] ou encore la différenciation de cellules souches embryonnaires [Moussaieff, 2015].

Toutes ces données récentes pointent donc une implication du métabolisme dans le développement des vertébrés. Alors que les connaissances actuelles des mécanismes régissant les processus développementaux se basent essentiellement sur l'étude des gènes, des produits de gènes et de leur expression, les effets métaboliques qui peuvent régulés ou être régulés par ces gènes ne sont pas connus. Comprendre le rôle du métabolisme au cours du développement est donc un enjeu important pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires en jeu dans le contrôle du développement [Johnson, 2016]. Cela pourrait alors avoir des impacts plus larges comme pour le traitement des cancers par exemple.

Conclusion

Au cours de ma thèse, nous avons cherché à mieux comprendre le rôle des gènes de la voie de biosynthèse des purines au cours du développement embryonnaire. En effet, chez l'Homme plusieurs pathologies associées au dysfonctionnement d'un gène impliqué dans la voie de biosynthèse des purines provoquent en particulier des atteintes neuro-musculaires. Ces atteintes sont en partie la conséquence d'altérations au cours du développement des tissus neuro-musculaires mais celles-ci ne sont pas connues. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués, nous avons mis en place *Xenopus laevis* comme modèle de développement vertébré.

Ce projet collaboratif entre mon équipe d'accueil et Karine Massé a débuté quelques mois avant le début de ma thèse. Notre premier objectif a été de caractériser l'ensemble des gènes de la voie des purines chez le xénope puisqu'au commencement de ma thèse, très peu de données concernant ces gènes n'étaient disponibles chez *Xenopus laevis*. Tout d'abord, nous avons identifié bioinformatiquement les principaux gènes codant les enzymes de la voie des purines du xénope, puis nous avons validé cette identification en mettant en évidence *in vivo* la fonction enzymatique des différentes activités prédites. Enfin, nous avons mis en évidence leur profil d'expression spatiotemporelle au cours de l'embryogenèse du xénope. Ce premier travail, indispensable, a ainsi aboutit à la caractérisation de la quasitotalité des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des purines chez *Xenopus laevis*.

Dans un second temps, nous avons réalisé des études fonctionnelles sur l'embryon de xénope. Pour cela, nous avons réalisé des *knock-down* de trois gènes clés de la voie des purines, *ppat, adsl* et *hprt*, par micro-injection de morpholinos. Ces études ont permis de mettre en évidence un rôle essentiel de ces gènes pour le développement embryonnaire du xénope et notamment pour le développement des muscles squelettiques. En particulier, nous avons pu montrer une altération importante dans la formation des somites et des muscles hypaxiaux des morphants. Des études plus approfondies chez les morphants *adsl* nous ont permis de montrer une altération précoce et spécifique de l'expression des facteurs myogéniques *myoD* et *myf5*, pouvant être à l'origine des défauts somitiques observés chez les morphants. De plus, nous avons mis en évidence un défaut de migration des myoblastes à l'origine des altérations au niveau des muscles hypaxiaux de ces embryons.

Ce travail a donc montré qu'une dysfonction de gènes de la voie des purines peut être à l'origine de défauts développementaux majeurs des tissus musculaires chez le xénope, qui s'avère donc être un bon modèle d'étude des pathologies humaines associées à une altération d'un gène de la voie des purines. La compréhension des mécanismes impliqués est maintenant un enjeu important, tant pour mieux comprendre les altérations développementales à l'origine des symptômes dans ces pathologies, que pour mieux comprendre l'implication de la voie de biosynthèse des purines et plus largement le métabolisme purique, dans le développement embryonnaire des vertébrés.

MATERIEL ET METHODES

I. Liste des plasmides utilisés

La liste des plasmides utilisés pendant la thèse est répertoriée dans le tableau cidessous (Tableau 7). Il comprend notamment :

- Les clones IMAGE,
- Les plasmides utilisés lors des expériences de complémentations fonctionnelles (détail en paragraphe V),
- Les plasmides utilisés comme matrice pour synthétiser les sondes d'hybridation in situ (détails sur la synthèse des sondes en paragraphe VII.1 et sur les séquences en Annexe p 154),
- Les plasmides utilisés comme matrice pour synthétiser des ARN utilisés lors des expériences de traduction *in vitro* (détails en paragraphe III.2) ou comme traceur d'injection des embryons.

Numéro	gène	Squelette	Provenance	utilisation
1	vide	pCM189	Banque du laboratoire	Test de complémentation
2	ADE4	pCM189	Banque du laboratoire	Test de complémentation
3	ADE8	pCM189	Banque du laboratoire	Test de complémentation
4	ADE5,7	pCM189	Banque du laboratoire	Test de complémentation
5	ADE1	pCM189	Banque du laboratoire	Test de complémentation
6	ADE2	pCM189	Banque du laboratoire	Test de complémentation
7	ADE17	pCM189	Banque du laboratoire	Test de complémentation
8	ADE13	pCM189	Banque du laboratoire	Test de complémentation
9	APT1	pCM189	Banque du laboratoire	Test de complémentation
10	HPT1	pCM189	Banque du laboratoire	Test de complémentation
11	ADE12	pCM189	Banque du laboratoire	Test de complémentation
10		pCMV-	Source BioScience	Stackage
12		SPORT6	IRBHp990H1017D	Stockage
13	ppat.L	pCM189	Ce travail	Test de complémentation
14		pSK	Ce travail	Sonde HIS ppat
15		pBF	Ce travail	Traduction in vitro
10	nnat S -	pCMV-	Source BioScience	Stockago
10		SPORT6	IMAGp99800914583Q	Stockage
17	μραι.5	pCM189	Ce travail	Test de complémentation
18		pBF	Ce travail	Traduction in vitro
19	aart I -	nFxnress-1	Source BioScience	Stockage
		pexpress 1	IRAKp961C16299Q	
20	guntit	pKS	Ce travail	Sonde HIS gart
21		pCM189	Ce travail	Test de complémentation
22	gart X.t	pCMV-	Source BioScience	Stockage
22		SPORT6	IMAGp998B1011965Q	
23		pCM189	Ce travail	Test de complémentation
24	paics.1.S	pCMV-	Source BioScience	Stockage
		SPORT6	IRBHp990F0459D	
25		pCM189	Ce travail	Test de complémentation
26	paics.1.L	pCMV-	Source BioScience	Stockage
		SPORT6	IRBHp990G071D	Stockage
27		pCM189	Ce travail	Test de complémentation

Tableau 7 : Liste et caractéristiques des plasmides utilisés lors de ce travail.

Numéro	gène	Squelette	Provenance	utilisation	
20		pCMV-	Source BioScience	Stockage	
20	paics.2.L	SPORT6	IRAKp961P06157Q	Stockage	
29		pCM189	Ce travail	Test de complémentation	
30		pCMV-	Source BioScience	Stockage	
50		SPORT6	IRBHp990H0610D	Stockage	
31	adsl.L	pCM189	Ce travail	Test de complémentation	
32		pSK	Ce travail	Sonde HIS adsl	
33		pBF	Ce travail	Traduction in vitro	
34		nExpress-1	Source BioScience	Stockage	
	atic.l	h h	IRBHp990G1167D		
35		pCM189	Ce travail	Test de complémentation	
36		pSK	Ce travail	Sonde HIS atic	
37		pCMV-	Source BioScience	Stockage	
	atic.S	SPORT6	IRAKp961G14156Q		
38		pCM189	Ce travail	Test de complémentation	
39		pCMV-	Source BioScience	Stockage	
	adssl1.L	SPORT6	IRBHp990B1280D		
40		pCM189	Ce travail	Test de complémentation	
41		pCMV-	Source BioScience	Stockage	
	adssl1.S	SPORI6	ІКВНр990С0135D		
42		pCM189	Ce travail	lest de complementation	
43		pCMV-	Source BioScience	Stockage	
	adss.L	SPORI6		T	
44		pCM189	Ce travail	lest de complementation	
45		ркѕ	Ce travail	Sonde HIS adss	
46		pCMV-	Source BioScience	Stockage	
	· -	SPORI6	IKBH990B02030D		
4/	hprt1.L	pCM189	Ce travail	lest de complementation	
48		ркѕ	Ce travail	Sonde HIS hprt	
49		pBF	Ce travail	I raduction in vitro et sauvetage des	
	har and A. C.		Ca tasaatil	pnenotypes	
50	nprt1.5	pCIVI189	Ce travali	l'est de complementation	
51		pExpress-1	Source BioScience	Stockage	
	aprt.L	pCN4190		Tast de complémentation	
52		pCIVI189	Ce travall		
53		ркз	Ce travali	Sonde His apri	
54		pCS111	Source BioScience	Stockage	
	gmps.L				
55	vbre	pCIVI189			
50	xura	p5P/3	K. IVIASSE		
5/	myod1	pGEIVITeasy	K. Masse	Sonde HIS myoD	
58	myf5	pGEMTeasy	K. Massé	Sonde HIS myf5	
59	рах3	рКS	Ce travail	Sonde HIS pax3	
60	myogénine	pGEMTeasy	C. Chanoine	Sonde HIS myogénine	
62	LacZ	pGEMT	K. Massé	Traceur d'injection	

II. Identification bioinformatiques des gènes de X. laevis

Les séquences ont été identifiées grâce aux données présentes sur les bases de données Xenbase (<u>http://www.xenbase.org/entry/</u>) et NCBI (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>).

Les alignements ont été réalisés en utilisant l'outil BLAST disponibles sur Xenbase : <u>http://www.xenbase.org/genomes/blast.do?db=Nucleotide/Xenla 7 1 Scaffolds</u>

Les séquences codantes ont été virtuellement traduites en utilisant l'outil de traduction disponible sur le portail ExPASy (<u>http://web.expasy.org/translate/</u>).

La comparaison des différentes séquences codantes et protéiques a été réalisée en utilisant l'outil BLAST disponible sur la plateforme NCBI : https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Les clones IMAGE ont été identifiés en utilisant l'outil BLAST disponible sur la plateforme NCBI et en comparaison à la base « *Expressed Sequence Tags* » (est).

Le détail de la méthode utilisée pour l'identification des gènes est dans la partie Résultat (Paragraphe I.1) et un exemple pour le gène *ppat* est donné en Annexe p 150.

III. Manipulations d'acides nucléiques

III.1 Clonages

Le fragment d'intérêt à cloner à été amplifié par PCR puis a été digéré par des enzymes de restriction (Thermo Scientific) ou a été directement obtenu par digestion d'un plasmide donneur. Le fragment d'intérêt ainsi que le plasmide receveur préalablement digéré ont été précipités par ajout de NaAc 3 mM final et trois volume d'éthanol, 15 minutes à -80°C puis resuspendus dans de l'eau milliQ. Ils ont ensuite été ligués par de la T4 DNA ligase (Thermo Scientific) deux heures à température ambiante ou une nuit à 4°C. Les produits de ligation ont ensuite été transformés dans la bactérie.

Des bactéries DH5 α chimio-compétentes ont été transformées par les plasmides grâce à un choc thermique : 30 minutes dans la glace puis une minute à 42°C. Les bactéries ont ensuite été incubées 1 h à 37°C en milieu LB (10 g/L de Bactotryptone, 5 g/L d'extrait de Levure et 5 g/L de NaCl) puis étalées aux billes de verres sur milieu séléctif (LB + ampicilline à 150 µg/mL).

Après 24h de croissance la présence du plasmide d'intérêt a été vérifiée par des PCR réalisées à partir de quelques cellules de colonies bactériennes, directement ajoutées au mélange réactionnel de la PCR.

L'ADN plasmidique des clones candidats a été extrait à l'aide du kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), selon les recommandations du fournisseur, à partir de 4 mL d'une culture liquide de 24 h en milieu séléctif, de bactéries transformées. Les plasmides candidats ont finalement été séquencés par la société GATC Biotech.

III.2 Traduction *in vitro*

Les ARN utilisées lors de la traduction ont été transcrits *in vitro* à l'aide du kit *mMESSAGE mMACHINE® SP6* (Ambion) selon les recommandations du fournisseur. La matrice utilisée a été préalablement linéarisée comme détaillé en Tableau 8 puis purifiée à l'aide du kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermi Scientific).

Tableau 8 : Détail expérimental ayant permis de générer les ARN in vitro.

Les étoiles correspondent aux ARN dont la séquence a été modifiée pour ne plus être reconnu par le MO. Pour le détail des plasmides, se référer au Tableau 7.

Numéro du plasmide	Enzyme de linéarisation	ARN générée	
12	Xbal	ppat.L	
15	Sall	ppat.L*	
16	HindIII	ppat.S	
18	Xhol	ppat.S*	
30	Xhol	adsl.L	
33	Xhol	adsl.L*	
46	Notl	hprt.L	
49	Sacl	hprt.L*	

La traduction *in vitro* a ensuite été réalisée à l'aide des réactifs du kit *rabbit reticulocyte lysate system* (Promega). Les ARN est les MO ont préalablement été chauffés à 65°C pendant 3 et 10 minutes, respectivement et conservés dans la glace. La réaction de traduction a été réalisée à 30°C dans un volume final de 25 µL contenant 1 µL de MO à 40 ou 400 ng/µL, 1 µL d'ARN à 0,5 µg/µL, 0,5 µL d'acides aminés sans méthionine à 1 mM, 0,5 µL de RNAse inhibitor à 40 U/µL (Promega), 17,5 µL de « *rabbit reticulocytes lysate* » et 2 µL de [³⁵S]méthionine (1,200 Ci/mmol à 10 mCi/mL). Des tubes contrôles sans MO ou sans ARN ont également été préparés. Après 1 h 30 d'incubation, la réaction a été stoppée par l'ajout de 25 µL de bleu de charge (Tris/HCl pH 6,8 à 0,35 mM, SDS à 10,28 %, β-mercaptoéthanol à 5 %, glycérol à 36 % et bleu de bromophénol à 0,025 %), puis les tubes ont été chauffés 2 min à 95°C et conservés à -20°C.

Les produits de traduction (5 μ L par réaction) ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12,5 %. Le gel a ensuite été séché sous vide pendant 1 h à 80°C, puis la quantité de protéine traduite présente dans le gel a été détectée au phosphorimager (Typhoon).

III.3 Extraction des ARN totaux de xénope

Pour chaque condition testée, trois embryons ont été broyés dans 350 μ L d'une solution KT (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8 et 1 % SDS) puis traités à la protéinase K (90 μ g) pendant 15 minutes à 37°C. La première extraction a été réalisée par l'ajout d'un volume de phénol suivie d'une centrifugation de 5 minutes à 16 000 g à 4°C. La phase aqueuse a été récupérée et les acides nucléiques ont ensuite été précipités 30 min à - 20°C par ajout de deux volume d'éthanol froid et en présence de 1 μ L de glycogène coloré (Euromedex) à 20 mg/mL. Après 20 minutes de centrifugation à 18 000 g à 4°C, le culot a été

Tableau 9 : Conditions d'amplification utilisées lors des RT-PCR.

Le nombre de cycle, les températures d'hybridation (T°) et les amorces (sens et anti sens) ayant servis pour l'amplification par PCR de chacun des gènes sont indiqués. Les tailles en paires de baes (pb) correspondent aux tailles attendues lors de l'amplification spécifiques des ADNc ou aux tailles prédites dans le cas d'une amplification non attendue d'ADN génomique résiduel.

	1			Nombre	taille ADNc	taille ADNg
Gènes		Amorces (5'-3')		de cycles	(pb)	(pb)
ppat.L	sens	GTTAGTCCCTGTGGCCGCT	54	28	227	> 5000
	αsens	GCCCATGCCCTTGTGCATTC	54			
ppat.S	sens	GAAGCGCGAGGTGTGTGTG	58	29	255	7368
	αsens	GCCCATGCCCTTGTGCATTC				
aart I	sens	CAGAGACAGTTCTAGTGATTGG	56	29	245	3119
gart.L	αsens	GATAATCCCTGCTGCCAGAG				
nfan C	sens	CTGACAGAACGTGCAGGG	53	29	393	1975
pjus.s	αsens	CTAGTCTGGAACTTTATGAG	22			
naice 1 S	sens	CAGAACCACGTGGTACTGCC	FG	30	377	1726
puics.1.5	αsens	GATCCCAGCCTCCTGCAGC	50			
paics 11	sens	GAAATGGAGTCTTACGCAGAAC	52	27	222	2047
puics.1.L	αsens	GATCCCAGCCTCCTGCAGC	55			
naics 21	sens	GCATTTGTTAAGAGGTGCAG		28	344	515
puics.z.L	αsens	CCAAACTTAATCCTCATGTCC	55			
adel I	sens	ATGGCCTTCAACTTCAGCGA	55	20	389	4976
uusi.L	αsens	AACGTTGGCATCTCTGCGTA		20		
atic I	sens	GCTGCTAGCGACTTTATCCAG	57	31	311	7113
utic.L	αsens	GGGTACAGGTTACACACAAC				
atic S	sens	GCTGTTTGCGGAGATGGAG	53	30	322	7667
4110.5	αsens	GGGTACAGGTTACACACAAC				
adss 1 I	sens	CAAGTGGCATTATCAACCCC	51	30	267	4710
<i>uuss.i.</i> L	αsens	CTTTGGATGAATATGTTGGTC	51			
adss 1 S	sens	GTGGCATTATAAATCCTAAAGC	53	29	264	6443
4435.1.5	αsens	CTTTGGATGAATATGTTGGTC	55			
adss.1	sens	CCGCTACAGTAAGCGTAAC	51	28	332	16978
003512	αsens	GCTTTCATAGGAAATGGTGTG				
hprt1.1	sens	CTAAACATTATGCAGCCGATC	54	26	315	3493
	αsens	CATTCTTGCCTGTCAAGGTGG	5.			
hnrt1.S	sens	CTAAACACTACGCCGCCAGC	52	29	315	5499
npreiio	αsens	CATTCTTGCCTGTCAAGGTGG	52			
aprt.L	sens	CAGATTATGTCCGATCAGGAG	57	29	306	2260
	αsens	GCTAACAGATTCTGTGGGAC	57			
amps.L	sens	GAGCGATGGGCAGAGATC	56	28	322	2045
9	αsens	CTGTAAGAGCGACAGTCC				
amps.S	sens	GAGGGTTGGGTAGAGAAC	53	3 29	322	3106
3	αsens	CTGTAAGAGCGACAGTCC				
odc.1.L	sens	GTCAATGATGGAGTGTATGGATC	55	23	298	> 800
000.1.2	αsens	TCCATTCCGCTCTCCTGACCAC				

remis en suspension dans 90 μ L d'une solution contenant 4 U de DNAse (RQ DNasel, Promega) et 20 U de RNAse inhibitor (Promega) et incubé 30 minutes à 37°C. La DNAse a ensuite été éliminée par ajout de 360 μ L de solution KT et 90 μ g de protéinase K, 20 minutes à 37°C. Deux extractions successives ont ensuite été réalisées comme précédemment par l'ajout d'un volume de phénol d'abord puis un volume de phénol/SEVAG ensuite. Les ARN ont alors été précipités 20 minutes par l'ajout de deux volumes d'éthanol. Après 20 minutes de centrifugation à 18 000 g à froid, le culot a été lavé à l'éthanol 70 % puis séché à température ambiante. Pour finir, le culot a été remis en suspension dans 10 μ L d'eau stérile pure (Molecular Biology Grade, Fisher).

La quantité d'ARN a été mesurée à l'aide d'un NanoDrop[™] (Thermo Scientific) et la qualité des préparations a été contrôlée par électrophorèse sur gel agarose 1 % en TBE (Tris Borate EDTA, Fisher). Les ARN ont été conservés dans la glace et stockés à -20°C.

III.4 Réactions de RT-PCR

La réaction de rétrotranscription de l'ARN de xénope a été réalisée avec 2 μ g d'ARN totaux chauffés 5 minutes à 75°C (ou de l'eau pour le contrôle –ARN) auquel ont été ajoutés des « Random Hexamers primers » (Invitrogen) à 2,5 μ M, des dNTP à 0,5 mM, 20 U de RNAse inhibitor (Promega) et du tampon *5X First Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM Magnesium Chloride, Invitrogen), dans un volume final de 28 μ L. Après 5 minutes à 37°C, 400 U de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) (ou de l'eau dans le cas du contrôle –RT) ont été ajoutés puis la rétrotranscription a été réalisée 1 h à 37°C. Pour finir, la réaction a été stoppée par incubation 5 minutes à 95°C.

Les ADNc ainsi obtenus ont été amplifiés par PCR selon les conditions répertoriées dans le Tableau 9, puis les produits d'amplifications ont migrés sur gel d'agarose 2 %. Les amorces ont été prévues sur deux exons différents afin de discriminer par la taille, l'amplification spécifique des ADNc d'une éventuelle amplification de l'ADN génomique résiduel. Les produits de PCR ont également été séquencés par la societé GATC Biotech.

IV. Western blot

Les protéines totales de xénope ont été extraites à partir de 3 embryons par stade par ajout de 150 μ L d'un tampon HB (HEPES 100 mM, sucrose 0,3 M pH 7,4 et antiprotéases (Complete mini Roche)). Les embryons ont ensuite été soumis à sonication trois fois cinq secondes puis mis sous agitation forte pendant 2 h à 4°C en présence de 1 % triton X-100. Enfin, le surnageant a été récupéré après centrifugation 10 min à 13 000 g à 4°C, puis dilué dans du tampon de charge (6X : Tris/HCl pH 6.8 à 0,35 mM, SDS à 10,28 %, β-mercaptoéthanol à 5 %, glycérol à 36 % et bleu de bromophénol à 0.025 %).

Les extraits ont été dénaturés 3 minutes à 95°C puis l'équivalent d'un embryon été déposé sur gel de polyacrylamide à 15 %. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose par transfert semi-sec. La présence de la protéine Atic a été mise en évidence à l'aide de l'anticorps anti-ATIC au 1/2 500 000^e (Thermo Scientific MA1-086).

Matériel et méthodes

V. Tests de complémentation chez la levure

V.1 Milieux de culture et souches

Le milieu YPDAUW (*Yeast extract Peptone Dextrose* adénine uracile tryptophane) est un milieu riche contenant 2,3 % d'agar, 1 % d'extrait de levure, 2 % de peptone, 2 % de glucose et supplémenté par 0,2 mM de tryptophane, 0,3 mM d'uracile, 0,3 mM d'adénine.

Le milieu SDW (*Synthetic Dextrose* tryptophane) est un milieu synthétique contenant 2,3 % d'agar, 5 % de sulfate d'ammonium, 0,17 % de « *yeast nitrogen base* » (Difco), 2 % de glucose, 0,2 mM de tryptophane. Ce milieu est supplémenté soit par 0,2 % d'hydrolysat de caséine, soit par un cocktail d'acides aminés (arginine, méthionine et tyrosine à 0,1 mM, acide aspartique et acide glutamique à 0,6 mM, phénylalanine à 0,3 mM, sérine à 3,6 mM, thréonine à 1,7 mM, valine à 1,3 mM, lysine et histidine à 10 mg/mL).

Si nécessaire, les milieux sont également supplémentés par 0,3 mM d'hypoxanthine.

Les souches utilisées et leur génotype sont répertoriés dans le tableau ci-après (Tableau 10).

nom de la souche	Génotype
WT	MATα ura3 his3 leu2 lys2
ade4	MATα ura3 his3 leu2 lys2 ade4::KanMX4
ade13 ade1	MATa ura3 his3 leu2 ade1::KanMX4 ade13::KanMX4
ade16 17	MATα ura3 his3 leu2 ade16::KanMX4 ade17::KanMX4
ade1	MATα ura3 his3 leu2 lys2 ade1::KanMX4
ade2	MATa ura3 his3 leu2 lys2 ade2::KanMX4
ade2 aah1 apt1	MATα ura3 ade2 apt1 aah1
ade2 hpt1	MATa ura3 his3 leu2 ade2::KanMX4 hpt1::KanMX4
ade2 ade12	MATα ura3 his3 leu2 lys2 ade2 ade12::HIS3
ade8	MATα ura3 his3 leu2 met15 ade8::HIS3
ade5,7	MATα ura3 his3 leu2 lys2 ade5,7::HIS3

Tableau 10 : Caractéristiques des souches de levures utilisées lors de ce travail.

V.2 Transformation des levures et tests de croissance

Afin de réaliser les transformations de levure, les cellules ont été cultivées 24 h sur milieu solide YPD AUW à 30°C avant d'être repiquées sur le même milieu et incubées 4-6 h à 30°C. Environ 10^8 - 10^9 cellules fraîchement repiquées ont été placées dans un mélange contenant 100 µL de « *one step* » (LiAc 1,02 %, polyéthylène glycol 3350 40 % pH 5), 10 µL de dithiothreitol 1 M, 5 µL d'ADN de sperme de saumon dénaturé à 10 µg/µL et environ 900 ng d'ADN à transformer. Le mélange a été placé 30 minutes à 45°C, étalé aux billes de verre sur milieu sélectif puis incubé ensuite 48-72 h à 30°C.

Pour réaliser les tests de croissance (tests en goutte), les levures transformées ont été cultivées 24 h sur milieu séléctif puis mises en suspension en eau stérile à 10^7 cellules/mL. Trois dilutions sérielles au dixième à partir de cette suspension ont ensuite été réalisées en eau stérile et 5 µL de chacune des dilutions ont été déposés sur milieu sélectif. Les boites ont été incubées à 30°C et 37°C pendant 2-7 jours et scannées chaque jour.

VI. Manipulation d'embryons

Les différentes manipulations sont en accord avec les recommandations incluses dans "the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the European Community". Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique en expérimentation de Bordeaux Nu33011005-A.

VI.1 Fécondation in vitro, micro-injection et culture d'embryons

Les femelles ont été stimulées par une injection dans les sacs lymphatiques d'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG, Sigma). Elles ont été placées une nuit à 20°C dans un bac d'eau puis transférées dans un bac contenant une solution saline MMR à 1X (*Marc'sModifiedRinger's saline* solution [Ubbels, 1983]). Les ovocytes pondus ont été récupérés et mis à sec dans une boite de pétri. Ils ont été badigeonnés avec un morceau de testicule de xénope fraichement prélevé. Après 5 min d'incubation, les ovocytes ont été recouverts d'eau pour permettre l'entrée du spermatozoïde. Les œufs fertilisés ont ensuite été dégangués par traitement à la L-cystéine hydrochloride, pH 7,8 (Sigma-Aldrich) à 3 % en MMR 0,1X, puis cultivés dans une solution de MMR 0,1X contenant 10 µg/mL de sulfate de gentamycine.

Dans le cas où les embryons ont été utilisés pour des micro-injections, ils ont été placés dans une solution de ficoll 5 % et injectés grâce à un capillaire placé sur un micro-injecteur. Les embryons ont été injectés par 10 nL (pour un stade deux cellules) ou 5 nL (pour un stade quatre cellules) contenant entre 2,5 et 20 ng de MO et 250 pg d'ARN *LacZ* (traceur d'injection transcrit *in vitro* à l'aide du kit *mMESSAGE mMACHINE® SP6* d'Ambion, selon les recommandations du fournisseur), puis placés à 12°C. Le lendemain de l'injection les embryons ont été transférés dans une solution de MMR 0,1X contenant 10 µg/mL de gentamycine sulfate. La liste des MO utilisés et leur site de fixation sont présentés en Annexe p 163.

Les embryons ont été cultivés entre 12 et 20°C et transférés chaque jours dans du nouveau milieu, jusqu'au stade désiré, déterminé selon les tables de Nieuwkoop et Faber.

VI.2 Fixation et révélation de l'activité β-galactosidase

Les embryons ont été fixés 20 minutes dans une solution de MEMFA (0,1 M de MOPS à pH 7,4, 2 mM d'EGTA à pH 8, 1 mM de MgSO₄ et 3.7 % de formaldéhyde).

Après lavages en DPBS 1 X (Gibco), les embryons ont été incubés à 37°C dans une solution de coloration (K3Fe(CN)₆ à 20 mM, K4Fe(CN)₆ à 20 mM, MgCl₂ à 2mM, Igepal[®] CA-30 à 0.02 %, en DPBS 1X) contenant 1 mg/mL de substrat de la β -galactosidase dilué en formamide (red-gal ou X-gal). Lorsque la coloration des embryons était suffisante, ils ont été rincés en DPBS 1X puis conservés dans une solution de MEMFA à 4°C.

VII. Hybridation in situ des embryons

VII.1 Préparations préliminaires

Les sondes ARN marquées à la digoxygénine ont été obtenues par transcription *in vitro*. Environ 500 ng de plasmide linéarisés ont été transcrit avec 40 U d'ARN SP6, T3 ou T7 polymérase (Roche) en fonction du plasmide (Tableau 11), en présence de 40 U de RNAse inhibitor (Promega) et d'UTP couplé à la digoxygénine (DIG RNA labelling mix, Roche). La réaction a été effectuée pendant 3 h à 37°C dans un volume total de 20 µL. La matrice ADN a ensuite été éliminée par incubation avec 4 U de RQ1 DNAse (Promega) pendant 15 min à 37°C. La sonde a été précipitée dans de l'éthanol 70 % en présence d'environ 2 mM de EDTA pH 8 et 90 mM de LiCl, pendant 15 min à -20°C. Elle a alors été remise en suspension dans de l'eau stérile pure (Molecular Biology Grade, Fisher). La qualité de la sonde a été contrôlée par électrophorèse sur gel agarose 1 % en TBE (Tris Borate EDTA, Fisher). Elle a été dénaturée 5 min à 65°C avant première utilisation puis conservée dans la glace et stockée à - 20°C. Les séquences des sondes utilisées sont répertoriées en Annexe p 154.

Au préalables, la membrane vitelline des embryons au stade 25-26 et si nécessaire, a été retirée à l'aide de pinces avant la fixation. Les embryons ont été fixés en MEMFA et, le cas échéant, colorés pour mettre en évidence l'activité béta-galactosidase, selon le protocole décrit précédemment. Ils ont ensuite été lavés abondamment à l'eau puis déshydratés par lavages successifs dans des solutions de concentrations croissantes d'éthanol absolu (25, 50, 75 et 100 %).

Numéro du plasmide	Enzyme de linéarisation	Enzyme de transcription	Sonde générée
14	Notl	Т3	ppat sens
14	EcoRV	Τ7	ppat antisens
20	BamHI	Т3	gart sens
20	EcorV	Τ7	gart antisens
32	Kpnl	Τ7	adsl sens
32	Sacl	Т3	adsl antisens
36	Xhol	SP6	<i>atic</i> sens
36	EcoRI	T7	atic antisens
45	Sacl	Т3	adss sens
45	Sall	T7	adss antisens
48	Asel	T7	hprt sens
48	Sacl	Т3	hprt antisens
53	Kpnl	T7	aprt sens
53	EcoRV	Т3	aprt antisens
56	BgIII	T7	xbra antisens
57	Spel	T7	myoD antisens
58	Ncol	SP6	myf5 antisens
59	Sall	T7	pax3 antisens
60	Spel	T7	myogénine antisens

Tableau 11 : Détail expérimental ayant permis de générer les sondes d'hybridation *in situ*.

Matériel et méthodes

VII.2 Protocole d'hybridation

Les embryons ont été réhydratés en PBS-Tween (1X DPBS, 0,1 % Tween 20) par lavages successifs dans des solutions d'éthanol aux concentrations croissantes en PBS-Tween (25, 50, 75 et 100 %). Ils ont été perméabilisés 5 min à température ambiante par incubation avec 10 μ g/mL de protéinase K.

Afin de réduire le bruit de fond potentiellement engendré par la présence de groupements NH_3^+ , les embryons ont été incubés en triéthanolamine 0,1 M pH 7,5 (tampon sans amines primaires) et de l'anhydrique acétique a été ajouté pour permettre l'acétylation de ces groupements.

Les embryons ont été rincés en PBS-Tween, fixés 20 min en PBS-Tween 4 % formaldéhyde, puis lavés en PBS-Tween. Ils ont ensuite été pré-hybridés 6 h à 60°C en présence de solution d'hybridation (50 % formamide, 5X SSC, 1 mg/mL torula RNA, 1X Denhart, 0.1 % Tween-20, 100 μ g/mL héparine et 10 mM EDTA). Pour l'étape d'hybridation, les embryons ont été recouverts de la solution d'hybridation contenant la sonde dénaturée, une nuit à 60°C.

Après deux lavages de 30 min à 60°C dans la solution d'hybridation, les embryons ont été lavés trois fois pendant 20 min à 60°C dans une solution 2X SSC pH 7,8 (Euromedex) 0.1 % CHAPS puis les ARN simple brins non fixés ont été digérés pendant 30 min à 37°C par incubation avec 10 µg/mL de RNAseA. Les embryons ont ensuite été lavés en 2X SSC pH 7,8 puis 0.2X SSC pH 7,8-0.1 % CHAPS, puis incubés en solution de MAB (0.1 M acide maléique pH 7,5, 150 mM NaCl). Les sites aspécifiques ont été bloqués une heure en blocking-MAB (solution de MAB contenant 2 % Blocking Reagent et 5 % de sérum de chèvre préalablement inactivé 30 min 55°C) puis les embryons ont été recouverts de l'anticorps primaire préalablement préincubé avec des embryons à différents stades représentatifs de la phase embryonnaire, dilué au 1:2000 en blocking-MAB, la nuit à 4°C (anti-Digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline, Roche).

Le lendemain, les embryons ont été lavés six fois une heure en MAB, rincés en DPBS 1X, incubés deux fois 15 minutes dans le tampon de coloration (0,1 M Tris pH 9,5, 50 mM MgCl₂, 0,1 M NaCl, 0,1 % Tween-20 et 5 mM lévamisole) avant d'être incubés dans le « BM Purple » (substrat coloré de la phosphatase alcaline, Roche), à l'obscurité.

Une fois les embryons colorés, ils ont été lavés en DPBS 1X puis si nécessaire, la présence de coloration aspécifique a été éliminée par des bains successifs de 10 minutes en éthanol 50 %, trois fois 100 % méthanol puis éthanol 50 %. Les embryons ont été fixés dans une solution à 9,25% de formaldéhyde et 5 % d'acide acétique.

Pour finir, les embryons ont été rincés avec une solution d'éthanol 70 % en DPBS 1X puis dépigmentés totalement dans une solution de dépigmentation (1 % H_2O_2 , 5 % formamide et 0,5X SSC en DPBS 1X) sous la lumière.

Les embryons ont été lavés en DPBS 1X puis stockés dans du DPBS 1X 4 % formaldéhyde à 4°C.

VIII. Immuno-marquage des embryons

A partir du stade 25 et si nécessaire, la membrane vitelline des embryons a été retirée à l'aide de pinces afin qu'ils retrouvent une position droite avant la fixation. Les embryons ont été fixés en MEMFA et colorés pour mettre en évidence l'activité béta-galactosidase, selon le protocole décrit précédemment. Dans le cas où l'immuno-marquage a été réalisé à la suite d'hybridation in situ, les embryons (stockés dans du DPBS 1X 4 % formaldéhyde à 4°C), ont directement suivis les étapes ci-dessous.

Les embryons ont été rincés abondamment à l'eau puis ont été déshydratés par lavages successifs dans des solutions de concentrations croissantes de méthanol (25, 50, 75 et 100 %).

Les embryons ont été réhydratés par des lavages successifs dans des solutions deméthanol aux concentrations croissantes en DPBS-1X (25, 50, 75 et 100 %). Ils ont ensuite été lavés en PBT (1X DPBS, 0,1 % Triton X-100). Les sites aspécifiques ont été bloqués deux heures à 4°C en PBT contenant 10 % de sérum de chèvre préalablement inactivé 30 min 55°C, puis les embryons ont été recouverts de l'anticorps primaire 12/101 (DSHB) dilué au 1:200 en PBT (1 :100 pour les stades tardifs), la nuit à 4°C.

Le lendemain, les embryons ont été lavés cinq fois une heure en PBT, avant d'être recouvert de l'anticorps secondaire pur (Anti-mouse Immunoglobulin/HRP, Dako, K4007), la nuit à 4°C.

Le lendemain, les embryons ont été lavés cinq fois une heure en PBT, avant d'être recouvert de la solution de coloration DAB (Dako, K4007). Au bout de quelques minutes, lorsque la coloration des embryons était suffisante, les embryons ont été rincés à l'eau puis fixés dans une solution de MEMFA, une nuit à 4°C.

Pour finir, les embryons ont été rincés avec une solution de DPBS 1X puis dépigmentés totalement dans une solution de dépigmentation (1 % H_2O_2 , 5 % formamide et 0.5X SSC en DPBS 1X) sous la lumière. Les embryons ont enfin été lavés en DPBS 1X puis stockés dans du DPBS 1X 4 % formaldéhyde à 4°C.

IX. Observations et acquisitions d'images

Les embryons ont été observés à la loupe binoculaire, placés dans du DPBS 1X, dans une boite de Pétri contenant un fond d'agarose 1 %.

Les photographies ont été prises à l'aide d'une caméra VWR Visicam 5.0 et du logiciel Visicam Analyser7.

Les mesures de la taille des embryons ont été réalisées en utilisant le logiciel ImageJ. Trois mesures ont été prises sur trois photos différentes (vue dorsale, côté gauche et côté droit) pour chaque embryon puis la moyenne de ces mesures a été reportée dans le logiciel GraphPad pour représenter les résultats sous forme de graphique.

X. Analyses statistiques

Le test de Xhi² a été réalisé sur Microsoft Excel. Lorsque les conditions d'application n'étaient pas respectées, un test exact de Fisher a été appliqué. Les tests exact de ficher ont été réalisés *via* le site biostaTGV :

http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/?module=tests

Le test t de Student a été réalisé à l'aide du logiciel GraphPad avec correction de Welch lorsque les variances diffèrent significativement (comparaison des variances au préalable avec un test F).

Lorsque les embryons ont étés obtenus par fécondation d'ovocytes issus de plusieurs femelles (indiqué N sur les graphiques et/ou dans la légende), un test de Fisher a au préalable été appliqué afin de s'assurer qu'aucune différence significative n'existait entre les résultats d'analyse des embryons issu de chaque femelle.

Références bibliographiques

- Abbracchio, M. & Burnstock, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. J. Pharmacol. 78, 113-145 (1998).
- Afonin, B., Ho, M., Gustin, J. K., Meloty-Kapella, C. & Domingo, C. R. Cell behaviors associated with somite segmentation and rotation in *Xenopus laevis*. *Developmental Dynamics* 235, 3268-3279 (2006).
- Albrecht, D. *et al.* Chemo-Genetic Interactions Between Histone Modification and the Antiproliferation Drug AICAR Are Conserved in Yeast and Humans. *Genetics* 204, 1447-1460 (2016).
- Alexiou, M. & Leese, H. J. Purine utilisation, de novo synthesis and degradation in mouse preimplantation embryos. *Development* 114, 185-192 (1992).
- Alley, K. E. Myofiber turnover is used to retrofit frog jaw muscles during metamorphosis. *Am J Anat. Jan* 184, 1-12 (1989).
- Amodeo, A. A. & Skotheim, J. M. Cell-Size Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (2016).
- Amsterdam, A. & Hopkins, N. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends in Genetics* 22, 473-478 (2006).
- Amsterdam, A. *et al.* Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12792-12797 (2004).
- Amthor, H., Christ, B. & Patel, K. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth-a balance between proliferation and differentiation. *Development* 126, 1041-1053 (1999).
- Ann-Marie Steen, A. M., Sahlén, H. & Lambert, B. Expression of the hypoxanthine phosphoribosyl transferase gene in resting and growth-stimulated human lymphocytes. *Biochlmica et Biophysiea Acta*, 1088, 77-85 (1991).
- Apasov, S. G., Blackburn, M. R., Kellems, R. E., Smith, P. T. & Sitkovsky, M. V. Adenosine deaminase deficiency increases thymic apoptosis and causes defective T cell receptor signaling. *Journal of Clinical Investigation* 108, 131-141 (2001).
- Bajard, L. A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes & Development* 20, 2450-2464 (2006).
- Balasubramaniam, S., Duley, J. A. & Christodoulou, J. Inborn errors of purine metabolism: clinical update and therapies. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 37, 669-686 (2014).
- Bell, S., Kolobova, I., Crapper, L. & Ernst, C. Lesch-Nyhan Syndrome: Models, Theories, and Therapies. *Molecular Syndromology* 7, 302-311 (2016).
- Bera, A. K., Zhu, J., Zalkin, H. & Smith, J. L. Functional Dissection of the Bacillus subtilis pur Operator Site. *Journal of Bacteriology* 185, 4099-4109 (2003).
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. Purine Bases Can Be Synthesized de Novo or Recycled by Salvage Pathways. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman, Section 25.2, (2002). Disponible sur https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22385/
- Bergstrom, D. & Tapscott, S. Molecular Distinction between Specification and Differentiation in the Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. *Molecular And Cellular Biology* 2404-2412 (2001).

- Berkes, C. A. & Tapscott, S. J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16, 585-595 (2005).
- Bismuth, K. & Relaix, F. Genetic regulation of skeletal muscle development. *Experimental Cell Research* 316, 3081-3086 (2010).
- Bjursell, M. K. *et al.* Adenosine Kinase Deficiency Disrupts the Methionine Cycle and Causes Hypermethioninemia, Encephalopathy, and Abnormal Liver Function. *The American Journal of Human Genetics* 89, 507-515 (2011).
- Blackburn, M. R., Datta, S. K. & Kellems, R. E. Adenosine deaminase-deficient mice generated using a two-stage genetic engineering strategy exhibit a combined immunodeficiency. *Journal of Biological Chemistry* 273, 5093-5100 (1998).
- Blum, M., De Robertis, E. M., Wallingford, J. B. & Niehrs, C. Morpholinos: Antisense and Sensibility. *Developmental Cell* 35, 145-149 (2015).
- Boison, D. et al. Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. Proceedings of the National Academy of Sciences 99, 6985-6990 (2002).
- Bollee, G. *et al.* Phenotype and Genotype Characterization of Adenine Phosphoribosyltransferase Deficiency. *Journal of the American Society of Nephrology* 21, 679-688 (2010).
- Bourdelas, A., Li, H.-Y., Carron, C. & Shi, D.-L. Dynamic expression pattern of distinct genes in the presomitic and somitic mesoderm during Xenopus development. *The International Journal of Developmental Biology* 53, 1075-1079 (2009).
- Bradford, K. L., Moretti, F. A., Carbonaro-Sarracino, D. A., Gaspar, H. B. & Kohn, D. B. Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immune Deficiency (SCID): Molecular Pathogenesis and Clinical Manifestations. *Journal of Clinical Immunology* 37, 626-637 (2017).
- Breese, G. R. *et al.* The neonate-6-hydroxydopamine-lesioned rat: a model for clinical neuroscience and neurobiological principles. *Brain Research Reviews* 48, 57-73 (2005).
- Brodsky, G. *et al.* The Human GARS-AIRS-GART Gene Encodes Two Proteins Which Are Differentially Expressed during Human Brain Development and Temporally Overexpressed in Cerebellum of Individuals with Down Dyndrome. *Human molecular genetics* 6, 2043-2050 (1997).
- Buckingham, M. & Vincent, S. D. Distinct and dynamic myogenic populations in the vertebrate embryo. *Current Opinion in Genetics & Development* 19, 444-453 (2009).
- Buckingham, M. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Current opinion in genetics & development* 11, 440-448 (2001).
- Burnstock, G. & Dale, N. Purinergic signalling during development and ageing. *Purinergic Signalling* 11, 277-305 (2015).
- Burnstock, G. Introductory overview of purinergic signalling. *Front Biosci* (Elite Ed) 3, 896-900 (2011).
- Cartry, J. *et al.* Retinoic acid signalling is required for specification of pronephric cell fate. *Developmental Biology* 299, 35-51 (2006).
- Ceballos-Picot, I. *et al.* Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase regulates early developmental programming of dopamine neurons: implications for Lesch-Nyhan disease pathogenesis. *Human Molecular Genetics* 18, 2317-2327 (2009).
- Ceballos-Picot, I. *et al.* New biomarkers for early diagnosis of Lesch-Nyhan disease revealed by metabolic analysis on a large cohort of patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 10, 7 (2015).
- Chan, T. & Asashima, M. Growing kidney in the frog. *Nephron Exp Nephrol* 103, 81-85 (2006).
- Chanoine, C. & Hardy, S. Xenopus muscle development: From primary to secondary myogenesis. *Developmental Dynamics* 226, 12-23 (2003).

- Chanoine, C., Della Gaspera, B. & Charbonnier, F. Myogenic regulatory factors: Redundant or specific functions? Lessons from *Xenopus*. *Developmental Dynamics* 231, 662-670 (2004).
- Charbonnier, F. *et al.* Two Myogenin-related Genes Are Differentially Expressed in *Xenopus laevis* Myogenesis and Differ in Their Ability to Transactivate Muscle Structural Genes. *Journal of Biological Chemistry* 277, 1139-1147 (2002).
- Cheng, J. et al. Effect of isolated AMP deaminase deficiency on skeletal muscle function. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 1, 51-59 (2014).
- Chitnis, A., Kintner, C. Neural induction and neurogenesis in amphibian embryos. Perspect Dev Neurobiol. 3, 3-15 (1995).
- Clark, D. V. Molecular and genetic analyses of Drosophila Prat, which encodes the first enzyme of de novo purine biosynthesis. *Genetics* 136, 547-557 (1994).
- Colas, A. *et al.* Mix.1/2-dependent control of FGF availability during gastrulation is essential for pronephros development in Xenopus. *Developmental Biology* 320, 351-365 (2008).
- Cornell, R. A. & Kimelman, D. Activin-mediated mesoderm induction requires FGF. *Development* 120, 453-462 (1994).
- Daignan-Fornier, B. AND Fink, G. R. Coregulation of purine and histidine biosynthesis by the transcriptional activators BAS1 and BAS2. *Genetics* 89, 6746-6750 (1992).
- de Sousa Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E. M. & Vogel, C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Molecular BioSystems* (2009).
- Della Gaspera, B. *et al.* Myogenic waves and myogenic programs during Xenopus embryonic myogenesis. *Developmental Dynamics* 241, 995-1007 (2012a).
- Della Gaspera, B. *et al.* Spatio-temporal expression of MRF4 transcripts and protein duringXenopus laevis embryogenesis. *Developmental Dynamics* 235, 524-529 (2006).
- Della Gaspera, B., Armand, A.-S., Lecolle, S., Charbonnier, F. & Chanoine, C. Mef2d Acts Upstream of Muscle Identity Genes and Couples Lateral Myogenesis to Dermomyotome Formation in Xenopus laevis. *PLoS ONE* 7, e52359 (2012b).
- Denetclaw, W. F. & Ordahl, C. P. The growth of the dermomyotome and formation of early myotome lineages in thoracolumbar somites of chicken embryos. *Development* 127, 893-905 (2000).
- Dequéant, M.-L. & Pourquié, O. Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nature Reviews Genetics* 9, 370-382 (2008).
- Dequéant, M.-L. *et al.* A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock. *science* 314, 1595-1598 (2006).
- Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-β family signalling. *Nature* 425, 577-584 (2003).
- Duley, J. A., Christodoulou, J. & de Brouwer, A. P. M. The PRPP Synthetase Spectrum: What Does it Demonstrate About Nucleotide Syndromes? *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 30, 1129-1139 (2011).
- Eisen, J. S. & Smith, J. C. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* 135, 1735-1743 (2008).
- Ekker, M. & Akimenkko, M. A. Le poisson zèbre (danio rerio), un modèle en biologie du développement. (1991).
- Elinson, R. P. Muscle development in a biphasic animal: The frog. *Developmental Dynamics* 236, 2444-2453 (2007).
- Engle, S. J. *et al.* Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2, 8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 5307-5312 (1996a).

- Engle, S., Womer, D., Davies, P., Boivin, G., Sahota, A., Simmonds, H. A., Stambrook, P. & Tischfield, J. HPRT-APRT-deficient mice are not a model for Lesch-Nyhan syndrome. *Human Molecular Genetics* 5, 1607-1610 (1996b).
- Escobar-Henriques, M. & Daignan-Fornier, B. Transcriptional Regulation of the Yeast GMP Synthesis Pathway by Its End Products. *Journal of Biological Chemistry* 276, 1523-1530 (2001).
- Fairbanks, L. D., Taddeo, A., Duley, J. A. & Simmonds, H. A. Mechanisms of deoxyguanosine lymphotoxicity. Human thymocytes, but not peripheral blood lymphocytes accumulate deoxy-GTP in conditions simulating purine nucleoside phosphorylase deficiency. *The Journal of Immunology* 144, 485-491 (1990).
- Fisher, M., Isaacs, H. & Pownall, M. eFGF is required for activation of XmyoD expression in the myogenic cell lineage of Xenopus laevis. *Development* 129, 1307-1315 (2002).
- Fu, R. *et al.* Genotype-phenotype correlations in neurogenetics: Lesch-Nyhan disease as a model disorder. *Brain* 137, 1282-1303 (2014b).
- Fu, R., Chen, C.-J. & Jinnah, H. A. Genotypic and phenotypic spectrum in attenuated variants of Lesch-Nyhan disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 112, 280-285 (2014a).
- Fu, W. M. Regulatory role of atp at developing neuromuscular junctions. *Progress in Neurobiology* 47, 31-44 (1995).
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. & Herrero, E. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* 13, 837-848 (1997).
- Gari, L., Piedrafita1, L., Aldea1, M. & Herrero, E. A Set of Vectors with a Tetracycline-Regulatable Promoter System for Modulated Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 837-848 (1997).
- Gassmann, M. G., Stanzel, A. & Werner, S. Growth factor-regulated expression of enzymes involved in nucleotide biosynthesis: a novel mechanism of growth factor action. *Oncogene* 18, (1999).
- Gensch, N., Borchardt, T., Schneider, A., Riethmacher, D. & Braun, T. Different autonomous myogenic cell populations revealed by ablation of Myf5-expressing cells during mouse embryogenesis. *Development* 135, 1597-1604 (2008).
- Goswami, M. T. *et al.* Role and regulation of coordinately expressed de novo purine biosynthetic enzymes PPAT and PAICS in lung cancer. *Oncotarget* 6, 23445 (2015).
- Grimaldi, A. *et al.* Hedgehog regulation of superficial slow muscle fibres in Xenopusand the evolution of tetrapod trunk myogenesis. *Development* 131, 3249-3262 (2004).
- Gross, M. Clinical heterogeneity and molecular mechanisms in inborn muscle AMP deaminase deficiency. *Journal of inherited metabolic disease* 20, 186-192 (1997).
- Gu, J. J. *et al.* Targeted Disruption of the Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Type I Gene in Mice. *Molecular and Cellular Biology* 23, 6702-6712 (2003).
- Guibinga, G.-H., Hrustanovic, G., Bouic, K., Jinnah, H. A. & Friedmann, T. MicroRNA-mediated dysregulation of neural developmental genes in HPRT deficiency: clues for Lesch-Nyhan disease? *Human Molecular Genetics* 21, 609-622 (2012).
- Haldar, M., Karan, G., Tvrdik, P. & Capecchi, M. R. Two Cell Lineages, myf5 and myf5-Independent, Participate in Mouse Skeletal Myogenesis. *Developmental Cell* 14, 437-445 (2008).
- Harland, R. M. & Grainger, R. M. Xenopus research: metamorphosed by genetics and genomics. *Trends in Genetics* 27, 507-515 (2011).
- Harvey, R. P. Widespread expression of MyoD genes in Xenopus embryos is amplified in presumptive muscle as a delayed response to mesoderm induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 9198-9202 (1991).

Heasman, J. Patterning the early Xenopus embryo. *Development* 133, 1205-1217 (2006).

- Heasman, J., Kofron, M. & Wylie, C. βCatenin Signaling Activity Dissected in the Early Xenopus Embryo: A Novel Antisense Approach. *Developmental Biology* 222, 124-134 (2000).
- Hellsten, U. *et al.* The Genome of the Western Clawed Frog Xenopus tropicalis. *Science* 328, 633-636 (2010).
- Holland, C., Lipsett, D. B. & Clark, D. V. A Link Between Impaired Purine Nucleotide Synthesis and Apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 188, 359-367 (2011).
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S. & Monk, M. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292-5 (1987).
- Hopwood, N. D., Pluck, A. & Gurdon, J. B. MyoD expression in the forming somites is an early response to mesoderm induction in Xenopus embryos. *The EMBO Journal* 8, 3409 (1989).
- Hopwood, N. D., Pluck, A. & Gurdon, J. B. Xenopus Myf-5 marks early muscle cells and can activate muscle genes ectopically in early embryos. *Development* 111, 551-560 (1991).
- Huang, S.-M., Xu, F., Lam, S. H., Gong, Z. & Ong, C. N. Metabolomics of developing zebrafish embryos using gas chromatography- and liquid chromatography-mass spectrometry. *Molecular BioSystems* 9, 1372 (2013).
- Hubaud, A. & Pourquié, O. Signalling dynamics in vertebrate segmentation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 709-721 (2014).
- Iijima, R. et al. The Extracellular Adenosine Deaminase Growth Factor, ADGF/CECR1, Plays a Role in Xenopus Embryogenesis via the Adenosine/P1 Receptor. Journal of Biological Chemistry 283, 2255-2264 (2008).
- Jaeken, J. & Van den Berghe, G. An infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids. *Lancet* 2, 1058-61 (1984).
- Jaeken, J. *et al.* Adenylosuccinase deficiency: an inborn error of purine nucleotide synthesis. *European journal of pediatrics* 148, 126-131 (1988).
- James-Zorn, C. *et al.* Xenbase: expansion and updates of the Xenopus model organism database. *Nucleic Acids Research* 41, D865-D870 (2012).
- Ji, Y. & Clark, D. V. The Purine Synthesis Gene *Prat2* Is Required for Drosophila Metamorphosis, as Revealed by Inverted-Repeat-Mediated RNA Interference. *Genetics* 172, 1621-1631 (2006).
- Jinnah, H. A. *et al.* Dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *Journal of Neuroscience* 14, 1164-1175 (1994).
- Jinnah, H. A. Lesch-Nyhan disease: from mechanism to model and back again. *Disease Models and Mechanisms* 2, 116-121 (2009).
- Johnson, C. H., Ivanisevic, J. & Siuzdak, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology* 17, 451-459 (2016).
- Johnstone, M. E., Nash, D. & Naguib, F. N. Three purine auxotrophic loci on the second chromosome of Drosophila melanogaster. *Biochem Genet.* 23, 539-55 (1985).
- Jurecka, A. Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 32, 247-263 (2009).
- Jurecka, A., Zikanova, M., Kmoch, S. & Tylki-Szymańska, A. Adenylosuccinate lyase deficiency. *Journal* of Inherited Metabolic Disease 38, 231-242 (2015).
- Kalin, R. E., Banziger-Tobler, N. E., Detmar, M. & Brandli, A. W. An in vivo chemical library screen in Xenopus tadpoles reveals novel pathways involved in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Blood* 114, 1110-1122 (2009).

- Keller, K. E., Doctor, Z. M., Dwyer, Z. W. & Lee, Y.-S. SAICAR Induces Protein Kinase Activity of PKM2 that Is Necessary for Sustained Proliferative Signaling of Cancer Cells. *Molecular Cell* 53, 700-709 (2014).
- Keller, R. The Origin and Morphogenesis of Amphibian Somites. *Current Topics in Developmental Biology* 47 (2000).
- Keren, A., Bengal, E. & Frank, D. p38 MAP kinase regulates the expression of XMyf5 and affects distinct myogenic programs during Xenopus development. *Developmental Biology* 288, 73-86 (2005).
- Khokha, M. K. *et al.* Techniques and probes for the study of Xenopus tropicalis development. *Developmental Dynamics* 225, 499-510 (2002).
- Khokha, M. K., Yeh, J., Grammer, T. C. & Harland, R. M. Depletion of Three BMP Antagonists from Spemann's Organizer Leads to a Catastrophic Loss of Dorsal Structures. *Developmental Cell* 8, 401-411 (2005).
- Kim, P. B., Nelson, J. W. & Breaker, R. R. An Ancient Riboswitch Class in Bacteria Regulates Purine Biosynthesis and One-Carbon Metabolism. *Molecular Cell* 57, 317-328 (2015).
- Kimelman, D. & Griffin, K. J. Vertebrate mesendoderm induction and patterning. *Current opinion in genetics & development* 10, 350-356 (2000).
- Kintner, C. R. & Brockes, J. P. Monoclonal antibodies identify blastemal cells derived from dedifferentiating limb regeneration. *Nature* 308, 67-9 (1984).
- Kok, F. O. *et al.* Reverse Genetic Screening Reveals Poor Correlation between Morpholino-Induced and Mutant Phenotypes in Zebrafish. *Developmental Cell* 32, 97-108 (2015).
- Kondo, M., Yamaoka, T., Honda, S., Miwa, Y., Katashima, R., Moritani, M., Yoshimoto, K., Hayashi, Y.
 & Itakura, M. The Rate of Cell Growth Is Regulated by Purine Biosynthesis via ATP Production and G, to S Phase Transition1. J. Biochem 128, 57-64 (2000).
- Kragtorp, K. A. & Miller, J. R. Integrin α5 is required for somite rotation and boundary formation inXenopus. *Developmental Dynamics* 236, 2713-2720 (2007).
- Kuehn, M. R., Bradley, A., Robertson, E. J. & Evans, M. J. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* 326, 295-8 (1987).
- Lake, J. I., Avetisyan, M., Zimmermann, A. G. & Heuckeroth, R. O. Neural crest requires Impdh2 for development of the enteric nervous system, great vessels, and craniofacial skeleton. *Developmental Biology* 409, 152-165 (2016).
- Le Bouffant, R. *et al.* Retinoic acid-dependent control of MAP kinase phosphatase-3 is necessary for early kidney development in Xenopus. *Biology of the Cell* 104, 516-532 (2012).
- Leevers, S. J. & McNeill, H. Controlling the size of organs and organisms. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 604-609 (2005).
- Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M. & Soares, M. B. The IMAGE Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* 33, 151-152 (1996).
- Lesch, M. & Nyhan, W. L. A Familial Disorder Of Uric Acid Metabolism And Central Nervous System Function. *Am J Med.* 36,561-70 (1964).
- Lister, J. A. Development of pigment cells in the zebrafish embryo. *Microscopy Research and Technique* 58, 435-441 (2002).
- Lombard-Banek, C., Portero, E. P., Onjiko, R. M. & Nemes, P. New-generation mass spectrometry expands the toolbox of cell and developmental biology: LOMBARD-BANEK et al. *genesis* 55, e23012 (2017).
- Long, H., Cameron, S., Yu, L. & Rao, Y. *De Novo* GMP Synthesis Is Required for Axon Guidance in Drosophila. *Genetics* 172, 1633-1642 (2006).

- López, J. M. Is ZMP the toxic metabolite in Lesch-Nyhan disease? *Medical Hypotheses* 71, 657-663 (2008).
- Ludolph, D. C., Neff, I. A. w., Mescher, A. L., Malacinski, G. M., Parker, M. A., & Smith, R. C. Overexpression of XMyoD or XMyf5 in *Xenopus* Embryos Induces the Formation of Enlarged Myotomes through Recruitment of Cells of Nonsomitic Lineage. *Developmental Biology* 166, 18-33 (1994).
- Lynch, K. Development and innervation of the abdominal muscle in embryonic Xenopus laevis. *Am J Anat.* 187, 374-92 (1990).
- Maguire, R. J., Isaacs, H. V. & Elizabeth Pownall, M. Early transcriptional targets of MyoD link myogenesis and somitogenesis. *Developmental Biology* 371, 256-268 (2012).
- Malmanche, N. & Clark, D. V. *Drosophila melanogaster Prat*, a Purine *de Novo* Synthesis Gene, Has a Pleiotropic Maternal-Effect Phenotype. *Genetics* 168, 2011-2023 (2004).
- Malnati, M. S. *et al.* Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science* 1016-1018 (1995).
- Marie, S. *et al.* AICA-ribosiduria: a novel, neurologically devastating inborn error of purine biosynthesis caused by mutation of ATIC. *The American Journal of Human Genetics* 74, 1276-1281 (2004).
- Martin, B. L. & Harland, R. M. Hypaxial Muscle Migration during Primary Myogenesis in Xenopus laevis. *Developmental Biology* 239, 270-280 (2001).
- Martin, B. L. A novel role for lbx1 in Xenopus hypaxial myogenesis. *Development* 133, 195-208 (2005).
- Martin, B. L., Peyrot, S. M. & Harland, R. M. Hedgehog signaling regulates the amount of hypaxial muscle development during Xenopus myogenesis. *Developmental Biology* 304, 722-734 (2007).
- Massé, K. & Dale, N. Purines as potential morphogens during embryonic development. *Purinergic Signalling* 8, 503-521 (2012).
- Massé, K., Bhamra, S., Eason, R., Dale, N. & Jones, E. A. Purine-mediated signalling triggers eye development. *Nature* 449, 1058-1062 (2007).
- Mastrangelo, L., Kim, J.-E., Miyanohara, A., Kang, T. H. & Friedmann, T. Purinergic signaling in human pluripotent stem cells is regulated by the housekeeping gene encoding hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 3377-3382 (2012).
- Matsuda, Y. et al. A New Nomenclature of *Xenopus laevis* Chromosomes Based on the Phylogenetic Relationship to *Silurana/Xenopus tropicalis*. *Cytogenetic and Genome Research* 145, 187-191 (2015).
- Meek, S. *et al.* Reduced levels of dopamine and altered metabolism in brains of HPRT knock-out rats: a new rodent model of Lesch-Nyhan Disease. *Scientific Reports* 6, (2016).
- Mitchell, T., Jones, E. A., Weeks, D. L. & Sheets, M. D. Chordin affects pronephros development inXenopus embryos by anteriorizing presomitic mesoderm. *Developmental Dynamics* 236, 251-261 (2007).
- Moreno, T. A. & Kintner, C. Regulation of segmental patterning by retinoic acid signaling during Xenopus somitogenesis. *Developmental cell* 6, 205-218 (2004).
- Morisaki, T. et al. Molecular basis of AMP deaminase deficiency in skeletal muscle. Proceedings of the National Academy of Sciences 89, 6457-6461 (1992).
- Moshkin, Y. M., Langenberg, K., Krijgsveld, J., Heck, A. J. R., Karch, F. & Verrijzer1, C. P. GMP Synthetase Stimulates Histone H2B Deubiquitylation by the Epigenetic Silencer USP7. *Molecular Cell* 17, 695-707 (2005).
- Mouchegh, K. *et al.* Lethal Fetal and Early Neonatal Presentation of Adenylosuccinate Lyase Deficiency: Observation of 6 Patients in 4 Families. *The Journal of Pediatrics* 150, 57-61.e2 (2007).
- Moussaieff, A. *et al.* Glycolysis-Mediated Changes in Acetyl-CoA and Histone Acetylation Control the Early Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell Metabolism* 21, 392-402 (2015).
- Natsumeda, Y., Prajda, N., Donohue, J. P., Glover, J. L. & Weber, G. Enzymic capacities of purine de novo and salvage pathways for nucleotide synthesis in normal and neoplastic tissues. *Cancer research* 44, 2475-2479 (1984).
- Newport, J. & Kirschner, M. A Major Developmental Transition in Early Xenopus Embryos: I. Characterization and Timing of Cellular Changes at the Midblastula Stage. *Cell* 30, 675-686 (1982).
- Ng, A., Uribe, R. A., Yieh, L., Nuckels, R. & Gross, J. M. Zebrafish mutations in gart and paics identify crucial roles for de novo purine synthesis in vertebrate pigmentation and ocular development. *Development* 136, 2601-2611 (2009).
- Nieuwkoop, P. D. & Faber J. Normal Table of Xenopus laevis (Daudin). *Garland Publishing Inc., New York* (1994).
- Nishikawa, A. & Hayashi, H. Spatial, temporal and hormonal regulation of programmed muscle cell death during metamorphosis of the frog Xenopus laevis. *Differentiation* 59, 207-214 (1995).
- Norman, B., Sabina, R. & Jansson, E. Regulation of skeletal muscle ATP catabolism by AMPD1 genotype during sprint exercise in asymptomatic subjects. *J Appl Physiol* 91, 258-264 (2001).
- Nyhan, W. L. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism* 86, 25-33 (2005).
- Nyhan, W. L. Dopamine Function in Lesch-Nyhan Disease. *Environmental Health Perspectives* 108 (2000).
- O'Donnell, A. F., Tiong, S., Nash, D. & Clark, D. V. The *Drosophila melanogaster ade5* Gene Encodes a Bifunctional Enzyme for Two Steps in the *de novo* Purine Synthesis Pathway. *Genetics* 154, 1239-1253 (2000).
- Oburoglu, L. *et al.* Glucose and Glutamine Metabolism Regulate Human Hematopoietic Stem Cell Lineage Specification. *Cell Stem Cell* 15, 169-184 (2014).
- Onjiko, R. M., Moody, S. A. & Nemes, P. Single-cell mass spectrometry reveals small molecules that affect cell fates in the 16-cell embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 6545-6550 (2015).
- Onjiko, R. M., Morris, S. E., Moody, S. A. & Nemes, P. Single-cell mass spectrometry with multisolvent extraction identifies metabolic differences between left and right blastomeres in the 8cell frog (Xenopus) embryo. *The Analyst* 141, 3648-3656 (2016).
- Onjiko, R. M., Portero, E. P., Moody, S. A. & Nemes, P. In Situ Microprobe Single-Cell Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry: Metabolic Reorganization in Single Differentiating Cells in the Live Vertebrate (*Xenopus laevis*) Embryo. *Analytical Chemistry* 89, 7069-7076 (2017).
- Papalopulu, N. & Kintner, C. R. Molecular genetics of neurulation. *Ciba Found Symp*. 181, 90-9, discussion 99-102 (1994).
- Pedley, A. M. & Benkovic, S. J. A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. *Trends in Biochemical Sciences* 42, 141-154 (2017).
- Peshkin, L. *et al.* On the Relationship of Protein and mRNA Dynamics in Vertebrate Embryonic Development. *Developmental Cell* 35, 383-394 (2015).
- Pikarsky, E. *et al.* NF-κB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431, 461-466 (2004).

- Pinson, B. *et al.* Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways. *Genes & Development* 23, 1399-1407 (2009).
- Pourquié, O. The vertebrate segmentation clock. J. Anat. 199, 169-175 (2001b).
- Pourquié, O. Vertrebrate somitogenesis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17, 311-50 (2001a).
- Pownall, M. E., Gustafsson, M. K. & Emerson, C. P. Myogenic Regulatory Factors and the Specification of Muscle Progenitors in Vertebrate Embryos. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18, 747-783 (2002).
- Race, V., Marie, S., Vincent, M. F. & Van den Berghe, G. Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in adenylosuccinate lyase deficiency. *Human Molecular Genetics* 9, 2159-2165 (1982).
- Rebora, K. Revisiting Purine-Histidine Cross-Pathway Regulation in Saccharomyces cerevisiae: A Central Role for a Small Molecule. *Genetics* 170, 61-70 (2005).
- Rebora, K., Desmoucelles, C., Borne, F., Pinson, B. & Daignan-Fornier, B. Yeast AMP Pathway Genes Respond to Adenine through Regulated Synthesis of a Metabolic Intermediate. *Molecular and Cellular Biology* 21, 7901-7912 (2001).
- Redhead, J., Selfridge, J. Wu, C. L., & Melton, D. Mice with Adenine Phosphoribosyltransferase Deficiency Develop Fatal 2,8-Dihydroxyadenine Lithiasis. *Human Gene Therapy* 7, 1491-1502 (1996).
- Rolfes, R. J. & Zlkin, H. Purification of the Escherichia coli Purine Regulon Repressor and Identification of Corepressors. *Journal Of Bacteriology* 5637-5642 (1990).
- Rolfes, R. J. Regulation of purine nucleotide biosynthesis:in yeast and beyond. *Biochemical Society Transactions* 34, part 5 (2006).
- Rowe, P. & Mcewen, S. De novo purine synthesis in cultured rat embryos undergoing organogenesis. *Medical Sciences* 80, 7333-7336 (1983).
- Ryten, M. *et al.* Abnormalities in neuromuscular junction structure and skeletal muscle function in mice lacking the P2X2 nucleotide receptor. *Neuroscience* 148, 700-711 (2007).
- Ryten, M., Dunn, P. M., Neary, J. T. & Burnstock, G. ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X ₅ receptor on satellite cells. *The Journal of Cell Biology* 158, 345-355 (2002).
- Sabillo, A., Ramirez, J. & Domingo, C. R. Making muscle: Morphogenetic movements and molecular mechanisms of myogenesis in Xenopus laevis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 51, 80-91 (2016).
- Sampat, R. *et al.* Mechanisms for phenotypic variation in Lesch-Nyhan disease and its variants. *Human Genetics* 129, 71-78 (2011).
- Sánchez, R. S. & Sánchez, S. S. Characterization of *pax1*, *pax9*, and *uncx* sclerotomal genes during *Xenopus laevis* embryogenesis: Expression *PAX1*, *PAX9*, and *UNCX* Genes. *Developmental Dynamics* 242, 572-579 (2013).
- Sassoon, D. Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis. Developmental Biology 156, 11-23 (1993).
- Sater, A. K. & Moody, S. A. Using *Xenopus* to understand human disease and developmental disorders: Sater and Moody. *genesis* 55, e22997 (2017).
- Schmitt, S. M., Gull, M. & Brändli, A. W. Engineering Xenopus embryos for phenotypic drug discovery screening. Advanced Drug Delivery Reviews 69-70, 225-246 (2014).
- Session, A. M. *et al.* Genome evolution in the allotetraploid frog Xenopus laevis. *Nature* 538, 336-343 (2016).

- Seufert, D., Brennan, C., DeGuire, J., Jones, E. & Vize, P. Developmental Basis of Pronephric Defects in *Xenopus* Body Plan Phenotypes. *Developmental Biology* 215, 233-242 (1999).
- Shi, D.-L., Bourdelas, A., Umbhauer, M. & Boucaut, J.-C. Zygotic Wnt/β-Catenin Signaling Preferentially Regulates the Expression of Myf5 Gene in the Mesoderm of Xenopus. *Developmental Biology* 245, 124-135 (2002).
- Shiotsugu, J. Multiple points of interaction between retinoic acid and FGF signaling during embryonic axis formation. *Development* 131, 2653-2667 (2004).
- Shrestha, B. *et al.* Subcellular Metabolite and Lipid Analysis of Xenopus laevis Eggs by LAESI Mass Spectrometry. *PLoS ONE* 9, e115173 (2014).
- Šindelka, R., Ferjentsik, Z. & Jonák, J. Developmental expression profiles of Xenopus laevis reference genes. *Developmental Dynamics* 235, 754-758 (2006).
- Somech, R. *et al.* Purine nucleoside phosphorylase deficiency presenting as severe combined immune deficiency. *Immunologic Research* 56, 150-154 (2013).
- Spiegel, E., Colman, R. & Patterson, D. Adenylosuccinate lyase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 89, 19-31 (2006).
- Steinbach, O., Ulshöfer, A., Authaler, A. & Rupp, R. Temporal Restriction of MyoD Induction and Autocatalysis during *Xenopus* Mesoderm Formation. *Developmental Biology* 202, 280-292 (1998).
- Stennard, F., Ryant, K. & Gurdon, J.B. Markers of vertebrate mesoderm induction. *Genetics & Development* 7, 620-62? (1997).
- Stern, C. D. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development* 132, 2007-2021 (2005).
- Sultani, G., Samsudeen, A. F., Osborne, B. & Turner, N. NAD⁺: a key metabolic regulator with great therapeutic potential. *Journal of Neuroendocrinology* (2017). doi:10.1111/jne.12508
- Tajbakhsh, S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *Journal of Internal Medicine* 266, 372-389 (2009).
- Theodoulou, F., Sibon, O., Jackowski, S. & Gout, I. Coenzyme A and Its Derivatives in Cellular Metabolism and Disease. Coenzyme A and its derivatives: renaissance of a textbook classic. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1025-1032 (2014).
- Tiong, S. Y. K., Nash, D. Genetic Analysis of the *adenosine3 (Gart)* Region of the Second Chromosome of *Drosophila melanogaster. Genetic* 124, 889-897 (1990).
- Tiong, S. Y., Keizer, C., Nash, D., Bleskan, J. & Patterson, D. Drosophila purine auxotrophy: new alleles of adenosine 2 exhibiting a complex visible phenotype. *Biochem Genet.* 27, 333-48 (1989).
- Tocco, A., Pinson, B., Thiébaud, P., Thézé, N. & Massé, K. Comparative genomic and expression analysis of the adenosine signaling pathway members in Xenopus. *Purinergic Signalling* 11, 59-77 (2015).
- Tomlinson, M. L., Rejzek, M., Fidock, M., Field, R. A. & Wheeler, G. N. Chemical genomics identifies compounds affecting Xenopus laevis pigment cell development. *Mol. BioSyst.* 5, 376-384 (2009).
- Torres, R. J. & Puig, J. G. Hypoxanthine deregulates genes involved in early neuronal development. Implications in Lesch-Nyhan disease pathogenesis. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 38, 1109-1118 (2015).
- Ubbels, G. A., Hara, K., Koster, C. H. & Kirschner, M. W. Evidence for a functional role of the cytoskeleton in determination of the dorsoventral axis in *Xenopus laevis* eggs. *J. Embryol. exp. Morph.* 77, 15-37 (1983).

- Valik, D., Miner, P. T. & Jones, J. D. First U.S. case of adenylosuccinate lyase deficiency with severe hypotonia. *Pediatr Neurol* 16, 252-255 (1997).
- Van den Berghe, G., Vincent, M. F. & Marie, S. Disorders of Purine and Pyrimidine Metabolism. In: Fernandes, J., Saudubray, J. M., Van den Berghe, G., Walter, J. H. (eds) Inborn Metabolic Diseases. Springer, Berlin, Heidelberg (2006).
- Van den Berghe, G., Vincent, M. F. & Marie, S. Disorders of Purine and Pyrimidine Metabolism. Inborn Errors of Purine Metabolism Chap 35 433-449 (2006).
- Van der Knaap, J. A., Prashanth Kumar, B.R., Moshkin, Y. M. Langenberg, K., Krijgsveld, J., Heck A. J. R., Karch, F. & Verrijzer, C. P. GMP Synthetase Stimulates Histone H2B Deubiquitylation by the Epigenetic Silencer USP7. Molecular Cell 17, 695-707 (2005).
- Vastag, L. *et al.* Remodeling of the Metabolome during Early Frog Development. *PLoS ONE* 6, e16881 (2011).
- Wang, F., Shi, Z., Cui3, Y., Guo, X., Shi, Y. & Chen, Y. Targeted gene disruption in Xenopus laevis using CRISPR/Cas9. *Cell & Bioscience* 5:15 (2015).
- Wang, W. *et al.* The Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cassette Regulates Purine Nucleotide Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 284, 3521-3528 (2009).
- Weinberg, Z., Wang, J., Bogue, J., Yang, J., Corbino, K., Moy, R., & Breaker, R. Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. *Genome Biology* 11:R31 (2010).
- Weng, M., Nagy, P. L. & Zalkin, H. Identification of the Bacillus subtilis pur operon repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7455-7459, (1995).
- Werner, S., Smola, H., Liao, X., Longaker, M. T., Krieg, T., Hofschneider, P. H., & Williams, L. T. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* 266, 819-822 (1994).
- Williams, B. A. & Ordahl, C. P. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. Development 120, 785-796 (1994).
- Wu, C. L., Melton, D. W. Production of a model for Lesch-Nyhan syndrome in hypoxanthine phosphoribosyltransferase-deficient mice. *Nat Genet.* 3, 235-40 (1993).
- Yamaoka, T., Yano, M., Kondo, M., Sasaki, H., Hino, S., Katashima, R., Moritani, M. & Itakura, M. Feedback Inhibition of Amidophosphoribosyltransferase Regulates the Rate of Cell Growth via Purine Nucleotide, DNA, and Protein Syntheses. *The Journal Of Biological Chemistry* 276, 21285-21291 (2001).
- Yamaoka,T., Kondo, M., Honda, S., Iwahana, H., Moritani, M., Ii, S., Yoshimoto, K., & Itakura, M. Amidophosphoribosyltransferase Limits the Rate of Cell Growth-linked *de Novo* Purine Biosynthesis in the Presence of Constant Capacity of Salvage Purine Biosynthesis. *The Journal Of Biological Chemistry* 28, 17719-17725 (1997).
- Yasuo, H. & Lemaire, P. Generation of the germ layers along the animal-vegetal axis in Xenopus laevis. *Int. J. Dev. Biol.* 45, 229-235 (2001).
- Zetser, A., Frank, D. & Bengal, E. MAP Kinase Converts MyoD into an Instructive Muscle Differentiation Factor in *Xenopus*. *Developmental Biology* 240, 168-181 (2001).
- Zikanova, M., Skopova, V., Hnizda, A., Krijt, J. & Kmoch, S. Biochemical and Structural Analysis of 14 Mutant ADSL Enzyme Complexes and Correlation to Phenotypic Heterogeneity of Adenylosuccinate Lyase Deficiency. *Human Mutation*, 4, 445-455 (2010).

http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/

http://www.xenbase.org

http://www.mun.ca

ANNEXES

Analyses bioinformatiques effectuées pour l'identification des gènes de la voie des purines de *X. laevis :* exemple du gène *ppat*

Au début de ma thèse, le gène *ppat.L* était annoté et sa séquence codante accessible sous le numéro d'accessions NM_001090022.1 (gène ID 398956) :

GGTAGATCTCTGGGCCCCACGTGTTAGTCCCTGTGGCCGCTTGTGATGGAGTTTGAGGAGCTGGGGATACGCGAGGAGTGCGGGGGTGT TCGGCTGTATAGCGGCGGGGGGAGATGGCCGACCCAGTTAGACGTGCCTCATGTCATCACCCTGGGGCTGGTTGGACTGCAGCACAGGGG ACAAGAGAGTGCTGGCATTGTAACAAGTGATGGGAGCTCGGTGCCGACTTATAGAATGCACAAGGGCATGGGCCTGGTGAACCATGTG TTCAGCGAAGACAGTCTGAAGAAACTGCACGTGAGTAATCTTGGCATTGGCCACACCAGATATTCCACCAGTGGGAATTCTGCCTTAGAA AACTGCCAGCCCTTTGTGGTCGAGACGTTACATGGAAAGATTGCTGTGGCGCATAATGGGGAGCTTGTCAATGCTGCTCAGCTCAAGCG AAAGGTCATGCGGCACGGCGTGGGCCTCTCCACCAGTTCAGACAGTGAGCTCATCACACAGCTTCTGGCCTTCACTCCTCCAATGGAAGA AGATCACACTGCCAACTGGATAGCACGCATAAGAAACTTAATGAACGAGACCCCCAACATCTTACTCCCTGCTTGTCATGCATAACGACGT TGTATACGCCATACGGGATCCTTATGGGAACCGGCCTCTCTGCATCGGGCGTCTCATCCCTGTCAATAATGAAGGCAAAGGAAAGCGCTT GGCAGAGACTGAGGGCTGGGTGGTGGTCCTCCGAATCCTGCAGCTTTTTATCTATTGGTGCTGAGTATTATCGGGAAGTCCTACCAGGAG AAATAGTAAAGATTTCACGGGATGGAGTTCAGACGCTGGATATTGTGCCGAGAACGAATGGAGACCCATCTGCCTTTTGCATCTTTGAAT ATGTTTATTTTGCCCGACCTGATTCAATATTTGAAGGGCAGATGGTTTACTCGGTGAGACGGAGATGTGGGCAGCAGCTGGCTATAGAA GCTCGAGTAGAAGCCGATCTGGTCAGCACTGTGCCAGAATCTGCAACCCCCGCAGCGTTAGGCTACGCAGAGAAGTGTGGTCTTCAGTA TGTGGAAGTATTGTGTAAGAATCGCTACGTAGGGCGAACGTTTATTCAGCCCAACATGAGGTTACGGCAGCTGGGAGTGGCCAAGAAAT GCTGCTCAGGGACTCCGGAGCCAAAGAGGTCCACATAAGAGTAGCATCACCACCATAAAAATACCCTTGTTATATGGGAATAAACATTCC TACGAAAGAGGAGCTGATCGCAAACAAACCCGAGTTCAACGACTTGGCTGGTTATATTGGTGCGGACAGTGTTGTTTACCTCTCTGTGGA GGGACTTACGTCGGCAGTGCGGGAGGGTATCAAGGCCTTCAAGGACGAGCAGAATGGAATAAATGGCAAAACAAGGTCATCGTCTCAG GGTCACTGCACGGCCTGTTTGACTGGAGAATATCCAGTGAAGTTGGAGTGGAGGCCCATTCTTTAGCCTCGATAGGTCACAGATTCA CTGTTGGACCTTTGATGGACAGCTGCTACCCAAACTGCAACTCGACCTCGTACGAATGTCTTTCGTGTTTTCCTATGCCCCCTCTGGACGGC AGCTTTTTCTGATTTGGATGGTTAAGGACGACTTGTTTACAAATGAGACGTGTATATTATGTACTAGCGTTTTTTTGTTTTTCTCTATCGC GCTTTATTTTGTGCCAGAGCAACTTTGTGTAAATGGTCAATTGTATTTCTTAACTACGTGTAAGTGGCAGATAAGTAAACGGCATTTTTTT

Cette séquence codante a servie de référence afin de mettre en évidence l'existence potentielle d'un gène homéologue. Nous avons utilisé l'outil BLAST disponible sur la base de données Xenbase pour aligner cette séquence au génome de *X. laevis* version 7.1 (http://www.xenbase.org/genomes/blast.do?db=Nucleotide/Xenla 7 1 Scaffolds).

Overview of Results				
Hit Id		Hit Description	Score	E value
Icl Scaffold32657	Alignement de 11	JGI Xenla 7.1 Scaffold32657	895	0.0
Icl Scaffold31653	fractions par scaffold	JGI Xenla 7.1 Scaffold31653	444	6e-122
Icl Scaffold377		JGI Xenta 7.1 Scatfold377	57.2	3e-05
Icl Scaffold65414		JGI Xenla 7.1 Scaffold65414	48.2	0.016
Icl Scaffold31449		JGI Xenla 7.1 Scaffold31449	48.2	0.016
Icl Scaffold150991	Alignement de 46	JGI Xenla 7.1 Scaffold150991	48.2	0.016
Icl Scaffold14692	bases au maximum	JGI Xenia 7.1 Scaffold14692	48.2	0.016
Icl Scaffold9266	par scaffold	JGI Xenla 7.1 Scaffold9266	46.4	0.058
Icl Scaffold62948		JGI Xenla 7.1 Scaffold62948	46.4	0.058
Icl Scaffold185843		JGI Xenla 7.1 Scaffold185843	46.4	0.058
Icl Scaffold166365		JGI Xenla 7.1 Scaffold166365	46.4	0.058

Les résultats obtenus sont :

Les deux premiers « *scaffolds* » se découpent en 11 fractions correspondant aux différents exons. Les autres « *scaffolds* » sont chacun une toute petite portion du génome qui s'aligne à la séquence de référence, par hasard et sans signification biologique.

Le premier « *scaffolds* » correspond au gène *ppat.L* avec 1000 % d'homologie. Le second « *scaffolds* » présente une homologie importante (\approx 90 %) avec *ppat.L* et correspond donc au gène *ppat.S*.

Nous avons ensuiterécupéré la séquence génomique correspondant à ce « *scaffold* » afin de reconstituer la séquence codante de *ppat.S*, en replaçant chacun des exons ainsi que les jonctions exons/introns. (AG/GT) par rapport aux données d'alignement et en comparaison avec *ppat.S*.

Exemple des trois premiers exons correspondants au « *scaffold* » n°2. Les jonctions exons/introns sont indiquées ici par des flèches :

```
Score = 183, E = 3e-43, Identities = 138/164 (84%), Length = 164, Query Strand = +, Hit Strand = +
Query: 11
             TGGGCCCCACGTGTTAGTCCCTGTGGCCGCTTGTGATGGAGTTTGAGGAG 60
Hit : 1185263 TGGGCCCCACGTGTTACACTCTGTG-----ATGGAGTTGAGGAG
                                                          1185302
Query: 61
             110
Hit : 1185303 CTGGGGATAAGGGAGGAGTGCGGCGTGTTCGGCTGTATAGCGGCGGGGAA 1185352
Ouerv: 111
              ATGGCCGACCCAGTTAGACGTGCCTCATGTCATCACCCTGGGGCTGGTTG 160
             CTGGCCTACCCAACTGGATGTGCCCCACGTCATCACCCTGGGACTGGTTG 1185402
Hit : 1185353
             GACTGCAGCACAG
Query: 161
                           174
              11111111111111111
Hit : 1185403 GACTGCAGCACAGG 1185416
 Score = 116, E = 4e-23, Identities = 69/72 (96%), Length = 72, Query Strand = +, Hit Strand = +
             ACAGGGGACAAGAGAGTGCTGGCATTGTAACAAGTGATGGGAGCTCGGTG 219
Query: 170
              Hit : 1190076 ACAGGGGACAAGAGAGTGCTGGCATTGTAACAAGTGATGGGAGCTCTGTG 1190125
             CCGACTTATAGAATGCACAAGG
Query: 220
                                  241
              11 11 111111111111111111
Hit : 1190126 CCAACGTATAGAATGCACAAGG 1190147
 Score = 345, E = 4e-92, Identities = 203/211 (96%), Length = 211, Query Strand = +, Hit Strand = +
              AGGGCATGGGCCTGGTGAACCATGTGTTCAGCGAAGACAGTCTGAAGAAA
Query: 239
                                                           288
              AGGGCATGGGCTTGGTTAACCATGTGTTCAGCGAAGAGAGTCTGAAGAAA
Hit : 1192594
                                                          1192643
Query: 289
              CTGCACGTGAGTAATCTTGGCATTGGCCACACCAGATATTCCACCAGTGG 338
              Hit : 1192644 CTGCACGTGAGCAATCTGGCCATTGGCCACCAGATACTCCACCAGTGG
                                                          1192693
Query: 339
              GAATTCTGCCTTAGAAAACTGCCAGCCCTTTGTGGTCGAGACGTTACATG
                                                           388
              Hit : 1192694 GAATTCTGCCTTAGAAAACTGCCAGCCCTTTGTGGTTGAGACGTTACATG
                                                           1192743
Query: 389
              GAAAGATTGCTGTGGCGCATAATGGGGGAGCTTGTCAATGCTGCTCAGCTC
                                                           438
              Hit : 1192744 GAAAGATTGCTGTAGCGCATAATGGGGAGCTTGTCAATGCTGCTCAGCTC
                                                          1192793
              AAGCGAAAGGT
Query: 439
                         449
              11111111111
Hit : 1192794 AAGCGAAAGGT 1192804
```

Nous avons ainsi obtenu la séquence codante de *ppat.S* que nous avons ensuite traduite *in sillico*.

TGGGCCCCACGTGTTACACTCTGTGATGGAGTTTGAGGAGCTGGGGGATAAGGGAGGAGTGCGGCGTGTTCGGCTGTATAGCGGCGGG TAACAAGTGATGGGAGCTCTGTGCCAACGTATAGAATGCACAAGGGCATGGGCTTGGTTAACCATGTGTTCAGCGAAGAGAGTCTGAA GAAACTGCACGTGAGCAATCTGGGCATTGGCCACACCAGATACTCCACCAGTGGGAATTCTGCCTTAGAAAACTGCCAGCCCTTTGTGGT TGAGACGTTACATGGAAAGATTGCTGTAGCGCATAATGGGGAGCTTGTCAATGCTGCTCAGCTCAAGCGAAAGGTCATGCGGCACGGT GTGGGCCTCTCCACCAGTTCAGACAGTGAGTTGATCACCCCAATTGCTGGCCTTCACTCCTCCACTGGAAGAAGATCACACTGCTGATTGG GGTGGTGTCATCCGAATCCTGCAGCTTTTTATCCATCGGTGCTGAGTATTATCGGGAAGTCCTGCCAGGAGAAATAGTAAAGATTTCACG GGATGGAGTTCAGACCCTGGATATTGTGCCAAGAACAAATGGAGACCCATCTGCCTTTTGCATCTTTGAATATGTTTATTTTGCCCGACCT GATTCAATATTTGAAGGGCAAATGGTTTACTCTGTGAGACGGAGATGTGGGCAGCAGCTGGCTATAGAAGCTCCAGTAGAAGCCGATCT GGTCAGCACTGTGCCAGAATCTGCAACTCCGGCAGCGTTGGGCTATGCAGAAAAGTGTGGTCTTCAGTATGTGGAGGTTCTGTGTAAGA ACCGCTACGTAGGGCGAACCTTTATTCAGCCCAACATGAGGTTACGGCAGCTTGGAGTGGCTAAGAAATTTGGAGTCCTTTCCGATAACT TCGTTGGCAAACGAGTGGTTCTAATTGATGATTCCATTGTGAGAGGCAATACTATCTCGCCTATCATTAAACTTCTCAGGGACTCTGGAGC CAAAGAGGTTCATGTACGAGTAGCATCACCACCTATAAAATACCCTTGTTATATGGGAATAAACATTCCTACAAAAGAGGAGCTGATCGC AAACAAACCAGAGTTCAACGACTTAGCTGGTTATATTGGTGCAGACAGTGTTGTTTACCTCTCAGTGGAGGGACTTACGTCGGCAGTCCG GGAGGGTATCAAGGCCTTCAAGGATGAGCAGAATGGAATAAACGGCAAAACAAGATCAACGTCTCATGGTCACTGCACAGCCTGTTTGA CAGGAGAATATCCAGTGGAGCTGGAGTGGAGGGCCATTTCTTTGAGCCTCGTCAGGTCACAGATTCATTGCAGGACCTCTGATGGACA GCTGCTACCAAAACTGCCACTTGCAAAATGTCTTCCACGTTTCCCCTGGACTGCAGCCTTTTCTGACTTTCTGGGTTGTTGAGGCCGACTTGT TTACAAATGAGACATGTAAATGACTGTACTCGCTTTTTCTATCGCTCTTTTATTTTGTGCTAGAGCAACTGTGTGTAAATAGTCAATTTCTT AACCACGT

L'alignement qui suit concerne les séquences protéiques de *ppat.L* (Query) et *ppat.S* (Sbjct).

Identities 495/508(97%)

Positives 504/508(99%) Gans 0/508(0%)			
Query	1	MEFEELGIREECGVFGCIAAGRWPTQLDVPHVITLGLVGLQHRGQESAGIVTSDGSSVPT MEFEELGIREECGVFGCIAAG WPTOLDVPHVITLGLVGLOHRGOESAGIVTSDGSSVPT	60
Sbjct	1	MEFEELGIREECGVFGCIAAGNWPTQLDVPHVITLGLVGLQHRGQESAGIVTSDGSSVPT	60
Query	61	YRMHKGMGLVNHVFSEDSLKKLHVSNLGIGHTRYSTSGNSALENCQPFVVETLHGKIAVA YRMHKGMGLVNHVFSE+SLKKLHVSNLGIGHTRYSTSGNSALENCOPFVVETLHGKIAVA	120
Sbjct	61	YRMHKGMGLVNHVFSEESLKKLHVSNLGIGHTRYSTSGNSALENCQPFVVETLHGKIAVA	120
Query	121	HNGELVNAAQLKRKVMRHGVGLSTSSDSELITQLLAFTPPMEEDHTANWIARIRNLMNET HNGELVNAAOLKRKVMRHGVGLSTSSDSELITOLLAFTPP+EEDHTA+WIARIRNLMNET	180
Sbjct	121	HNGELVNAAQLKRKVMRHGVGLSTSSDSELITQLLAFTPPLEEDHTADWIARIRNLMNET	180
Query	181	PTSYSLLVMHNDVVYAIRDPYGNRPLCIGRLIPVNNEGKGKRLAETEGWVVSSESCSFLS PTSYSLLVMH+DV+YAIRDPYGNRPLCIGRLIPVNNEG+GKR_AETEGWVVSSESCSFLS	240
Sbjct	181	PTSYSLLVMHDDVIYAIRDPYGNRPLCIGRLIPVNNEGRGKRSAETEGWVVSSESCSFLS	240
Query	241	IGAEYYREVLPGEIVKISRDGVQTLDIVPRTNGDPSAFCIFEYVYFARPDSIFEGQMVYS	300
Sbjct	241	IGAEYYREVLPGEIVKISRDGVQTLDIVPRTNGDPSAFCIFEYVYFARPDSIFEGQMVYS	300
Query	301	VRRCGQQLAIEARVEADLVSTVPESATPAALGYAEKCGLQYVEVLCKNRYVGRTFIQPN	360
Sbjct	301	VRRCGQQLAIEAPVEADLVSTVPESATPAALGYAEKCGLQYVEVLCKNRYVGRTFIQPN	360
Query	361	MRLRQLGVAKKFGVLSDNFVGKRVVLIDDSIVRGNTISPIIKLLRDSGAKEVHIRVASPP	420
Sbjct	361	MRLRQLGVAKKFGVLSDNFVGKRVVLIDDSIVRGNTISPIIKLLRDSGAKEVHVRVASPP	420
Query	421	IKYPCYMGINIPTKEELIANKPEFNDLAGYIGADSVVYLSVEGLTSAVREGIKAFKDEQN	480
Sbjct	421	IKIPCIMGINIFIKEELIANKPEFNDLAGIIGADSVVILSVEGLISAVREGIKAFKDEQN IKYPCYMGINIPTKEELIANKPEFNDLAGYIGADSVVYLSVEGLTSAVREGIKAFKDEQN	480
Query	481	GINGKTRSSSQGHCTACLTGEYPVKLEW 508	
Sbjct	481	GINGKIRSTS GHCIACHIGEIFVTLEW GINGKTRSTSHGHCTACLIGEYPVELEW 508	



Le pCM189 est un plasmide d'expression pour les levures construit par [Gari, 1997], d'une taille de 8374 pb et qui porte :

- Une séquence de réplication de levure (ARS1)
- Une séquence centromérique de levure (CEN4)
- Un multi-site de clonage en aval d'un promoteur d'expression dans la levure (CYC1) et sous le contrôle de l'opérateur « tet-off » (tetO). L'opérateur répond à la protéine transactivatrice tTA exprimée constitutivement sous le contrôle du promoteur CMV. L'activité de tTA peut être réprimée par l'ajout de tétracycline dans le milieu extérieur.
- Une cassette URA3 comme marqueur de sélection, qui est éventuellement remplacée par une cassette LEU2 dans le cas d'une co-transformation de la levure par exemple.

Ce plasmide possède également une origine de réplication bactérienne (ColE1) ainsi qu'un marqueur de sélection pour la bactérie : le gène de résistance à l'ampicilline, sous le contrôle de son propre promoteur (ampR).

Les chiffres indiqués sont en paires de bases (pb) et correspondent à l'emplacement des différentes casettes sur le plasmide. Entre parenthèse le nombre de site de restriction présent sur l'ensemble du plasmide pour chaque enzyme.

Séquences des sondes utilisées lors des hybridations *in situ* des gènes de la voie des purines chez le xénope

Les différentes sondes d'hybridation *in situ* s'hybrident au niveau des parties soulignées des différents transcrits cibles respectifs. Les codons d'initiation et de terminaison de la traduction sont indiqués en rouge.

La sonde ppat

La sonde ppat a été construite à partir de la séquence de *ppat.L* et possède 93 % d'homologie avec la séuence de *ppat.S*. L'alignement présenté ici a été obtenu par l'outil BLAST et présente ppat.L en premier ligne (Query) et ppat.S en deuxième ligne (Sbjct)

Query	1	ATG GAGTTTGAGGAGCTGGGGGATACGCGAGGAGTGCGGGGGTGTTCGGCTGTATAGCGGCG	60
Sbjct	1	ATGAGTTTGAGGAGCTGGGGATAAGGGAGGAGTGCGGCGTGTTCGGCTGTATAGCGGCG	60
Query	61	GGGAGATGGCCGACCCAGTTAGACGTGCCTCATGTCATCACCCTGGGGCTGGTTGGACTG	120
Sbjct	61	GGAACTGGCCTACCCAACTGGATGTGCCCCACGTCATCACCCTGGGACTGGTTGGACTG	120
Query	121	CAGCACAGGGGACAAGAGAGTGCTGGCATTGTAACAAGTGATGGGAGCTCGGTGCCGACT	180
Sbjct	121	CAGCACAGGGGACAAGAGAGTGCTGGCATTGTAACAAGTGATGGGAGCTCTGTGCCAACG	180
Query	181	TATAGAATGCACAAGGGCATGGGCCTGGTGAACCATGTGTTCAGCGAAGACAGTCTGAAG	240
Sbjct	181	TATAGAATGCACAAGGGCATGGGCTTGGTTAACCATGTGTTCAGCGAAGAGAGTCTGAAG	240
Query	241	AAACTGCACGTGAGTAATCTTGGCATTGGCCACACCAGATATTCCACCAGTGGGAATTCT	300
Sbjct	241	AAACTGCACGTGAGCAATCTGGGCATTGGCCACACCAGATACTCCACCAGTGGGAATTCT	300
Query	301	GCCTTAGAAAACTGCCAGCCCTTTGTGGTCGAGACGTTACATGGAAAGATTGCTGTGGCG	360
Sbjct	301	GCCTTAGAAAACTGCCAGCCCTTTGTGGTTGAGACGTTACATGGAAAGATTGCTGTAGCG	360
Query	361	CATAATGGGGAGCTTGTCAATGCTGCTCAAGCGAAAGGTCATGCGGCACGGCGTG	420
Sbjct	361	CATAATGGGGAGCTTGTCAATGCTGCTCAGCTCAAGCGAAAGGTCATGCGGCACGGTGTG	420
Query	421	GGCCTCTCCACCAGTTCAGACAGTGAGCTCATCACACAGCTTCTGGCCTTCACTCCTCCA	480
Sbjct	421	GGCCTCTCCACCAGTTCAGACAGTGAGTGAGTGATCACCCAATTGCTGGCCTTCACTCCTCCA	480
Query	481	ATGGAAGAAGATCACACTGCCAACTGGATAGCACGCATAAGAAACTTAATGAACGAGACC	540
Sbjct	481	CTGGAAGAAGATCACACTGCTGATTGGATAGCACGTATTAGAAACTTAATGAACGAGACA	540
Query	541	CCAACATCTTACTCCCTGCTTGTCATGCATAACGACGTTGTATACGCCATACGGGATCCT	600
Sbjct	541	CCAACGTCTTACTCCCTGCTTGTCATGCATGATGATGTCATATACGCTATACGCGATCCG	600
Query	601	TATGGGAACCGGCCTCTCTGCATCGGGCGTCTCATCCCTGTCAATAATGAAGGCAAAGGA	660
Sbjct	601	TATGGGAACCGACCTCTCTGCATTGGGCGCCCTCATCCCCGTCAATAATGAAGGAAG	660
Query	661	AAGCGCTTGGCAGAGACTGAGGGCTGGGTGGTGTCCTCCGAATCCTGCAGCTTTTTATCT	720
Sbjct	661	AAGCGCTCGGCAGAGACTGAGGGCTGGGTGGTGTCATCCGAATCCTGCAGCTTTTTATCC	720

Query	721	ATTGGTGCTGAGTATTATCGGGAAGTCCTACCAGGAGAAATAGTAAAGATTTCACGGGAT	780
Sbjct	721	ATCGGTGCTGAGTATTATCGGGAAGTCCTGCCAGGAGAAATAGTAAAGATTTCACGGGAT	780
Query	781	GGAGTTCAGACGCTGGATATTGTGCCGAGAACGAATGGAGACCCATCTGCCTTTTGCATC	840
Sbjct	781	GGAGTTCAGACCCTGGATATTGTGCCAAGAACAAATGGAGACCCATCTGCCTTTTGCATC	840
Query	841	TTTGAATATGTTTATTTGCCCGACCTGATTCAATATTTGAAGGGCAGATGGTTTACTCG	900
Sbjct	841	TTTGAATATGTTTATTTTGCCCGACCTGATTCAATATTTGAAGGGCAAATGGTTTACTCT	900
Query	901	GTGAGACGGAGATGTGGGCAGCAGCTGGCTATAGAAGCTCGAGTAGAAGCCGATCTGGTC	960
Sbjct	901	GTGAGACGGAGATGTGGGCAGCAGCTGGCTATAGAAGCTCCAGTAGAAGCCGATCTGGTC	960
Query	961	AGCACTGTGCCAGAATCTGCAACCCCCGCAGCGTTAGGCTACGCAGAGAAGTGTGGTCTT	1020
Sbjct	961	AGCACTGTGCCAGAATCTGCAACTCCGGCAGCGTTGGGCTATGCAGAAAAGTGTGGTCTT	1020
Query	1021	CAGTATGTGGAAGTATTGTGTAAGAATCGCTACGTAGGGCGAACGTTTATTCAGCCCAAC	1080
Sbjct	1021	CAGTATGTGGAGGTTCTGTGTAAGAACCGCTACGTAGGGCGAACCTTTATTCAGCCCAAC	1080
Query	1081	ATGAGGTTACGGCAGCTGGGAGTGGCCAAGAAATTCGGAGTCCTTTCGGATAACTTTGTT	1140
Sbjct	1081	ATGAGGTTACGGCAGCTTGGAGTGGCTAAGAAATTTGGAGTCCTTTCCGATAACTTCGTT	1140
Query	1141	GGCAAACGAGTGGTTCTGATTGATGATTCTATTGTAAGAGGCAATACTATCTCCCCTATC	1200
Sbjct	1141	GGCAAACGAGTGGTTCTAATTGATGATTCCATTGTGAGAGGCAATACTATCTCGCCTATC	1200
Query	1201	ATAAAGCTGCTCAGGGACTCCGGAGCCAAAGAGGTCCACATAAGAGTAGCATCACCACCT	1260
Sbjct	1201	ATTAAACTTCTCAGGGACTCTGGAGCCAAAGAGGTTCATGTACGAGTAGCATCACCACCT	1260
Query	1261	ATAAAATACCCTTGTTATATGGGAATAAACATTCCTACGAAAGAGGAGCTGATCGCAAAC	1320
Sbjct	1261	ATAAAATACCCTTGTTATATGGGAATAAACATTCCTACAAAAGAGGAGCTGATCGCAAAC	1320
Query	1321	AAACCCGAGTTCAACGACTTGGCTGGTTATATTGGTGCGGACAGTGTTGTTTACCTCTCT	1380
Sbjct	1321	AAACCAGAGTTCAACGACTTAGCTGGTTATATTGGTGCAGACAGTGTTGTTTACCTCTCA	1380
Query	1381	GTGGAGGGACTTACGTCGGCAGTGCGGGAGGGTATCAAGGCCTTCAAGGACGAGCAGAAT	1440
Sbjct	1381	GTGGAGGGACTTACGTCGGCAGTCCGGGAGGGTATCAAGGCCTTCAAGGATGAGCAGAAT	1440
Query	1441	GGAATAAATGGCAAAACAAGGTCATCGTCTCAGGGTCACTGCACGGCCTGTTTGACTGGA	1500
Sbjct	1441	GGAATAAACGGCAAAAACAAGATCAACGTCTCATGGTCACTGCACAGCCTGTTTGACAGGA	1500
Query	1501	GAATATCCAGTGAAGTTGGAGTGG TGA GGCCCATTCTTTTAGCCTCGATAGGTCACAGAT	1560
Sbjct	1501	GAATATCCAGTGGAGCTGGAGTGG TGA GGCCATTTCTTTGAGCCTCGTCAGGTCACAGAT	1560

La sonde gart

La sonde gart a été construite à partir de la séquence du clone IMAGE ne contenant que le domaine codant une protéine à activité Gars et corrrespondant probablement à un variant d'épissage. La partie 3' de la sonde (partie jaune) n'est pas identique à celle retrouvée sur la séquence identifiée et codant les trois activités Gars, Gart et Airs.

gart.L (clone IMAGE) :

ATGGCAGAGACAGTTCTAGTGATTGGAGGCGGGGGGGGGAGAGACATGCTCTGGCTTGGAAACTTGCGCAGTCTCT ACATGTGAAACAAGTGCTCGTTGCACCGGGGAACGCTGGCACCGCAGGGGATGGCAAGATCTCTAACACAGCTGCCCCG GTTGGTGACCATGCCAAGCTTGTCCAGTTCTGCAAAGAAAACAACGTTGGACTGGTTGTCGTTGGGCCGGAAGCTCCTCTG GCAGCAGGGATTATCGATGATTTGACTGCAGCCGGGGTGAGGTGTTTTGGTCCCACAGCCAAGGCGGCGCAGCTTGAGG CCAGTAAGAGTTTTTCCAAAGATTTTATGGACCGACATGGCATTCCAACTGCCCGCTGGAAATCGTTCACTGACCCCAAGG AAGCCTGTAGCTTTATTATGAGCGCTGATTTCCCAGCACTGGTAGTCAAAGCAAGTGGCCTGGCAGCGGGCAAGGGAGTG ATGCCCCCAGCTCAAGACCATAAAAGACTGTTGGATGGGGACCTTGGTCCTAACACGGGGGAATGGGAGCCTATTGTCC AGCTCCACAGATTACAAAAGATTTACTGGAGAAAATCCGAGACATTGTCCTGTTGAAAACCGTGAATGGAATCCGTCAGG ATGGTGCGCCGTATGTTGGTGTACTTTATGCTGGCCTTATGCTGACCAAGGATGGCCCCAAGGTGCTCGAGTTTAA<u>CTGCA</u> <u>GGTTTGGAGACCCTGAATGCCAGGTGATTCTCCCTCTCCTACAAAGTGACCTCTATGATGTTATCCTGGCCACTATTAATGG</u> CAAACTGGCCAGCTGTATGCCCGTGTGGCTAGAGAGCCATGCAGCTGTTACAGTAGTCATGGCCAGTGAAGGCTATCCCT <u>CTAATTATGCCAAGGGATTGGAGATTACTGGCTTCCAAAAGGCCAAAGAGCTGGGACTGGAAGTGTTTCATGCTGGCACT</u> CCCTGGAAGAAGCTAACAAGGGGGTGGCAGCCTTACAGTTTGAAGGAGCCGTGTATAGAAAGGACATTGGTTTCCGGGC TATTGCTTTCCTTAACAAAGCCAGGTGTGTATTGGAAGACATAATG**TGA**GGACACAATACTGTCTGTAGCATTGCCAGG ATTGTGTAGCCTTCTGATGTCAAATCCAACTGGGAAAGTGAATTCATAAAAGCACTTCATAACCCACCGTACACTCAGACTA ACATTTCCGCTGTCTTCTATTTCTTAATGTTACAAAATGACCTACACTGTGCAGTTGTATTTTAGGTCGTTTCCCTTAAAATAA AATATCCTACTTCTATGGGTTACTTAAAGGAACAGTAACATGAAAAAAAGTGTTTTAAAGGAATGACAATATAACACAGTG TTGCCCTGCCCTTAACCTCGTGGCATATAGATTTTTTCAATTTCCGCCATTGCTACGCAGCAGCTTTATGTGAACTTTAGTA GTGTTTCTGAAGGGCAGCACTGTATTTGTTTTCAGATAGTTCACCAGAAATAAAGGCTTTTTCCAATTACTTTAATTACTCTA TTTTTGACTGTTTTTCTAATATTGTGTAAAGTGTCATTTTTCACCTTCTAAAGCAGCTCTGGGGGGGTCGCCGACCCTGTAAAC TGTTCTAAATTGATACATTTAGTTGATACATTTCTTATCTTTGTCCCTGCGGAGCAGAATCTCTGAGTTTCATTACAGGCAGC TGTTAGAATTGATACAATAGTTACTAATACTCCAGAGATGCTGCTGAGAAATGGATCAACTAAATGTTGCAAAATTGTAAC AGTTCAGAATTTGCACCTGAATTTACTGAACTGCCAACTCAAACACCAGAGACAGGGACTACAAACTTTACACTTAGATTTT GGAAAAACAAGTAATTGAAAAAAGTCTTTATTTCTGGGGAAAAATCTGAAAACAGTTGAACTGAAAAAAGTGTTCGGAAG GTGAACAACCCCTTTAAAACACTTTCATGTTTTTGTGTTCATGTTACTGTTCCTTTAATGCAGACCCTGGGATCTGTGTGTTT GAATGATGACTATCCATATTCACATTAAATGGAATTTCCTAATTGTTTTGACTGGTTCCTATCTTGGCTGTACTGATAAATGT TTTGTTATTCTGTATTTTGTCTCCTGCTACTGGACTGGGTGTGATTTTCTGTAACCTTGACAAGGATAACTTTAAGGCTCCTC TACAGTCTCATGGTTTTGTTACATATTCGCACCTGCTGTGTATATGATGATTTCTTTGTAACCCAAAAAATGGATTTCTTAAA

La sonde atic

La sonde *atic* a été construite à partir de la séquence du gène *atic.L* et possède 94 % d'homologie avec la séquence d'*atic.S*. L'alignement présenté ici a été obtenu par l'outil BLAST et présente *atic.L* en premier ligne (Query) et *atic.S* en deuxième ligne (Sbjct).

Query	1	ATG GCGGAGATCGCTCTGTTCAGTGTATCTGATAAAAGTGGACTGGTAGAGTTTGCGCAG	60
Sbjct	1	ATG GAGGAGATCGCTCTGTTCAGTGTGTCAGATAAAAGTGGACTGGTAGAGTTTGCACAG	60
Query	61	CAGCTGAGCACCCTTGGCCTCTCTTAGTTGCCTCTGGAGGGACTGCTAAGTGTCTGCGG	120
Sbjct	61	CAGCTGAGCACCCTTGGCCTCTTTAGTTGCCTCTGGAGGGACTGCAAAGTGTCTGCGG	120
Query	121	GATGCAGGCCTCTCAGTCAGGGATGTGTCTGAGATCACTGGGTTTCCGGAGATGTTGGGG	180
Sbjct	121	GATGCAGGGCTCTCTGTCAGGGATGTGTCTGAGATCACTGGGTTTCCAGAGATGTTGGGG	180
Query	181	GGCCGGGTAAAAACTCTGCACCCGCTGTTCATGCAGGGATCCTGGCACGGAGCAGCCCA	240
Sbjct	T8T	GGCAGGGTAAAAACTCTGCACCCTGCAGTTCATGCAGGGATCCTGGCAAGAAGCAGCCCA	240

Query	241	GAAGATCAAGCTGATATAAACAGACTGGGCTTCAGCTATATTAGAGTTGTAGTGTGTAAC	300
Sbjct	241	GAAGATCAAGCAGATGTAAGCAGACTGGGGCTTTAGCTATATCAGAGTTGTTGTGTGTAAC	300
Query	301	CTGTACCCGTTTGTGAAGACCGTGTCTGCAGCTGGCGTAACCGTGGAGGATGCAGTGGAA	360
Sbjct	301	CTGTACCCATTTGTGAAGACTGTGTCTGCAGCTGGTGTTACTGTGGAGGAAGCAGTGGAA	360
Query	361	CAAATTGATATTGGTGGTGTCACGTTGTTACGCGCTGCTGCAAAGAACCATGCCCGTGTG	420
Sbjct	361	CAAATTGATATTGGTGGTGTCACACTGTTACGTGCTGCTGCAAAGAACCATGCCCGGGTG	420
Query	421	ACAGTTCTGTGCGACCCTAGTGACTACAAGAGCATCGCAGCGGAAATGGGAAATTCCGAT	480
Sbjct	421	ACAGTTGTGTGTGACCCTAGCGACTACAAGTGCATCGCAGAGGAAATGGGGAAATCTGAT	480
Query	481	AACAAGGACACCTCTCCAGAGACACGATGTCGGCTGGCCCTTAAGGCATTTACCCACACT	540
Sbjct	481	AAAAAGAACACCACTCCAGAGACACGATGTCAGCTGGCCCTTAAGGCATTTACCCACACT	540
Query	541	GCACAGTATGATGATGCCATCTCTGATTACTTTCGGAAGCAATACAGTAAGGGCATTTCT	600
Sbjct	541	GCACAGTATGACGATGCCATCTCTGATTACTTTCGGAAGCAATACAGTAAGGGCATTTCT	600
Query	601	CAACTTCCTCTGCGCTACGGAATAAACCCCCATCAGGTTCCTGCTCAGATTTATACTCGT	660
Sbjct	601	CAACTTCCTCTGCGCTATGGAATAAACCCCCATCAGGTTCCTGCTCAGATTTACACTCGT	660
Query	661	GGGCCACAGCTTCCTCTCACAGTGCTGAATGGCTCTCCTGGGTTCATTAACCTGTGCGAT	720
Sbjct	661	GGGCCACAGCTTCCCCTCACAGTGCTGAATGGCTCTCCTGGGTTCATTAACCTGTGTGAT	720
Query	721	GCTCTAAATGCATGGCAACTTGTTAGAGAATTGAAGAATGCCCTGGGACTACCAGCTGCC	780
Sbjct	721	GCTCTAAATGCCTGGCAGCTTGTTAGAGAATTGAAGAATGCCCTGGGACTACCAGCTGCC	780
Query	781	ACATCCTTCAAACACGTGAGCCCAGCAGGTGCTGCTGTTGGAGTGCCCCTGACAGAGGAA	840
Sbjct	781	ACATCCTTCAAACACGTGAGCCCAGCAGGTGCCGCAGTTGGAGTGCCCCTGACAGAGGAA	840
Query	841	GAAGCTCAAGTCTGTATGGTCCAGGATATCTTCTCAACTCTTACACCTTTAGCATCTGCA	900
Sbjct	841	GAAGCTCAAGTCTGTATGGTCCAGGATATCTTCCCAACACTTACACCTTTAGCAACTGCA	900
Query	901	TATGCGCGAGCCAGAGGGGCAGACAGAATGTCCTCTTTTGGTGACTTTATTGCTGTATCT	960
Sbjct	901	TATGCTCGAGCCAGAGGGGCAGACAGAATGTCCTCATTTGGTGACTTTATTGCTGTTTCT	960
Query	961	GATGTGTGTGTGATGTCGCCACGGCAAAAATCATCTCCCGGGAGGTATCAGATGGCATTGTG	1020
Sbjct	961	GATGTGTGTGATGTTGCCACAGCAAAAATCATCTCTCGGGAGGTATCAGATGGTATTGTG	1020
Query	1021	GCTCCTGGGTATGAGGATGAAGCTCTGAAGATCCTTTCTAAAAAGAAGAATGGAAGTTAC	1080
Sbjct	1021	GCCCTGGGTATGAGGATGAAGCTCTTAAGATCCTGTCTAAAAAGAAGAATGGAAGTTAC	1080
Query	1081	TGTGTCTTGCAGATGGACACTTCATACGAGCCCAGTGACATTGAAATCCGGAGCCTCTTT	1140
Sbjct	1081	TGTGTCCTGCAGATGGACCTTTCATACGAGCCCAGTGACATTGAAATCCGGAGCCTGTTT	1140
Query	1141	GGCCTGCAGCTTGAGCAGAAGAGAAACGATGCAGTTATAGACCGGACTTTGTTCAACAGC	1200
Sbjct	1141	GGCCTACAGCTGGAGCAGAAGAGAAACAATGCAGTTATAGACCGCACTTTGTTCAACAAC	1200
Query	1201	ATTGTGACCAACAACAAAGAGATTCCAGAGTCTGCTGTTAGAGACCTCATAGTAGCCACA	1260
Sbjct	1201	GTTGTGACCAACAACAAAGAGATCCCAGAGTCTGCTGTTAGAGACCTCATAGTAGCCACA	1260

Annexes

Query	1261	ATAGCGCTGAAATATACACAGTCTAATTCTGTCTGCTATGCTAAAGACGGGCAGGTGATT	1320
Sbjct	1261	ATAGCACTGAAGTATACACAGTCTAATTCTGTCTGCTATGCTAAAGATGGGCAGGTGATT	1320
Query	1321	GGTATGGGTGCAGGACAGCAATCCCGTATACACTGCACCAGACTAGCAGGGGACAAAGCA	1380
Sbjct	1321	GGTATGGGTGCAGGACAGCAATCTCGTATACACTGCACGAGACTAGCAGGGGACAAAGCT	1380
Query	1381	GATAACTGGTGGCTGCGGCATCACCCACGTGTCCTTGGCATGAAATTCAAAGCTGGGGTG	1440
Sbjct	1381	GATAATTGGTGGCTTCGGCATCACCCTCGTGTCCTAGGCATGAAGTTCAAAGCTGGGGTG	1440
Query	1441	AAGAGGGCAGATATCTCAAATGCTATTGATCAGTTTGTGAGCGGCACATTGGGAGAGGAA	1500
Sbjct	1441	AAGAGGGCAGATATCTCAAATGCCATTGATCAGTATGTGAGCGGCACCTTGGGAGAGGAA	1500
Query	1501	GATCTGCCACAGTGGCAAGCTCTGTATGATGAGCCCCCAGAACAGCTGACCTCGGCAGAG	1560
Sbjct	1501	GATCTGCCACAGTGGCAAGCTCTCTATGATGAGCCTCCAGAACAGCTGACCTTGGCAGAG	1560
Query	1561	AAGAGGGATTGGATCTCGAAACTCAGTGGAGTTTCCTTGAGCTCTGATGCCTTCTTTCCA	1620
Sbjct	1561	AAGAGGGATTGGATCTCTAAACTGAGTGGAGTTTCCTTGAGCTCAGACGCCTTCTTTCCA	1620
Query	1621	TTCAAGGATAACTTGGAGCGAGCAAAGAAGAAGAGTGGGGTTCAGTTCATAGCTGCTCCATCT	1680
Sbjct	1621	TTCAAAGATAACTTGGAGCGAGCAAAGAAGAAGAGTGGGGTTCAATCCATTGCTGCTCCATCT	1680
Query	1681	GGTTCTGCTGCAGATAAAGTTGTGATTGACTCCTGTAATGAGCTGGGCATCGTACTAGCA	1740
Sbjct	1681	GGTTCTGCTGCAGATAAAGTTGTGATAGATGCCTGTAATGAGCTGGGTATTGTGTTAGCA	1740
Query	1741		1800
Sbjct	1741	CACACAAACCTGCGCCTCTTCCACCACTGATATTCCTTGTGTCATTTGT-GT-T-GAT	1795
Query	1801	<u>GC</u> <u>AGTAAATCTTTGTATGGCTCCTATTAAAACCTCTTGCACATCCaaaaaaaaaa</u>	1857
Sbjct	1796	GCAGTAGTAAATCTTTGTATGGCTCCTATTAAAACCGCTTGCACACCCCAAAAAAAA	1855

La sonde adsl

adsl.L :

ATGGAGGGGGGGGCAGTGGGCTAAGCATGGACTCCAATACCCGGATTACTGGCAGCGTCTCCCCGCTGACTCCCGGGCCCG AAGAAGTTATGAGGTATCGTTCGCCGCTTGTGTCCAGGTACGCGAGCCGGGAGATGGCCTTCAACTTCAGCGACAGCAAG AAATTTCAGACGTGGAGACGGCTTTGGTTATGGCTGGCGCAGGCCGAACGGAGTTTGGGGCTGCCGATTACAGAAGAGC CGTCATGGCACATGTACACACTTTTGCACACTGCTGCCCCAAAGCCGCCCCAGTTATTCATCTTGGTGCCACTTCTTGCTAC GTGGGAGACAACACTGACCTGATTGTTCTACGTGATGGTTTTGACCTGCTGCTTCCAAAGCTGGCCCGAGTTCTAAACCGC GGGAAGCGCGCCTGCCTTTGGCTCCAGGACTTGTGCATGGACCTGCGTAACTTGGAACGAGCCAGGAATGAGCTCCGGTT CCGTGGAGTGAAGGGCACCACAGGCACAGGCCAGCTTCCTGCAGCTTTTTGACGGTGATCATGACAAGGTGGAGGAG TTAGACAGAATGGTTACTTCCATGGCAGGATTTAAAAGGGCCTATATAGTGACTGGGCAAACCTACAGCCGCAAGGTAGA TGTAGAGGTGGTGTCTGTCCTGGCCAGTTTAGGGGCGACTGTTCACAAGATATGCACTGATATCCGTTTACTGGCAAACCT TAAAGAGCTTGAAGAACCATTTGAGAAAGAACAGATCGGATCTAGTGCTATGCCCTACAAGAGAAACCCCATGCGCTCGG AACGCTGCTGCAGCTTGGCCACCTTATGACACTCATCATGAACCCGCTGCAGACTGCCTCAGTTCAATGGTTTGAAC GCACACTAGATGATGATGACGACCGACGACGAATATGTTTGGCGGAAGCCTTTCTCACTGCAGATATCATTCTTAGTACTCTGC AGAACATCTCTGAAGGATTGGTGGTGTATCCAAAAGTGATTGAAAGGAGAATCCGTCAAGAGCTGCCCTTCATGGCAACA AAGCAGGTGCAGTGGTAAAGCAAGAAGGAGGAGACAATGACCTTATCTTCAGAATCCAATCTGATTCTTACTTTGCCCCAA **TTCACGCTCACCTGGAACAGCTGCTTGATCCGAAGTCCTTCATAGGCCGGGCACCTCAGCAGGTGCTGAAGTTTTTAAAGG** AAGAGGTGATTCCACTGCTGAGCCCTTACCAAAGTAAAATGGATGTGAAGATGGAGCTGGAGCTGTGAAATGCATCAATC

La sonde adss

adss.L:

AGGAACTAGCCGCTACAGTAAGCGTAACTCCCAGTCTAATCATCAGCAGAAAACGAATCGCCCGGGCTACCGAACGGT GGAGCGTGCTGTGCTAGTGCCACTGGACACTTCCTGCTCGTCGGGAATAAAGTGACAGTTGTACTAGGGGGCTCAGTGGGG <u>CGACGAAGGAAAGGGTAAAGTTGTGGATCTTCTGGCTCAGGATGCGGATATCGTGTGCCGCTGTCAGGGAGGAAACAAT</u> <u>GCAGGCCACACAGTTGTTGTGGGATTCTGTCGAGTATGACTTTCACCTTTTGCCAAGTGGAATTATAAATCAAAATGCTATTG</u> CAGGAACAACAAGACAAGACAAGCTGGGAAAAATTTGGGCACAACAAGAAGGGTATTGGTCCAGTGTACTCTTCAA AAGCTGCTAGGAGTGGACTCAGAATGTGTGATCTTGTTTCTGACTTTAATGAATTCTCTCAGAGGTTTAAATTGTTAGCTAA GCAGTACAAGTCCATGTACCCATCCTTAGAAATAGACATTGATGGGGAATTGAAGAAACTTCAGGATTATGCTGACAGGG GGCTTGGGCATTCCACCGCAAAGCATTGGTGATGTATATGGTGTTGTGAAGGCATACACTACGAGGGTGGGAATCGGTGC CTTTCCAACAGAACAAAACAATGACATTGGAGAAATGCTGCAAACACGAGGCCATGAATATGGAGTTACCACTGGCAGAA AGAGGAGATGCGGATGGTTGGATTTAGTTTTGCTCCGATATGCTCACATGATAAATGGATTCACTGCGCTTGCTCTTACCA AACTTGATATCTTGGACGTCTTTTCTGAAATCAAAGTTGGTGTATCATACAAAATAGATGGCAAGAATATACCTCATTTTCC AGCAAATCAAGAAGTACTTAATAAAGTAGAAGTTGAATATGAGACACCTCCCTGGTTGGAATAAGGACACATCTAATGTCC GAACATTTGAGGAGCTGCCTGAAAATGCCAAGAAATATGTTCAATTCATAAAAGAAGAACTCGGCATTCCTATTAAGTGGA TTGGTGTTGGAAAATCCAGAGAGTCGATGATTCAGCTGTTCTAA

La sonde hprt

La sonde *atic* a été construite à partir de la séquence de *hprt.L* et possède 94 % d'homologie avec la séuence de *hprt.S*. L'alignement présenté ici a été obtenu par l'outil BLAST et présente *hprt.L* en premier ligne (Query) et *hprt.S* en deuxième ligne (Sbjct)

Query	1	CTCGCTTGTATCTGCGTGTCCT 22	
Query	23	TCGTACCGCGGACACAGGCT-CAGACATGGCGAGCCCCTGCATTGTGATTCAAGATGATG	81
Sbjct	2	TCGTACGTCGGACACAGGCTCCAGAC ATG GCGAGCCCCTGTATTGTGATTCAGGATGATG	61
Query	82	AACAGGGATACGATCTGGACTTATTCTGCATTCCTAAACATTATGCAGCCGATCTGGAGA	141
Sbjct	62	AACAGGGGTATGATCTTGACTTATTCTGCATTCCTAAACACTACGCCGCCAGCCTGGAGA	121
Query	142	AAGTCTACATTCCACATGGGCTTATAATGGACAGGACTGAAAGGCTGGCT	201
Sbjct	122	AAGTTTACATTCCACATGGGCTTATAATGGACAGGACTGAAAGGCTGGCCCGAGATATAA	181
Query	202	TGAAAGACATGGGAGGTCACCATATTGTAGCACTGTGTGTCCTGAAGGGTGGCTATAAGT	261
Sbjct	182	TGAAAGACATGGGAGGACACCACATTGTAGCATTGTGTGTG	241
Query	262	TCTTTGCTGATCTACTTGACTACATTAAAGCACTTAACCGCAACAGTGACAAGTCTATCC	321
Sbjct	242	TCTTCGCTGATCTACTTGACTACATTAAAGCACTTAATCGTAACAGTGACAAGTCTATCC	301
Query	322	CTATGACAGTAGATTTTATCAGATTGAAAAGTTACTGTAATGATCAATCGACAGGAGACA	381
Sbjct	302	CTATGACCGTAGATTTTATCAGACTGAAAAGTTACTGTAATGATCAATCA	361
Query	382	TAAAGGTTATTGGAGGGGATGACCTTTCCACCTTGACAGGCAAGAATGTTTTGATTGTTG	441
Sbjct	362	TCAAGGTTATTGGAGGGGACGACCTCTCCACCTTGACAGGCAAGAATGTTTTGATTGTTG	421
Query	442	AGGATATAATTGATACTGGAAAAACAATGAAGACTTTGCTTGC	501
Sbjct	422	AGGATATAATTGATACAGGAAAAACAATGAAGACTTTGCTTGC	481

Annexes

Query	502	ACCCAAAAATGGTTAAAGTAGCCAGCTTGCTTGTAAAGAGAACTCCACGAAGTGTGGGAT	561
Sbjct	482	ACCCAAAAATGGTTAAAGTTGCCAGCTTGCTTGTAAAAAGAACTCCACGAAGTGTGGGAT	541
Query	562		621
Sbjct	542	ACAGGCCAGACTTTGTTGGATTTGAGGTGCCTGACAAATTTGTTGTTGGTTACGCATTAG	601
Query	622	ACTACAACGAGTACTTTAGAGACTTGAATCATATCTGTGTGATAAGTGAGGACGGTAAAG	681
Sbjct	602	ACTACAACGAGTACTTTAGAGACTTGAACCATATCTGTGTGATAAGTGAAGACGGTAAAG	661
Query	682	AAAGATACAAGACA TAG ACAGAAGCTGTGAAAGAGTTAATTTGCAAGCTTTTTACAATAT	741
Sbjct	662	AAAGATACAAAAACA TAG ACAGAAGCTGTGGAAGTGTTCATTTGCCAG-TTTTTAAAGTAT	720
Query	742	ATAACAGATTTGTTGCAATTCGCCTTGcccccccaaaaaaaTACCTGTTTGCTTTGTA	801
Sbjct	721	ATAATGGATTTGCTGCCCCCCCCCAAAAACCTGTTTGCTTTGTA	765
Query	802	TTTCAGACCCCTTCCTGCATGAAAGAAATTACAGCTTTCTCCAGAAGTTTGGCTATAGAT	861
Sbjct	766	TTTCAGACCTCTTCCTACATGAAAAAAA-TACAGCTTTCTCTGCAAGTTTGGCAATAGAT	824
Query	862	TTCTAGACtttt 873	
Sbjct	825	TTCTAGACTTTT 836	

La sonde aprt

aprt.L :

Profils d'expression spatiale des gènes de la voie des purines : contrôle des hybridations *in situ* (sonde sens)

Hybridations *in situ* effectuée en utilisant les sondes sens contrôles et en parallèle des sondes antisens (Résultats paragraphe I.3I.3b).



Profils d'expression spatiale des gènes de la voie des purines : images complémentaires

Images d'embryons au stade 19-20 après hybridations *in situ* (Résultats paragraphe I.3I.3b), en complément de ceux présentés dans la Figure 19. ve : vésicule optique. cn : crêtes neurales crâniennes.



Site de fixation des morpholinos à disposition

Dans chaque cas, le MO sur sa séquence cible est représenté par un trait. Le codon d'initiation (ATG) est indiqué en rouge. L'étoile indique les gènes dont la séquence codante a été modifiée pour ne plus être reconnue par le MO (suppression de la partie 5' non codante et mutations silencieuses indiquées en vert). La base de *hprt.S* non reconnue par le MO *hprt* est indiquée en bleu. Cette seule base supplémentaire ne devrait pas empêcher le MO de se fixer.

MO ppat : 5' TCCCCAGCTCCTCAAACTCCATCAC 3'

ppat.L :	5' TTGTGATGGAGTTTGAGGAGCTGGGGATACGC 3'
ppat.S :	5' CTGTGATGGAGTTTGAGGAGCTGGGGATAAGG 3'

*ppat.L : 5' ATGGAATTCGAAGAATTAGGCATAAGG 3'

MO *hprt* : 5' GCTCGCCATGTCTGAGCCTGTGTCC 3'

hprt.L: 5' ACCGCGGACACAGGCTCAGACATGGCGAGCCCCTG 3'

hprt.L : 5' ACCGCGGACACAGGCTCAGACATGGCGAGCCCCTG 3'

hprt.S : 5' ACGTCGGACACAGGCTCCAGACATGGCGAGCCCCTG 3'

*hprt.L :

MO1 adsl : 5' TTAGCCCACTGCTCCCGTCCATGCT 3' MO2 adsl : 5' TGCTTAGCCCACTGCTCCCCTCCAT 3' adsl.L : ______MO1 5' CTTGAAGCATGGAGGGAGGAGCAGTGGGCTAAGCATGGAC 3' MO2 adsl L : ______5' ATGGAAGGCAGTAGCGGCCTTAGTATGGAC 3'

adsl.L : 5' ATGGAAGGCAGTAGCGGCCTTAGTATGGAC 3'

MO contrôle (cMO) qui n'a théoriquement pas de sequence cible ni d'activité biologique :

5' ATGGCCAGTCCCTG 3'

5' CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA 3'

Expression temporelle des gènes de la voie de biosynthèse des purines de *Xenopus laevis*

Ces profils d'expression ont été obtenus par RNAseq par les auteurs Session *et al.* [Session, 2016]. Chaque graphique est disponible sur <u>www.xenbase.org</u>.





Communications scientifiques effectuées lors de la thèse

• Communication orale lors d'un séminaire interne de l'unité CNRS UMR 5095, le 12 mai 2016 :

« Le rôle de la voie de biosynthèse des purines au cours du développement embryonnaire de *Xenopus laevis* »

• Communication orale lors de la journée de l'école doctorales 2017 :

« The role of the purine biosynthesis genes in muscle development of Xenopus laevis »

• Participation à la finale de l'Université de Bordeaux du concours « ma thèse en 180 secondes », le 12 avril 2017

https://www.youtube.com/watch?v=amCdEq65qSU

• Participation au congrès européen « *the European Amphibian Club 2017* » à Rennes du 28 au 30 juin 2017

Présentation d'un poster :

"The purine biosynthesis genes are involved in *Xenopus laevis* muscle development "

Maëlle Duperray, Christelle Saint-Marc, Bertrand Daignan-Fornier, Karine Massé and Benoît Pinson

Purine biosynthesis is a conserved metabolic pathway essential for many cell functions. In Human, several mutations in genes involved in this pathway lead to severe neuromuscular diseases which are, at least in part, caused by unknown developmental impairments. We established a *Xenopus laevis* model to decipher the role of the purine biosynthesis genes during development. The main Xenopus purine genes were identified in silico and functionally validated in vivo in a yeast heterolougous system. Moreover, spatio-temporal analyses in *Xenopus* revealed that these genes are expressed all along embryogenesis, especially in neuromuscular tissues, suggesting an important role in their development. The knock-down of *ppat, adsl* or *hprt,* three key purine genes leads in each case to severe defects in embryonic skeletal muscles, in particular in somites and hypaxial muscles. These muscles phenotypes are the consequence of an important and early alteration in expression of some crucial Myogenic Regulatory Factors (MRF), such as myoD and myf5. The molecular mechanisms by which purine genes affect the MRF expression are under investigation. In conclusion our results show that X. laevis is an appropriate model to get new insights into the neuromuscular developmental alterations associated with purine deficiencies.

• Publication scientifique en tant que premier auteur : manuscrit en cours d'écriture.