



Etude fonctionnelle de l'induction neurale chez le céphalochordé *Branchiostoma lanceolatum*

Yann Le Petillon

► **To cite this version:**

Yann Le Petillon. Etude fonctionnelle de l'induction neurale chez le céphalochordé *Branchiostoma lanceolatum*. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. <NNT : 2014PA066116>. <tel-01164975>

HAL Id: tel-01164975

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01164975>

Submitted on 18 Jun 2015

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 392

Equipe Evolution et développement des chordés

BIOM UMR7232

Etude fonctionnelle de l'induction neurale chez le céphalochordé *Branchiostoma lanceolatum*

Par

Yann Le Pétillon

Thèse de doctorat

Biologie du Développement et Evolution

Dirigée par

Héctor Escrivà et Stéphanie Bertrand

Présentée et soutenue publiquement le 29 avril 2014

Devant le jury composé de :

M. Laurent Kodjabachian

M. Vincent Laudet

M. Michael Manuel

M. Vincent Bertrand

M. Héctor Escrivà

Mme. Stéphanie Bertrand

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-encadrante

Remerciements

Merci Hector et Stéphanie pour ces quatre années avec vous. Merci pour votre encadrement et surtout pour la manière dont vous l'envisagez et l'exercez. Merci de faire de cette équipe plus qu'une équipe. Merci pour les opportunités que vous m'avez offertes. Merci de m'avoir montré que la science ne se résume pas à la recherche. Merci pour tout ce que vous m'avez appris. Difficile de résumer ce chapitre de ma vie parmi vous en quelques mots mais bref, merci pour TOUT !!!

Merci à tous les membres de l'équipe Amphioxus passés et présents, Pepito, Momo, Lucie et Daniel. Merci pour cette ambiance de travail qui jour après jour ont fait du labo un lieu de bonne humeur bien plus qu'un lieu de labeur.

Merci aux membres du BIOM. Merci d'avoir participé à créer une ambiance agréable en son sein. Merci pour les échanges que j'ai eu l'occasion d'avoir avec vous, que ce soit scientifiques ou extra-scientifique.

Merci pour tout Sylvain. Merci pour ton accueil, pour le dépaysement que tu m'as offert, merci pour les échanges que nous avons eu au Chili et depuis.

Merci aux membres de l'observatoire qui auront participé à rendre ces années agréables. Merci à l'équipe de la restauration. Merci pour votre bonne humeur imperturbable, jour après jour.

Merci Président Caza ! Les discussions du comité (et toutes les autres) n'auraient pu être aussi prolifiques sans toi...

Merci petit Bordelus. Merci pour toutes les soirées, les matchs, les cafés et j'en passe, qui m'auront fait sortir de ma routine de laboratoire.

Merci Crecre pour les innombrables cafés et discussions à refaire le monde (et à plus petite mesure l'observatoire). Ce n'est pas gagné mais pourquoi ne pas garder nos illusions...

Merci Solveig, Karine, Tatiana, Wémy, Sabrina, Marine, Raph, Camille, Chuby. Merci pour tous les moments passés ensemble, au labo et en dehors. Merci d'avoir rendu les bons comme les mauvais jours toujours meilleurs. Ces années n'auraient pas été les mêmes sans vous.

Et tous ceux que j'oublie... Merci.

Merci à mes parents et mes grands parents. Merci pour vos encouragements au cours de ces dernières années.

Merci à la Crème, merci pour votre soutien, merci d'être là.

Merci Guilaine. Quoique que je dise, les mots seront insuffisants. Je ne peux que te remercier par ce clin d'œil qui veut dire tant.

Merci à tous. Un grand MERCI !!!...

SOMMAIRE

Préambule	1
-----------------	---

Introduction

Partie I : L'amphioxus

I - Identification, description et position phylogénétique de l'amphioxus	4
II - Milieu de vie.....	7
III - Reproduction et cycle de vie.....	8
IV - Le développement embryonnaire	9
V - Intérêt de l'amphioxus comme modèle biologique	13
VI - Conclusion.....	16

Partie II : L'induction neurale

I - Induction neurale.....	19
II - Induction neurale et « modèle par défaut »	21

Partie III : Les voies de signalisation impliquées dans l'induction neurale

I - Rôle de la voie de signalisation BMP au cours de l'induction neurale.....	28
II - Rôle de la voie de signalisation FGF au cours de l'induction neurale	37
III - Autres voies de signalisation impliquées au cours de l'induction neurale	48
IV - Induction neurale chez les tuniciers	50

Partie IV : Induction neurale chez l'amphioxus

I - Induction neurale et organisateur chez l'amphioxus	54
II - Mécanismes moléculaires de l'induction neurale chez l'amphioxus.....	59
III - Rôle des voies de signalisation BMP, FGF et Activine/Nodal au cours de l'induction neurale chez l'amphioxus – Données fonctionnelles	63

Introduction - Bilan	70
----------------------------	----

Résultats et discussion

I - Etude de l'expression de gènes de la voie de signalisation TGF- β et du gène SoxB1a au cours du développement embryonnaire de l'amphioxus	73
II - Etude fonctionnelle du rôle des voies de signalisation BMP et FGF au cours de l'induction neurale – Résultats préliminaires	79
III - Regard à partir des céphalochordés sur l'évolution de l'induction neurale dans la lignée des chordés	90
IV - Analyse et critique des données présentées dans l'article et perspectives expérimentales.....	117
V - Données additionnelles sur l'induction neurale chez l'amphioxus.....	122

Modèle de l'induction neurale chez l'amphioxus	128
--	-----

Perspectives	129
--------------------	-----

Conclusion générale	130
----------------------------------	------------

Annexes.....	132
--------------	-----

Bibliographie	148
---------------------	-----

PREAMBULE

Le concept d'induction neurale fut proposé par Hilde Mangold et Hans Spemann il y a de cela 90 ans. Ce concept propose que la première étape de la formation du système nerveux central est un phénomène induit, sous le contrôle de signaux émanant d'une structure particulière qui fut par la suite appelée organisateur. Ce n'est qu'au cours des 30 dernières années que les aspects moléculaires du mécanisme d'induction neurale ont commencé à être décryptés. Ainsi, deux voies de signalisation majeures ont été identifiées, à savoir les voies de signalisation BMP et FGF. Cependant, il existe encore aujourd'hui des divergences de points de vue concernant le rôle de chacune d'entre elles au cours de l'induction neurale. De plus, si le mécanisme d'induction neurale a fait l'objet de beaucoup d'études chez les vertébrés, la communauté scientifique ne s'est que très peu intéressée à l'évolution de ce mécanisme.

Dans le but d'approfondir les connaissances portant sur l'induction neurale et sur l'évolution de ce mécanisme chez les chordés, mon travail de thèse s'est focalisé sur la mise en place du tissu neural chez le céphalochordé *Branchiostoma lanceolatum* (amphioxus). Dans ce manuscrit, avant d'exposer les différents résultats obtenus au cours de mes travaux, je présenterai dans un premier temps l'amphioxus, le modèle animal sur lequel j'ai effectué mes recherches. Ce chapitre permettra de découvrir un organisme qui au cours de ces dernières années est devenu un modèle d'étude utilisé par plusieurs laboratoires en Europe mais aussi dans le monde. Je présenterai aussi l'intérêt de cet organisme pour des études concernant l'évolution des mécanismes développementaux chez les chordés. Par la suite je me focaliserai sur le mécanisme de l'induction neurale et sur son étude chez différents modèles animaux, principalement vertébrés. Ce chapitre sera l'occasion de retracer l'historique des études portant sur l'induction neurale, puis de faire un état de la compréhension actuelle de l'implication de différentes voies de signalisation au cours de l'induction neurale, et plus particulièrement des voies de signalisation BMP et FGF. Enfin, j'exposerai différentes données moléculaires obtenues chez l'amphioxus ayant grandement participées l'orientation mes travaux.

Introduction

Partie I : L'amphioxus

SOMMAIRE

Partie I : L'amphioxus

I -	Identification, description et position phylogénétique de l'amphioxus	4
II -	Milieu de vie.....	7
III -	Reproduction et cycle de vie.....	8
IV -	Le développement embryonnaire	9
IV.1 -	De la fécondation à la gastrulation.....	9
IV.2 -	De la gastrulation à la neurulation	11
IV.3 -	De la neurulation au stade larvaire	11
V -	Intérêt de l'amphioxus comme modèle biologique	13
V.1 -	Données paléontologiques.....	13
V.2 -	Données génomiques	13
V.3 -	Maîtrise technique du modèle animal.....	15
VI -	Conclusion.....	16

I - IDENTIFICATION, DESCRIPTION ET POSITION PHYLOGENETIQUE DE L'AMPHIOXUS

La première description rapportée de l'amphioxus est établie en 1774 par un zoologiste allemand, Peter Simon Pallas, à partir d'un spécimen trouvé sur les côtes de Cornouailles en Angleterre. Pallas nomme cet animal *Limax lanceolaris* (*Limax* = limace ; *lanceolaris* = lancéolé (en forme de fer de lance)) et le classe comme appartenant à la famille des mollusques (Pallas, 1774) (fig. 1). Ce n'est qu'en 1834 qu'un zoologiste italien, Gabriel Costa, le classe comme un animal proche des vertébrés et le renomme *Branchiostoma lubricus*, suite à l'identification erronée de « branchies buccales » (*branchio* = *branchie* ; *stoma* = bouche) se révélant être en réalité des cirres buccaux. Le terme *Branchiostoma* est néanmoins toujours utilisé aujourd'hui afin de désigner le genre (Costa, 1834). En 1836, le naturaliste William Yarell est le premier à décrire chez l'amphioxus une notochorde, trait caractéristique du phylum des chordés et le renomme *Amphioxus* en se basant sur sa morphologie générale (du grec *amphi* = des deux côtés ; *oxus* = pointu) (Yarell, 1836). Contrairement aux autres chordés, l'amphioxus possède une chorde sur toute la longueur du corps, de la partie la plus antérieure à la partie la plus postérieure, caractéristique à l'origine du nom du sous-embranchement des céphalochordés ou Cephalochordata (*kephale* = tête, *khorde* = chorde). J'utiliserai par la suite le terme amphioxus comme terme générique désignant tous les céphalochordés.

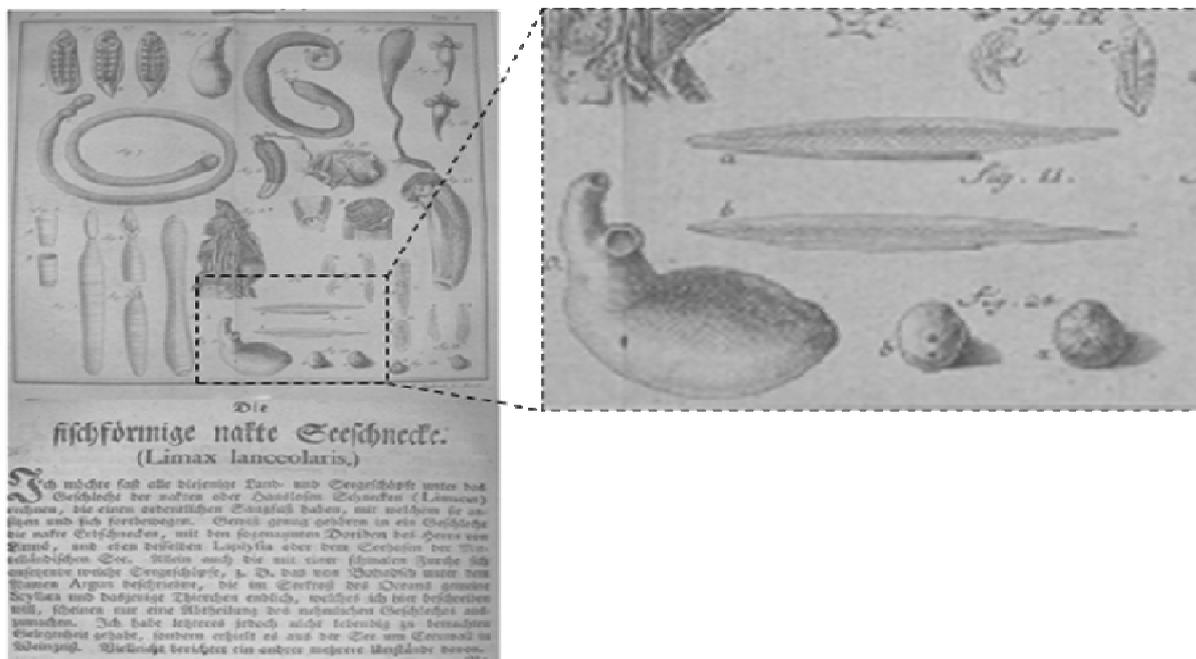


Figure 1 : Première classification de l'amphioxus selon Pallas.

L'amphioxus (ici appelé *Limax lanceolaris*) était classé par Peter Simon Pallas parmi les mollusques (Pallas, 1774).

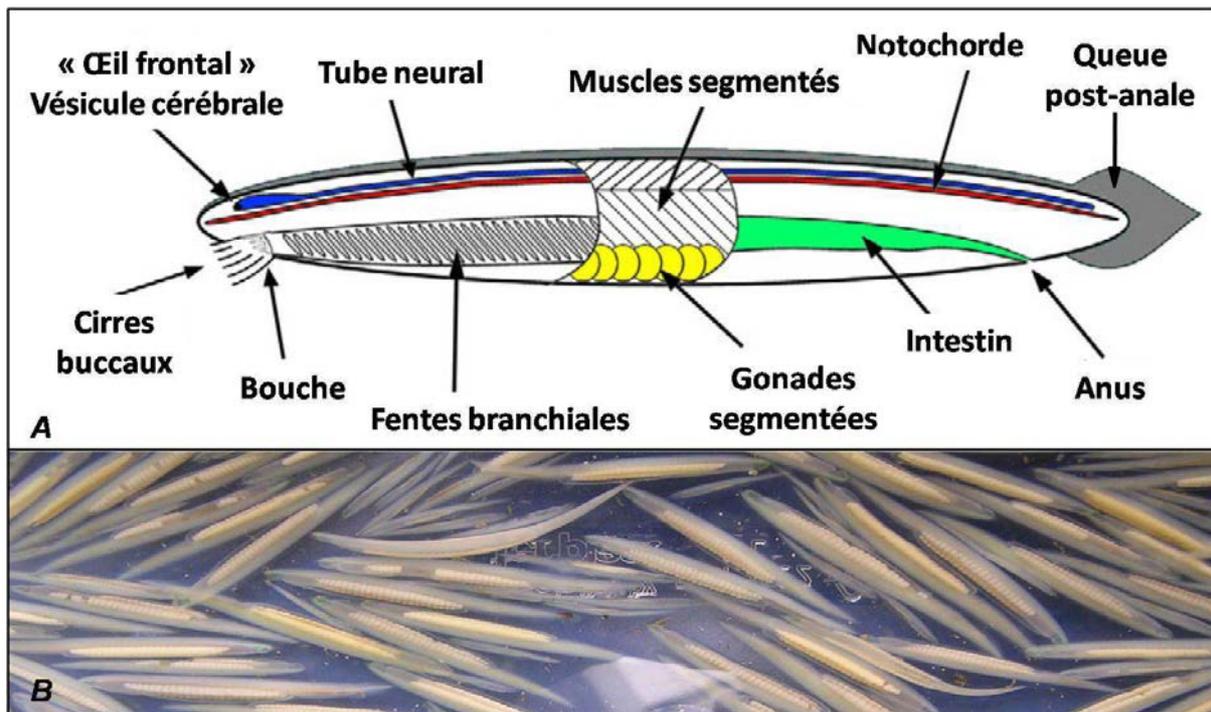


Figure 2 : Anatomie de l'amphioxus.

(A) : Représentation schématique de différents caractères morphologiques chez l'amphioxus adulte. Le tube neural dorsal (en bleu), la notochorde (en rouge), l'intestin ventral (en vert) et les gonades segmentées (en jaune) sont plus particulièrement mis en évidence. D'après (Bertrand et Escriva, 2011). (B) : Amphioxus de l'espèce *Branchiostoma lanceolatum* récoltés sur la côte Vermeille pendant la saison de ponte (France) (Garcia-Fernandez et Benito-Gutierrez, 2009).

Ce sous-embranchement comprend trois genres que sont *Branchiostoma*, *Asymmetron* et *Epigonichthys* (Poss et Boschung, 1996). Comme pour les membres des autres sous-embranchements de chordés, à savoir les urochordés (ou tuniciers) et les vertébrés, les céphalochordés possèdent une notochorde dorsale, un tube neural également dorsal, un pharynx perforé de fentes branchiales, une musculature axiale segmentée, et une queue post-anale (fig. 2). Ils possèdent également des structures homologues à certains organes des vertébrés comme l'endostyle et la fosse préorale qui s'apparentent respectivement à la glande thyroïdienne et à l'adénohypophyse. Cependant, les céphalochordés sont dépourvus de certains caractères propres aux vertébrés (à l'exception des cyclostomes pour certains d'entre eux) comme les organes sensoriels pairs, un squelette interne, les cellules migratrices de la crête neurale ou encore les placodes.

En se basant sur l'étude de leur morphologie générale, que ce soit à l'âge adulte ou au cours de leur développement embryonnaire, les céphalochordés ont longtemps été considérés comme le groupe frère des vertébrés, observations appuyées par la suite par des études moléculaires basées sur de l'ARN (Acide RiboNucléique) ribosomique (Winchell et al., 2002). Mais cette hypothèse fut dans un premier temps remise en question suite à l'identification chez les tuniciers d'une population de cellules migratrices ressemblant fortement aux cellules de la crête neurale des vertébrés (Jeffery et al., 2004), puis dans un second temps par l'obtention et l'étude de grandes quantités de séquences nucléiques d'urochordés et d'amphioxus (Delsuc et al., 2006; Putnam et al., 2008).

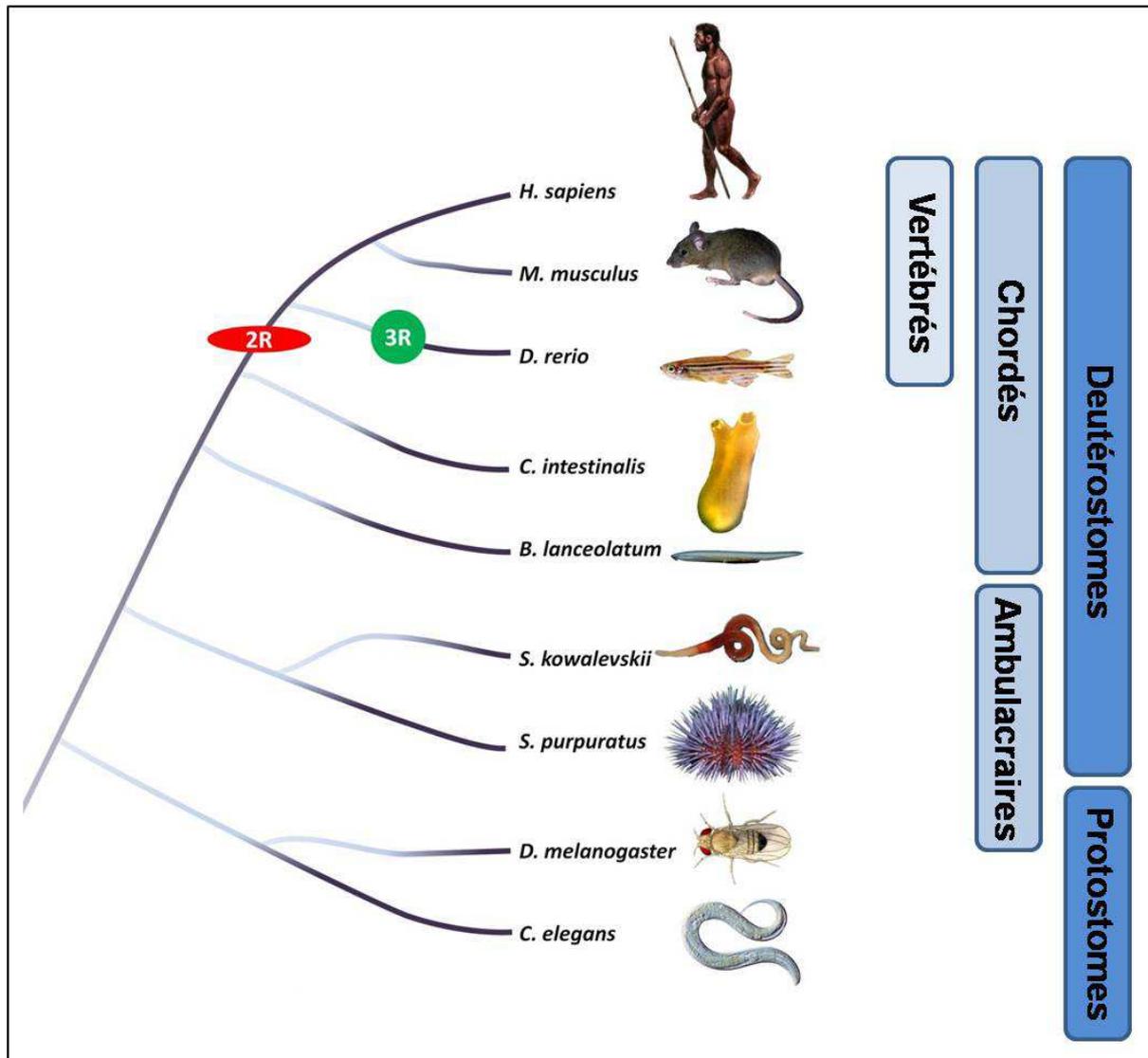


Figure 3 : Arbre phylogénétique schématisé des bilatériens.

L'arbre phylogénétique place l'amphioxus (*B. lanceolatum*) au sein du groupe des deutérostomes, et plus précisément au sein des chordés. Une double duplication du génome (2R) a eu lieu après la divergence des urochordés (*Ciona intestinalis*) et des vertébrés. Une troisième duplication du génome (3R) a eu lieu au cours de l'histoire évolutive des téléostéens.

Ces études récentes ont permis le repositionnement phylogénétique du groupe des céphalochordés comme la lignée ayant divergée le plus précocement au sein du groupe des chordés, en faisant le groupe frère du groupe vertébrés/tuniciers (ou groupe des olfactores) (fig. 3) (Bourlat et al., 2006; Delsuc et al., 2006; Delsuc et al., 2008).

Une étude réalisée par Poss et Boschung en 1996 et basée sur des critères morphologiques a permis de montrer l'existence dans le monde de plus de 23 espèces différentes au sein du genre *Branchiostoma*, ces différentes espèces étant réparties dans l'ensemble des mers tempérées et tropicales du globe (fig. 4) (Poss et Boschung, 1996). Cependant, l'existence d'un si petit nombre d'espèces d'amphioxus reste encore à être confirmée par des analyses moléculaires et non

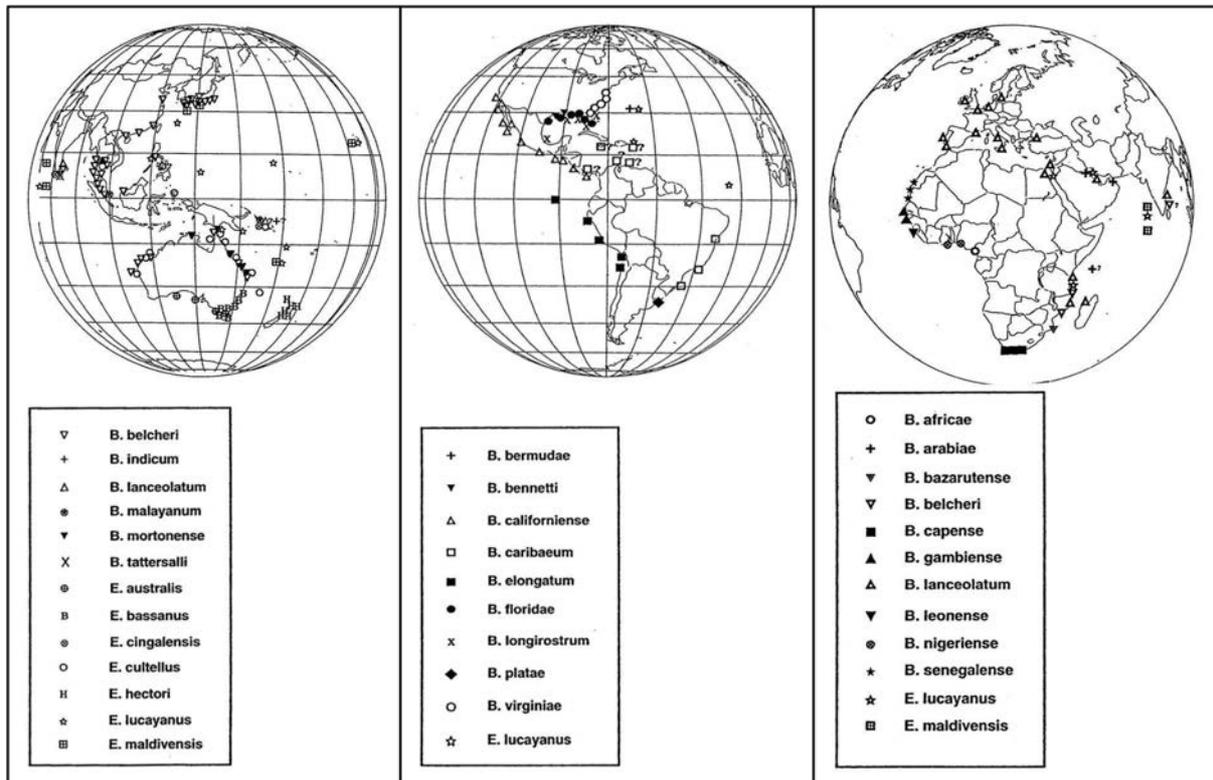


Figure 4 : Localisation des différentes espèces d'amphioxus à travers le monde.

Représentation de la localisation des 23 espèces du genre *Branchiostoma* (B.) et des 7 espèces du genre *Epigonichthys* (E.) dans les mers et océans du globe. D'après (Poss et Boschung, 1996).

uniquement morphologiques. Par exemple *Branchiostoma belcheri*, qui avait été décrite comme une espèce par Poss et Boschung, est aujourd'hui divisée en trois espèces différentes, à savoir *B. belcheri*, *B. japonicum* et *B. tsingtauense* (Xu et al., 2005; Zhang et al., 2006a), et on pourrait s'attendre à une augmentation importante du nombre totale d'espèces lorsque des études moléculaires seront réalisées sur des animaux collectés aux différents lieux décrits dans la littérature.

II - MILIEU DE VIE

L'amphioxus est un animal marin benthique filtreur qui vit enfoui dans les premiers centimètres de sable. Si l'amphioxus est retrouvé de par le monde, que ce soit dans des régions tropicales, subtropicales ou tempérées, il semble néanmoins que sa distribution locale soit définie par un certain nombre de critères communs. Tout d'abord, le type de sédiment semble être important, l'amphioxus vivant préférentiellement dans du sable grossier (Desdevises et al., 2011; Gosselck and Spittler, 1979; Webb, 1958), même si des exceptions ont pu être observées, notamment chez l'espèce américaine *B. floridae* qui vit dans du sable fin ou très fin. Ensuite, la majorité des espèces d'amphioxus sont retrouvées à proximité de la côte à des profondeurs allant de 0,5 mètre à 40 mètres (Desdevises et al., 2011; Gosselck and Spittler, 1979), à l'exception de

l'asymmetron *A. inferum*, retrouvé à une profondeur de 229 mètres (Kon et al., 2007), qui semble néanmoins représenter un cas isolé. La distribution des amphioxus semble également être corrélée aux caractéristiques physico-chimiques du milieu, des changements de températures et de salinité de l'eau pouvant affecter leur cycle de vie (Webb, 1956a; Webb, 1956b; Webb, 1958) et impacter leur localisation entre l'hiver et l'été (Webb, 1958). Enfin, une corrélation négative entre la présence d'amphioxus et la teneur en matière organique a également été observée pour quelques espèces (da Silva et al., 2008; Webb, 1958).

III - REPRODUCTION ET CYCLE DE VIE

Les céphalochordés sont tous gonochoriques et se reproduisent de manière sexuée par fécondation externe à des périodes de l'année bien définies. La durée et la structuration de cette saison de ponte de l'amphioxus est variable en fonction de l'espèce. En effet, la saison de ponte de *B. belcheri* et de *B. lanceolatum* dure de deux à trois mois tandis que *B. floridae* pond de mai à septembre. La saison de ponte pour ces trois espèces est concomitante à l'augmentation de la température de l'eau environnante qui se produit en début de printemps. Cependant, cette période de ponte unique au cours de l'année n'est pas une caractéristique commune chez toutes les espèces d'amphioxus, *A. lucayanum* pond pendant deux périodes distinctes durant environ trois mois, au cours de l'été et de l'automne (Holland et Holland, 2010).

Si les saisons de pontes peuvent être différentes d'une espèce à l'autre, ceci est également le cas en ce qui concerne le comportement de ponte des animaux au cours de la saison, qui va d'une ponte pendant quelques jours proches pour *B. belcheri* à environ une ponte synchronique de toute la population toutes les deux semaines pendant la saison de ponte pour *B. floridae*. A ce jour, outre la température de l'eau ou la durée du jour toutes deux liées à la saison, aucun autre paramètre biotique ou abiotique n'a pu être identifié afin d'expliquer les différences de comportement, à l'exception de *A. lucayanum* pour qui le cycle lunaire semble être un facteur prépondérant dans la structuration du cycle de ponte, la majorité des individus de cette espèce semblant pondre la nuit précédant la nouvelle lune (Holland et Holland, 2010).

En ce qui concerne la ponte en elle-même, son déroulement semble être commun à toutes les espèces observées. A la nuit tombée, l'amphioxus nage dans la colonne d'eau et y relâche ses gamètes, avant de se laisser retomber doucement jusqu'au fond. Suite à la fécondation, les embryons se développent et restent planctoniques jusqu'à leur métamorphose. Cette période embryonnaire et larvaire est variable en fonction de l'espèce. Ainsi chez *B. lanceolatum* elle dure de deux à trois mois tandis que pour *B. floridae* elle dure deux semaines environ. Lors de la métamorphose, les juvéniles migrent alors vers le sable et deviennent benthiques (Bertrand et Escriva, 2011). En fonction des espèces, la durée de vie des amphioxus est très variable, allant de deux à trois ans pour *B. floridae* (Futch et Dwinell, 1977), à une durée de vie de cinq à huit ans pour *B. lanceolatum* (Desdevises et al., 2011).

IV - LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

A ce jour aucune étude du développement embryonnaire d'espèces du genre *Epigonichthys* n'a été publiée, au contraire des genres *Asymmetron* et *Branchiostoma*. En ce qui concerne *A. lucayanum*, une étude récente rapporte que son développement embryonnaire précoce est similaire à celui des amphioxus du genre *Branchiostoma*, des différences morphologiques n'apparaissant qu'à partir du début du stade larvaire (Holland et Holland, 2010). Pour ces raisons, et puisque l'ensemble de mes recherches a porté sur l'espèce européenne *Branchiostoma lanceolatum*, le développement embryonnaire présenté ci-après correspond à celui du genre *Branchiostoma* pour lequel trois espèces (*B. floridae*, *B. belcheri* et *B. lanceolatum*) sont plus particulièrement utilisées comme modèle d'étude aujourd'hui, et dont le développement embryonnaire est étudié et décrit avec minutie depuis plus de 150 ans (Cerfontaine, 1906; Conklin, 1932; Hatschek, 1893; Kowalevsky, 1867; Kowalevsky, 1876; Wilson, 1892; Wilson, 1893). A noter que les temps de développement qui sont précisés ici correspondent au développement embryonnaire de *B. lanceolatum* à 19°C, d'après Fuentes et collaborateur (Fuentes et al., 2007; Fuentes et al., 2004). De plus, précisons que la terminologie concernant les appellations des différents stades du développement embryonnaire se base sur des conventions plus que sur des états biologiques.

IV.1 - DE LA FECONDATION A LA GASTRULATION

La fécondation a lieu suite de la libération dans la colonne d'eau des gamètes femelles (ou ovocytes) et mâles (ou spermatozoïdes). Cette fécondation consiste en la fertilisation de l'ovocyte par un spermatozoïde unique, provoquant une réaction corticale aboutissant à la formation d'une enveloppe de fertilisation encore appelée chorion, enveloppe permettant entre autre d'éviter une polyspermie et de physiquement protéger l'œuf fécondé (ou zygote) des contraintes physiques extérieures au cours de son développement.

Une fois fécondé, l'œuf entre dans une phase de segmentation appelée phase de clivage. Suite à la première division qui a lieu environ 90 minutes après la fécondation, les blastomères subissent sept divisions synchrones successives permettant à l'embryon d'atteindre le stade blastula (fig. 5B), stade caractérisé par la présence d'un blastocœle. En effet, si l'embryon possède au cours de la phase de clivage une cavité interne communicant avec l'extérieur, le blastocœle est quant à lui défini comme une cavité non communicante avec l'extérieur, cette fermeture étant effective suite au huitième clivage. Au cours du stade blastula, les cellules qui formeront l'ectoderme et le mésendoderme peuvent d'ores et déjà être identifiées. En effet, les cellules du mésendoderme se différencient par leur taille plus importante que celle des cellules de l'ectoderme. Précisons que la définition de ces deux feuillet repose uniquement sur les descriptions morphologiques du développement ainsi que sur l'observation du devenir des différentes cellules par marquage, et non sur des données moléculaires (Holland et Onai, 2012).

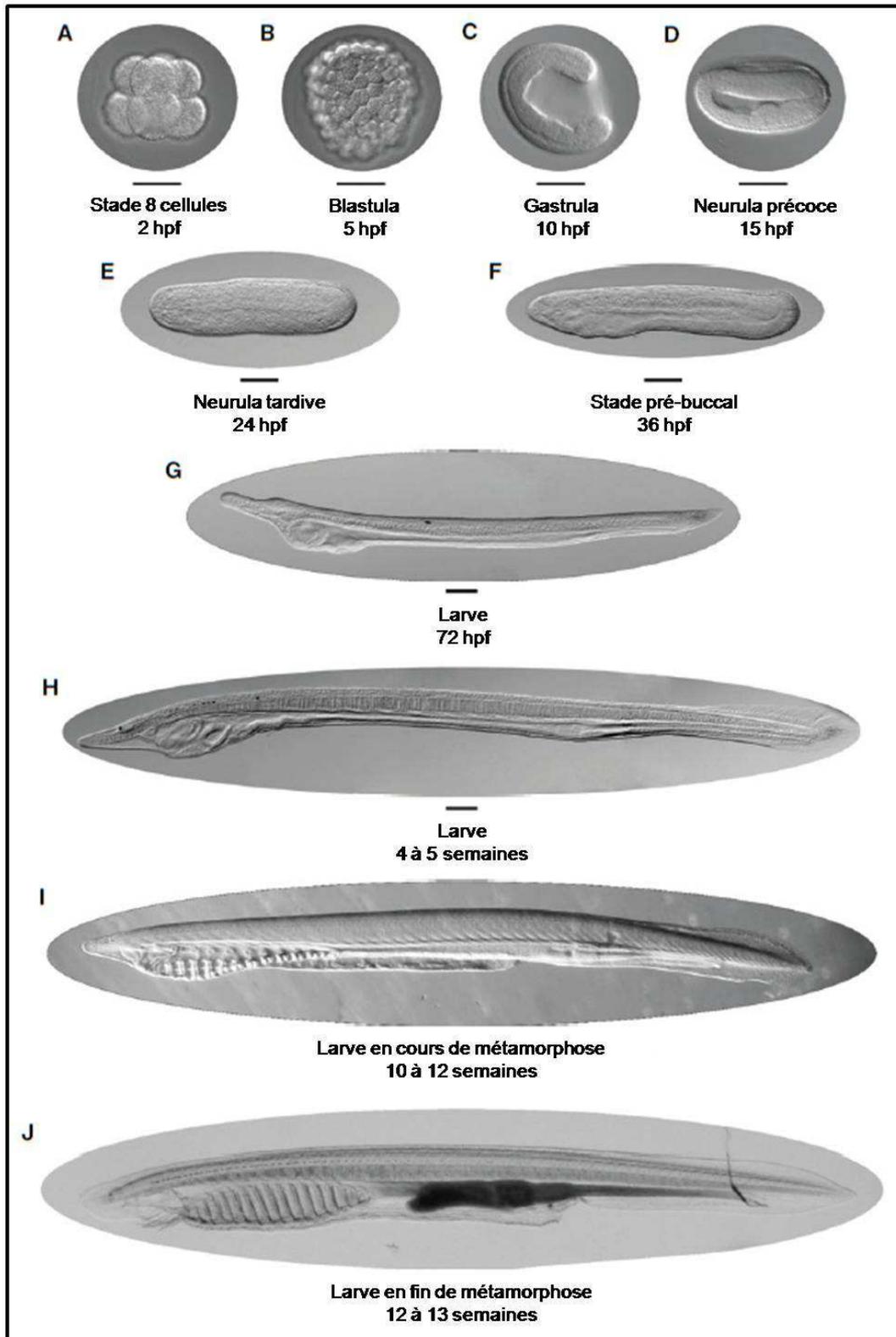


Figure 5 : Développement embryonnaire de l'amphioxus.

Représentation du développement embryonnaire de *B. lanceolatum*. Les temps indiqués sous chaque figure correspondent à un développement à 19°C. (A-B) ; Stades de clivage. (C) : Stade gastrula. (D-F) : Stades de neurulation. (G-J) : Stades larvaires. Barre d'échelle : 50µm. D'après (Bertrand et Escriva, 2011).

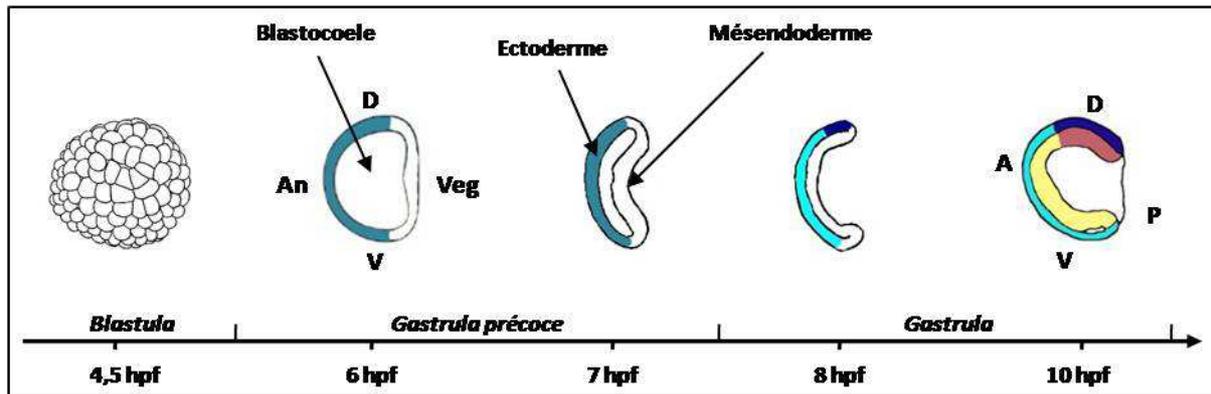


Figure 6 : Représentation schématique de la mise en place des feuilletts embryonnaires au cours de la gastrulation chez l'amphioxus.

L'ectoderme indifférencié est représenté en bleu gris, l'épiderme en bleu clair et le neuroectoderme en bleu foncé. Le mésendoderme est représenté en blanc, le mésoderme en rouge et l'endoderme en jaune. Les différents feuilletts embryonnaires présomptifs ne sont pas représentés pour le stade blastula. A : partie antérieure ; An : pôle animale ; D : partie dorsale ; P : partie postérieure ; V : partie ventrale ; Veg : pôle végétale.

IV.2 - DE LA GASTRULATION A LA NEURULATION

Le début de la gastrulation est marqué par l'aplatissement de la partie mésendodermique de la blastula. La gastrulation est l'étape au cours de laquelle a lieu un mouvement d'invagination de la partie végétale de l'embryon dans le blastocoele, mouvement aboutissant au contact de la partie végétale avec la partie animale de l'embryon. De manière intéressante, seules quelques cellules au niveau des lèvres blastoporales connaissent un mouvement d'involution, la gastrulation chez l'amphioxus étant essentiellement une invagination de l'hémisphère végétal sans mouvement cellulaire associé (Zhang et al., 1997).

La gastrula (fig. 5C, 6) consiste alors en deux feuilletts chacun constitué d'une couche cellulaire unique : le feuillet interne qui donnera par la suite l'endoderme en partie ventrale et le mésoderme en partie dorsale ; et le feuillet externe qui est l'ectoderme, qui donnera par la suite deux tissus distincts qui sont antérieurement et ventralement l'épiderme, et dorsalement la plaque neurale, encore appelé neuroectoderme (ou neurectoderme).

Depuis la fertilisation de l'ovocyte et jusqu'au stade gastrula, le développement de l'embryon s'apparente fortement à celui des deutérostomes invertébrés, en particulier la gastrulation elle-même qui consiste en l'invagination d'une partie de la blastula au sein du blastocoele. Cependant le stade gastrula peut être considéré comme un stade de transition vers un développement embryonnaire proche de celui des vertébrés, la fin de ce stade correspondant au début de la formation de structures propres aux chordés comme par exemple la notochorde, le tube nerveux dorsal ou encore les somites.

IV.3 - DE LA NEURULATION AU STADE LARVAIRE

La transition entre la fin du stade gastrula et le début de ce qui est conventionnellement appelé le stade neurula précoce peut être considérée comme le moment à partir duquel a lieu

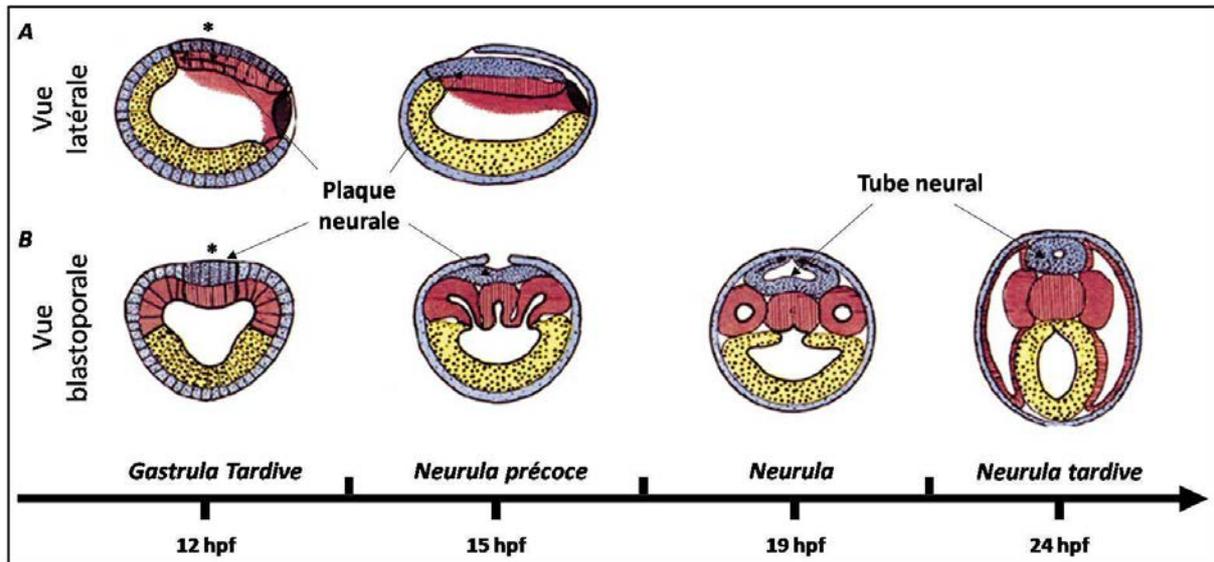


Figure 7 : Représentation schématique de la neurulation chez l'amphioxus.

Vue latérale (A) et blastoporale (B) de l'embryon au cours de la neurulation. L'épiderme et le neuroectoderme sont représentés en bleu. Le mésoderme axial (indiqué par une flèche) et le mésoderme paraxial (indiqué par des têtes de flèches) sont représentés en rouge. L'endoderme est représenté en jaune. L'astérisque indique l'aplatissement de la partie dorsale de l'embryon. La zone représentée en noir indique le blastopore en fermeture. D'après (Langeland et al., 1998).

l'aplatissement de la partie dorsale de l'ectoderme, c'est-à-dire de la plaque neurale. Ce stade est marqué par un certain nombre d'évènements majeurs. D'une part, il se produit une modification importante de l'architecture de l'embryon au niveau de l'ectoderme, la partie épidermique de celui-ci se sépare de la plaque neurale avant de fusionner dorsalement, tandis que la plaque neurale entame un repliement sur elle-même, les bords de la plaque se rapprochant peu à peu avant de fusionner pour former un tube neural creux (fig. 7). D'autre part, le mésoderme dorsal se différencie en trois zones distinctes : le mésoderme en position médiane (ou mésoderme axial), tissu présomptif de la notochorde, et le mésoderme paraxial qui se développe de part et d'autre du mésoderme axial et qui formera les somites antérieures. Simultanément, le blastopore commence à se refermer postérieurement, fermeture accompagnée du développement de l'embryon par élongation postérieure à partir des tissus présents autour du blastopore (ou lèvres blastoporales), élongation se poursuivant jusqu'au stade larvaire.

Il est en outre possible de considérer que le stade neurula (conventionnellement subdivisé en trois stades que sont les stades neurula précoce, moyenne et tardive) se termine lorsque les premiers signes d'élargissement de l'endoderme dans la région pharyngienne sont visibles, stade de développement embryonnaire appelé de ce fait stade pré-buccal (*premouth* en anglais) (fig. 5F). A ce stade, un certain nombre de structures tels que le pharynx, la bouche ou encore le tube digestif commencent (ou ont commencé) à se mettre en place. Une fois ces structures formées l'amphioxus atteint le stade larvaire qui dure deux à trois mois (en ce qui concerne *B. lanceolatum*). Pendant cette période, de nouvelles fentes branchiales se forment jusqu'à la métamorphose (qui se produit chez *B. lanceolatum* lorsque les fentes branchiales sont au nombre de 13 à 15). La larve montre une asymétrie claire, avec la bouche ouverte du côté gauche, les fentes branchiales localisées de manière

ventro-latérale à droite, et l'ensemble des somites du côté gauche positionné une demi-somite plus rostral que celles du côté droit (fig. 5F-H).

La métamorphose est associée à des modifications morphologiques importantes : la bouche située à gauche chez la larve devient axiale, les fentes branchiales se dédoublent formant deux rangées dans un premier temps, une des rangées migrant par la suite du côté gauche. De plus, les métapleures se développent et recouvrent le pharynx formant ainsi l'atrium. De même, l'intestin se régionalise et l'on voit apparaître un caecum hépatique.

V - INTERET DE L'AMPHIOXUS COMME MODELE BIOLOGIQUE

Comme nous l'avons vu précédemment, l'amphioxus a récemment vu sa position phylogénétique revisitée (Boore et al., 1999; Delsuc et al., 2006; Delsuc et al., 2008), faisant de la lignée des céphalochordés la lignée ayant divergée le plus précocement au cours de l'évolution du groupe des chordés. Ceci étant, bien que cette position phylogénétique face de l'amphioxus un modèle de choix afin de répondre à un certain nombre de questions relatives à l'évolution des organismes au sein des deutérostomes, il est nécessaire de définir en quoi l'amphioxus peut-être considéré comme un bon « proxy » de l'ancêtre commun des chordés.

V.1 - DONNEES PALEONTOLOGIQUES

Tout d'abord, un certain nombre de données paléontologiques permettent de penser que l'amphioxus est morphologiquement proche de l'ancêtre des chordés. Prenons le cas des trois types de fossiles les plus importants concernant la compréhension de l'évolution des chordés et des premiers vertébrés, fossiles datant d'environ 520 millions d'années (le fossile de Burgess Shale *Pikaia gracilens*; les euconodontes; et les fossiles des dépôts du cambrien inférieur du site de Chengjiang en Chine, en particulier *Yunnanozoon*, *Haikouella*, *Haikouichthys* et *Myllokunmingia*) (fig. 8) (Schubert et al., 2006). Bien qu'encore aujourd'hui la position phylogénétique de ces fossiles soit débattue, la comparaison de leurs caractères morphologiques nous renseigne néanmoins sur la probable organisation corporelle de l'ancêtre des chordés. De manière intéressante, il apparaît que la morphologie de cet organisme ait été très proche de celle de l'amphioxus.

V.2 - DONNEES GENOMIQUES

Si les informations fournies par l'étude comparative de ces fossiles et des chordés et/ou deutérostomiens vivants permettent de penser que la morphologie de l'amphioxus ressemble fortement à celle de l'ancêtre des chordés, l'amphioxus semble aussi être un bon proxy de l'ancêtre des chordés d'un point de vue génomique.



Figure 8 : Photographie de fossiles du Cambrien.

(A) : fossile de *Yannanozoon lividum*, découvert en 1984 sur le site Chengjiang en Chine. (B) : fossiles de *Haikouella lanceolata*. Barre d'échelle : 1cm. Collection du Professeur Jun Yuan Chen. D'après (Bertrand et al., 2007). (C) : fossile de *Pikaia gracilens* provenant des schistes de Burgess. D'après (Long, 1995). Les différentes photographies ne sont pas à l'échelle.

http://www.fossilmuseum.net/Fossil_Galleries/Chengjiang/Yannanozoon_lividum/Yannanozoon_lividum.htm

Susumo Ohno proposa qu'au cours de l'histoire évolutive des vertébrés aient eu lieu deux duplications complètes du génome (Ohno, 1970). Cette hypothèse appelée 2R a récemment été confirmée (Dehal et Boore, 2005; Putnam et al., 2008). Bien que le moment exact de ces deux duplications du génome au cours de l'évolution des vertébrés soit encore débattu, l'ensemble des gnathostomes possède un génome dupliqué deux fois (trois fois dans le cas des téléostéens qui ont connu au cours de leur propre histoire évolutive une duplication supplémentaire de leur génome (Jaillon et al., 2004; Meyer et Schartl, 1999; Taylor et al., 2003)) par rapport aux céphalochordés ou aux tuniciers. Ainsi, de manière schématique, s'il existe une copie d'un gène donné dans le génome de l'amphioxus, il existe entre un et quatre gènes orthologues dans le génome d'un vertébré donné (entre un et six gènes dans le cas des téléostéens) (ces gènes étant des paralogues entre eux). Ceci a deux implications majeures concernant l'utilisation de l'amphioxus comme modèle. Tout d'abord, le génome de l'amphioxus, de par ce caractère non dupliqué, devrait être plus proche de celui de l'ancêtre des chordés que le génome des vertébrés. Ensuite, d'un point de vue pratique, l'absence de redondance génique, en comparaison à ce qui existe chez les vertébrés, rend les études sur la fonction spécifique des gènes plus simple chez l'amphioxus.

En 2008, la première séquence complète d'un génome d'amphioxus (*B. floridae*) fut publiée (Putnam et al., 2008). A partir de l'étude de ce génome et de la comparaison de son contenu génique avec celui d'autres métazoaires, il a été proposé que le génome de l'amphioxus soit peu dérivé. Ainsi, pour chaque famille de gènes étudiée jusqu'à aujourd'hui, l'amphioxus contient une copie de chaque membre de la famille tandis que les autres lignées de métazoaires (protostomiens ou deutérostomiens) présentent toujours des pertes de certains membres. Il est possible de prendre comme exemples de cette extrême conservation génique les superfamilles des gènes à homéoboite, des récepteurs nucléaires, ou des gènes codant pour des protéines à domaines tyrosine kinase (Bertrand et al., 2011a; D'Aniello et al., 2008; Paps et al. 2012). Cependant, et malgré cette grande conservation du contenu génique chez l'amphioxus, nous ne devons pas oublier que son génome a aussi évolué spécifiquement. Par exemple, des duplications spécifiques ont eu lieu au cours de l'évolution de la lignée, comme pour les gènes *Hox* au nombre de 15 (Wada et al., 1999) ou les gènes *AANAT* (arylalkylamine N-acétyltransférase) au nombre de 7 (Pavlicek et al., 2010).

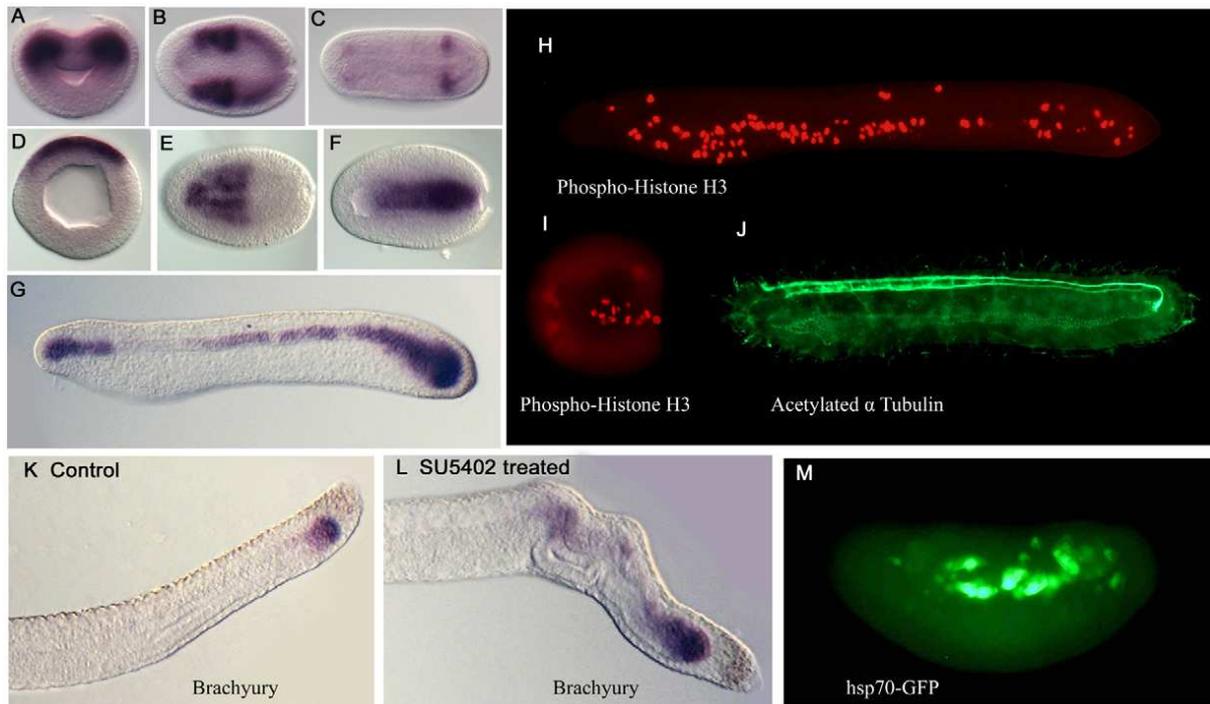


Figure 9 : Illustration de techniques expérimentales disponibles chez l'amphioxus (*B. lanceolatum*).

(A-G ; K-L) : Patrons d'expression par hybridation *in situ* des gènes *Delta* (A-C), *Neurogenin* (D-E), *Netrin* (F), et *Brachyury2* (G, K et L) aux stades de développement embryonnaire neurula précoce (A-B), neurula tardive (C), gastrula (D), neurula (E), pré-buccal (G) et larve (K-L). (K-L) : Exemple de modification de la morphologie et du patron d'expression de *Brachyury2* suite à un traitement (ici par l'inhibiteur de la voie de signalisation FGF, le SU5402) entre l'embryon contrôle (K) et l'embryon traité (L). (H, I, J) : Exemple de marquage par immunohistochimie de la protéine Histone H3 phosphorylée (H-I), de l' α -tubuline acétylée (J) aux stades de développement pré-buccal (H-J) et gastrula (I). (M) : Amphioxus transgénique obtenu par microinjection d'un plasmide rapporteur (p339_hsp70-GFP).

V.3 - MAITRISE TECHNIQUE DU MODELE ANIMAL

L'amphioxus en tant qu'outil biologique pour les études en Evo/Devo offre depuis peu de temps un certain nombre de facilités techniques. La première est l'accès relativement aisé aux animaux adultes de différentes espèces, les quantités d'animaux présents sur leurs sites respectifs permettant des collectes abondantes (Desdevises et al., 2011). De plus, ces animaux peuvent facilement être maintenus en laboratoire, ceci facilitant leur utilisation sur l'ensemble de l'année (Benito-Gutierrez et al., 2013; Li et al., 2013).

Un autre aspect important de ce modèle est la possibilité d'obtenir un grand nombre d'embryons, une femelle pouvant pondre jusqu'à environ 5000 ovocytes. Cependant, l'obtention de manière contrôlée des embryons reste encore une difficulté majeure pour deux des trois espèces communément utilisées. En effet, l'induction de la ponte n'est pas maîtrisée pour *B. belcheri*. Il est possible d'induire la ponte des adultes chez *B. floridae* au travers d'un choc électrique. Cependant, ceci ne fonctionne que les jours de ponte naturelle (c'est-à-dire une fois toutes les deux semaines). Enfin, pour *B. lanceolatum*, l'espèce d'amphioxus nous concernant plus particulièrement, une méthode permettant d'induire la ponte tous les jours pendant la saison de reproduction a été développée dans notre laboratoire. Cette méthode consiste en un changement de température pendant au mois 24 heures avant le jour de ponte (Fuentes et al., 2007; Fuentes et al., 2004). Cette

méthode permet le jour souhaité l'obtention d'un grand nombre d'embryon au stade souhaité, le moment de la fécondation et le développement pouvant être contrôlés.

Si l'étude de patrons d'expression de gènes chez l'amphioxus et la comparaison avec les patrons d'expressions de leur(s) orthologue(s) chez les vertébrés a longtemps été le seul outil permettant de discuter de leurs probables fonctions et de la fonction ancestrale de chacun d'entre eux, de nouvelles méthodes ont été mises au point au cours des dix dernières années. Celles-ci nous permettent aujourd'hui de réaliser des études fonctionnelles nécessaires à une meilleure compréhension des mécanismes complexes contrôlant le développement embryonnaire. Tout d'abord, il est possible de cibler certaines voies de signalisation à l'aide de molécules capables de les activer ou de les inhiber. Nous pourrions citer les voies BMP, FGF, Nodal, acide rétinoïque ou encore Wnt/ β -caténine. L'étude de la fonction de gènes cibles est également possible en utilisant la microinjection de morpholinos ou d'ARNm dans la cellule œuf non fertilisée, ceci afin de respectivement bloquer ou augmenter leur expression. L'immunohistochimie est également une technique de plus en plus accessible car plusieurs anticorps ont été identifiés comme fonctionnant chez l'amphioxus (fig. 9). Cependant, de la même manière que l'induction de la ponte ne fonctionne que chez *B. lanceolatum*, d'autres techniques, comme par exemple l'injection de morpholinos ne fonctionne que chez *B. floridae*. C'est pourquoi une partie importante des efforts de différents laboratoires est encore dirigée au développement technique chez les différentes espèces d'amphioxus

VI - CONCLUSION

La position phylogénétique ainsi que les données paléontologiques, génomiques, d'anatomie comparée ou de comparaison de patrons d'expression de gènes au cours du développement embryonnaire, ont fait de l'amphioxus un modèle unique pour l'étude et la compréhension de l'apparition et de l'évolution des vertébrés. Beaucoup d'informations convergent et portent à croire que l'amphioxus est un très bon « proxy » de l'ancêtre commun des chordés. Bien évidemment, et pour reprendre les mots de Hufton et collaborateurs « *l'amphioxus n'est pas ancestral mais a dérivé de l'ancêtre des chordés à bien des égards* » (Hufton et al., 2008).

Ainsi, l'amphioxus semble aujourd'hui être un modèle de choix dans le but d'étudier l'évolution des mécanismes développementaux au cours de différentes transitions évolutives majeures, que ce soit la transition ambulacraires/chordés, ou la transition chordés invertébrés/vertébrés.

En dehors des études portant sur des aspects évolutifs, c'est-à-dire l'utilisation de l'amphioxus en tant que modèle comparatif, les céphalochordés semblent également pouvoir être d'excellents modèles dans le but de mieux comprendre des mécanismes développementaux complexes chez les vertébrés, et ceci en raison de leur génome "non-dupliqué", de leur relative simplicité anatomique et développementale et de leur proximité avec les vertébrés.

Introduction

Partie II : L'induction neurale

SOMMAIRE

Partie II : L'induction neurale

I -	Induction neurale.....	19
I.1 -	Définition et concept	19
I.2 -	Etablissement des concepts d'induction neurale et d'organisateur	19
II -	Induction neurale et « modèle par défaut »	21
II.1 -	Le « modèle par défaut » : historique	21
II.2 -	Le « modèle par défaut » : fondements moléculaires.....	22
II.3 -	Le « modèle par défaut » précisé : rôle central du signal BMP	24
II.4 -	Le « modèle par défaut » : un modèle contesté.....	24

I - INDUCTION NEURALE

I.1 - DEFINITION ET CONCEPT

En biologie du développement, une induction est définie suivant les termes de John Gurdon comme « ... *une interaction entre un tissu (inducteur) et un autre tissu (induit), ayant pour effet que le tissu induit subit un changement d'instruction de sa différenciation* » (Gurdon, 1987). Autrement dit, au cours du développement embryonnaire, une induction consiste en un changement d'identité d'une cellule ou d'un tissu suite à la réception de signaux émanant de son environnement.

Le phénomène d'induction neurale est l'un des premiers phénomènes d'induction au cours du développement embryonnaire des vertébrés et correspond à la première étape de mise en place du système nerveux central, c'est-à-dire à l'acquisition par certaines cellules de l'embryon d'un devenir neural. Plus précisément, ce mécanisme consiste en la mise en place d'une plaque neurale qui elle-même est par la suite à l'origine de la formation du tube neural qui formera le cerveau et la moelle épinière chez les vertébrés. On notera la différence importante existant entre la spécification et la détermination des cellules. La spécification correspond au début de la différenciation des cellules, celles-ci ayant reçu des signaux définissant leur devenir qui peut cependant être modifié, tandis que la détermination correspond à un état cellulaire pour lequel le programme de différenciation est irréversible.

I.2 - ETABLISSEMENT DES CONCEPTS D'INDUCTION NEURALE ET D'ORGANISATEUR

A l'aide de techniques de greffes sur des embryons de grenouille (*Rana pipiens*), Warren Lewis observa que lorsque la lèvre blastoporale dorsale d'un embryon débutant la gastrulation est greffée sur un embryon hôte, il y a formation d'un second axe de développement, axe possédant une notochorde, des somites et un tube neural. Cependant, il interpréta la formation du second axe comme une différenciation du greffon lui-même (Lewis, 1907).

Ce n'est qu'en 1924 que le concept d'induction neurale fut proposé par Hilde Mangold et Hans Spemann qui, au travers de leurs expériences de lignages cellulaires et de greffes, établirent que la formation du tissu neural est un phénomène induit. En effet, en s'appuyant sur les observations de Warren Lewis et en utilisant des embryons de salamandre différemment pigmentés, Mangold et Spemann purent observer que la notochorde du second axe de développement est issue de la lèvre blastoporale dorsale greffée, contrairement aux somites et aux tissus neuraux qui eux sont issus des cellules voisines de l'ectoderme de l'hôte (Fig. 10) (Spemann et Mangold, 1924).

Cette observation confirmait alors le concept d'induction neurale comme une interaction informative

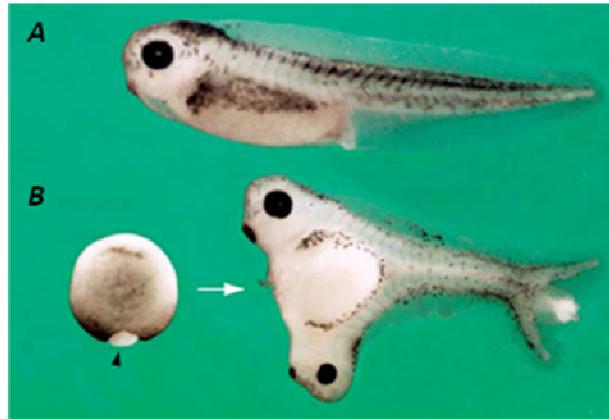


Figure 10 : Reproduction de l'expérience de Hilde Mangold et Hans Spemann chez *Xenopus laevis*.

(A) : têtard de xénope. (B) : à gauche est représenté l'embryon au stade gastrula précoce. La tête de flèche indique la lèvre blastoporale greffée ; à droite l'embryon siamois résultant de la greffe. D'après (De Robertis et Kuroda, 2004).

entre la lèvre blastoporale et l'ectoderme voisin, cette interaction aboutissant à l'induction de la formation du système nerveux. De plus, Hans Spemann montra quelques années plus tard que la lèvre blastoporale dorsale est l'unique partie d'un embryon qui une fois greffée n'adopte pas l'identité des cellules l'avoisinant, mais au contraire garde son identité propre pour se différencier en structure dorsale (Spemann, 1938), observation confirmant la nature induite du tissu neural lors des greffes de l'organisateur au niveau de l'ectoderme.

La lèvre blastoporale dorsale étant essentielle pour le contrôle du développement de l'embryon, ou tout du moins de la partie dorsale de l'embryon, elle fut nommée « organisateur » par Spemann. La communauté scientifique travaillant sur les amphibiens la renomma par la suite « organisateur de Spemann ». Des structures organisatrices homologues furent identifiées chez d'autres vertébrés, comme le bouclier chez les téléostéens (Luther, 1935; Oppenheimer, 1936a; Oppenheimer, 1936b), le nœud de Hensen chez les oiseaux (Hunt, 1929; Waddington, 1930; Waddington, 1932; Waddington, 1933) ou encore le nœud chez les mammifères (Waddington, 1932; Waddington, 1934; Waddington, 1936; Waddington, 1937). De manière intéressante, si la greffe de l'organisateur au sein d'un individu de la même espèce est capable d'induire la formation d'un second axe, ceci est également le cas lors de greffe entre les embryons d'animaux de différentes espèces (Blum et al., 1992; Hatta et Takahashi, 1996; Kintner et Dodd, 1991; Knoetgen et al., 1999; Oppenheimer, 1936a; Waddington, 1934), suggérant une conservation des signaux produits par les organisateurs des différentes espèces de vertébrés.

Si les expériences de Spemann et Mangold ont montré que la greffe de l'organisateur est capable d'induire la formation de tissu neural ectopique à partir de l'ectoderme de l'hôte, la question restait entière concernant l'induction du tissu neural endogène ainsi que les mécanismes moléculaires à l'origine de cette induction.

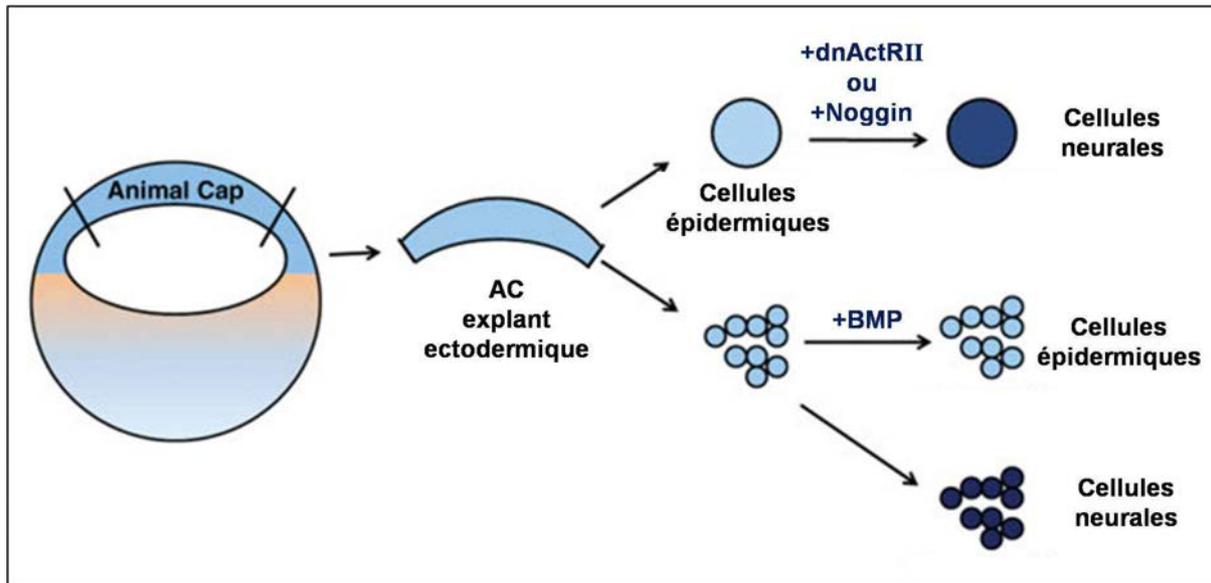


Figure 11 : Représentation schématique d'expériences d'explantation et de dissociation/réagrégation de cellules de tissu ectodermique chez le xénope.

Le devenir cellulaire des explants est symbolisé en bleu foncé lorsque les cellules se différencient en tissu neural, et en bleu clair lorsque celles-ci se différencient en épiderme. AC : Animal Cap ; dnActRII : dominant négatif du récepteur de l'Activine. D'après (Rogers et al., 2009).

II - INDUCTION NEURALE ET « MODELE PAR DEFAUT »

II.1 - LE « MODELE PAR DEFAUT » : HISTORIQUE

Après sept décennies de recherches infructueuses afin d'identifier les signaux permettant la mise en place de la plaque neurale, les premières avancées furent obtenues grâce à des expériences de culture d'explants d'embryons de xénope *in vitro*, c'est-à-dire de prélèvement et de culture *in vitro* d'une partie ou de la totalité d'un tissu de l'embryon.

Ainsi, la culture d'explants permit dans un premier temps de mettre en évidence que quelle que soit la partie de l'ectoderme prélevée puis cultivée, elle se différencie toujours en épiderme, même si la partie de l'ectoderme disséquée possède un devenir neural dans l'embryon complet (Holtfreter et Hamburger, 1955). Ces observations ont permis d'une part de confirmer le caractère induit de l'identité neurale du neuroectoderme et d'autre part de suggérer que l'identité épidermique peut être considérée comme le devenir par défaut de l'ectoderme.

Cependant, d'autres études ont montré que si les cellules de l'ectoderme prélevées au niveau de l'hémisphère animal (c'est-à-dire de l'ectoderme possédant en partie un devenir neural) sont dissociées pendant une courte durée avant d'être réagrégées, ceci entraîne la formation de tissu neural (Fig. 11) (Godsave et Slack, 1989; Grunz et Tacke, 1989; Sato et Sargent, 1989). Cette expérience suggère, au contraire de la première, que le devenir par défaut de l'ectoderme serait neural mais qu'un signal présent dans l'ectoderme induit sa différenciation en épiderme. Au cours de

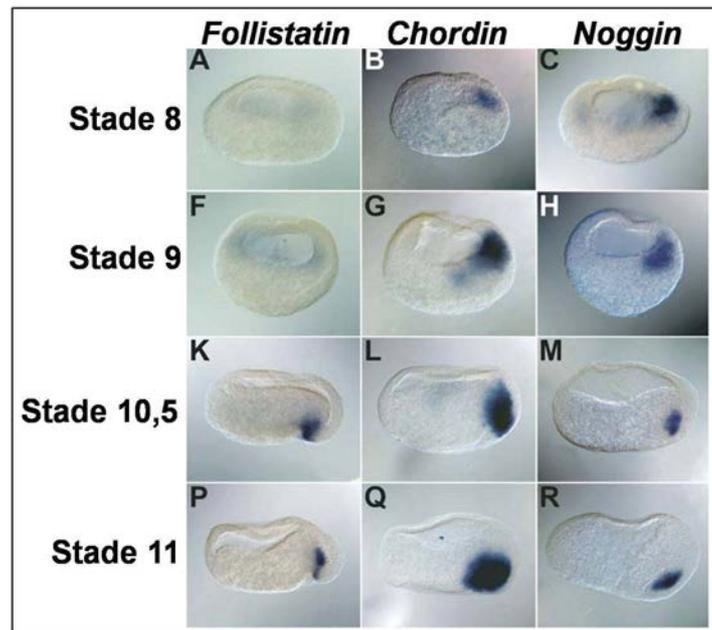


Figure 12 : Expression de *Chordin*, *Noggin* et *Follistatin* aux stades blastula et gastrula chez le xénope.

Les embryons de xénope ont été coupés en deux (coupe sagittale) et l'expression de *Follistatin* (A, F, K et P), de *Chordin* (B, G, L et Q) et de *Noggin* (C, H, M et R) a été analysée par hybridation *in situ* aux stades de développement 8, 9, 10,5 et 11. D'après (Khokha et al., 2005).

cette expérience, ce serait donc la dissociation des cellules qui entraîne une dilution de ce signal, permettant que les cellules adoptent leur identité par défaut (i.e. leur identité neurale). Cette observation fut confirmée par l'expérience consistant à ajouter un surnageant concentré d'ectoderme aux cellules réagrégées après dissociation. Dans ce cas, on observe une inhibition de la différenciation en tissu neural, les cellules formant alors de l'épiderme (Grunz et Tacke, 1990). Ces expériences furent les premières à suggérer que la mise en place du tissu neural chez les vertébrés est sous le contrôle d'un mécanisme inhibiteur.

II.2 - LE « MODELE PAR DEFAULT » : FONDEMENTS MOLECULAIRES

L'explosion de la biologie moléculaire dans les années 1990 fut à l'origine de l'identification chez le xénope d'un certain nombre de molécules impliquées dans l'induction neurale, et en premier lieu les molécules *Noggin*, *Chordin* et *Follistatin* (Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Sasai et al., 1994; Smith et Harland, 1992). Ces trois protéines sont produites par l'organisateur au cours de la gastrulation (Fig. 12), et leur surexpression dans des explants ectodermiques entraîne la neuralisation de ce dernier (Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Lamb et al., 1993; Piccolo et al., 1996; Sasai et al., 1995a). De manière intéressante, il fut observé que la séquence protéique de *Chordin* est proche de celle de la protéine de drosophile short gastrulation (*Sog*) (Francois et Bier, 1995), cette protéine ayant été génétiquement identifiée comme un antagoniste de la protéine *dpp* (*Decapentaplegic*) (Ferguson et Anderson, 1992), l'orthologue de *BMP2* et *BMP4* (*Bone Morphogenetic Protein 2 et 4*) de vertébrés, deux membres de la famille des *TGF-β* (*Transforming*

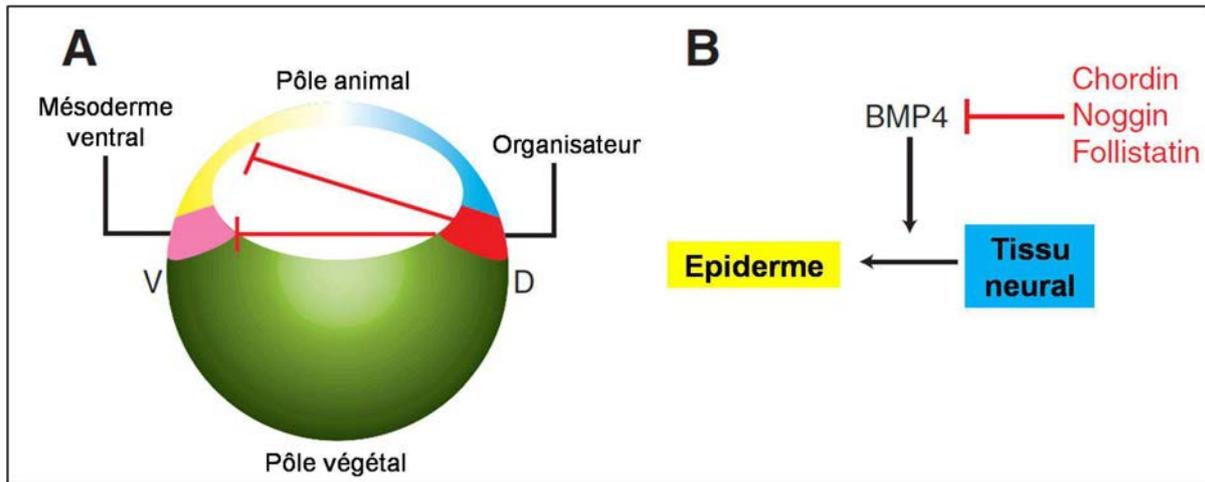


Figure 13 : Représentation schématique du modèle par défaut chez le xénope.

(A) : cartographie au stade blastula des différents territoires présomptifs. L'organisateur est en rouge, le mésoderme ventral en rose, l'endoderme en vert, l'épiderme en jaune et le tissu neural en bleu. L'activité des antagonistes de la signalisation BMP est représentée par les lignes rouges provenant de l'organisateur. (B) : Représentation des interactions moléculaires entre le signal BMP (BMP4) et les antagonistes du signal BMP exprimés par l'organisateur (*Chordin*, *Noggin* et *Follistatin*). V : partie ventrale ; D : partie dorsale. D'après (Stern, 2005).

Growth Factor- β). D'autre part Follistatin, qui lorsqu'elle est surexprimée dans des explants ectodermiques induit du tissu neural, avait été identifiée dans un premier temps comme un inhibiteur de l'Activine, un autre membre de la famille des TGF- β (Nakamura et al., 1990). Il fut également observé que la surexpression d'une version tronquée du récepteur de type II de l'Activine (ActRII) entraîne la différenciation de l'ectoderme en tissu neural (Fig. 11) (Hemmati-Brivanlou et Melton, 1994).

Une vision globale de l'ensemble des résultats permettait alors de proposer que l'ectoderme se différencie en épiderme sous le contrôle d'une substance extracellulaire semblant être diluée lors des expériences de dissociation/réagrégation de cellules. Dans ce contexte, l'induction de tissu neural dans les explants ectodermiques au travers de la surexpression de gènes tels que *Noggin*, *Chordin* et *Follistatin*, serait due à une inhibition du destin épidermique plutôt qu'à un signal pro-neural. De plus, *Noggin*, *Chordin* et *Follistatin* sont exprimés *in vivo* dans l'organisateur (Fig. 12).

Ces observations permirent à Hemmati-Brivanlou et Melton de proposer un nouveau modèle de détermination de l'identité des cellules de l'ectoderme, le « modèle par défaut ». Ce modèle postule qu'en absence de tout signal, le devenir ectodermique est neural. Il existe donc un signal au sein de l'ectoderme lui imposant un devenir épidermique (et inhibant le devenir neural). Finalement, l'inhibition de ce signal pro-épidermique (et anti-neural) au niveau de l'ectoderme dorsal permet à cette partie de l'embryon l'acquisition d'un destin neural (Hemmati-Brivanlou et Melton, 1997).

II.3 - LE « MODELE PAR DEFAUT » PRECISE : ROLE CENTRAL DU SIGNAL BMP

Le modèle par défaut fut par la suite affiné en recherchant les signaux pro-épidermiques par ajout de protéines purifiées aux cellules dissociées de l'ectoderme de gastrula de xénope. Il fut observé dans un premier temps que l'Activine n'était pas capable d'induire du tissu épidermique dans ce contexte (Wilson et Hemmati-Brivanlou, 1995). En se basant sur l'observation que Sog, l'orthologue de Chordin chez la drosophile, est un antagoniste de dpp, orthologue de BMP2/4, l'expérience fut réitérée avec BMP4. BMP4 fut identifié comme un puissant inducteur d'épiderme et un inhibiteur de la neuralisation de l'ectoderme (Fig. 11) (Wilson et Hemmati-Brivanlou, 1995). Il fut montré que d'autres membres de la famille des BMPs tels que BMP2 et BMP7 possédaient également un fort pouvoir pro-épidermique et anti-neuralisant (Suzuki et al., 1997). Enfin, il fut observé que certains membres de la famille BMP possèdent des patrons d'expressions compatibles avec ces activités, en particulier BMP4 qui est exprimé chez le xénope dans tout l'ectoderme au début de la gastrulation, cette expression disparaissant progressivement dans la plaque neurale présomptive (Fainsod et al., 1994; Hemmati-Brivanlou et Thomsen, 1995).

Ces résultats ont montré que le signal BMP a une activité pro-épidermique dans l'ectoderme de l'embryon. Il fut également démontré que l'inhibition du signal BMP entraînait la neuralisation des explants ectodermiques (Hawley et al., 1995; Sasai et al., 1995a; Suzuki, 1995; Xu, 1995), et que BMP4 est également capable de bloquer l'activité inductrice de tissu neurale de Chordin dans les explants ectodermiques (Sasai et al., 1995a), confirmant l'activité anti-neurale de ce signal.

Enfin, il fut définitivement démontré que les molécules Chordin, Noggin et Follistatin sont des antagonistes des BMPs (Fainsod et al., 1997; Piccolo et al., 1996; Zimmerman et al., 1996), mettant ainsi en évidence que l'activité inductrice de ces molécules (notamment dans les expériences d'explants ectodermiques) résultait de l'inhibition de BMP4, observation appuyant le modèle par défaut d'Hemmati-Brivanlou et Melton (Fig. 13).

L'ensemble des résultats concernant la fonction du signal BMP, et plus particulièrement de BMP4, le plaçait alors comme le signal central du déterminisme de l'identité des cellules de l'ectoderme au cours de la gastrulation.

II.4 - LE « MODELE PAR DEFAUT » : UN MODELE CONTESTE

Si la majorité des résultats obtenus jusqu'à lors semblait appuyer le modèle par défaut, les idées d'« inhibition suffisante » et de « devenir par défaut » posaient un problème conceptuel. En effet, ce modèle implique que « *l'état de la cellule observée et l'histoire développementale l'ayant précédée n'important pas* » (Stern, 2005). Pour ces raisons certains chercheurs s'engagèrent sur la voie de l'identification de signaux impliqués dans l'induction de tissu neural. Il résultait de ces recherches un certain nombre d'observations qui ne soutenait pas le modèle par défaut.

La toute première observation allant à l'encontre du modèle par défaut fut une absence d'induction neurale dans des explants ectodermiques de xénope surexprimant *Chordin* ou *Noggin* suite à la microinjection d'un dominant négatif d'un des récepteurs aux FGFs (Launay et al., 1996; Sasai et al., 1996). Cette observation fut la première évidence concernant l'implication d'un autre signal au cours

de l'induction neurale, un signal qui, au contraire du signal BMP, aurait une fonction inductrice de différenciation de l'ectoderme en tissu neural.

La grande majorité des observations avaient été faites jusqu'à lors chez le xénope. Cependant, l'étude de l'induction neurale chez le modèle poulet fut peu de temps après la source d'observations contradictoires avec le modèle par défaut. En effet, il fut entre autre montré qu'une expression ectopique de Chordin au niveau de l'épiderme présomptif n'induit l'expression d'aucun marqueur neural, et que parallèlement la greffe de cellules exprimant BMP4 ou BMP7 au niveau de l'ectoderme à devenir neural ne bloque pas le développement de la plaque neurale (Streit et al., 1998; Streit et Stern, 1999b).

Outre l'identification du signal FGF comme acteur potentiel de l'induction neurale, d'autres voies de signalisation, ou tout du moins d'autres molécules appartenant à d'autres voies de signalisation, ont été identifiés comme participant (directement ou indirectement) à ce mécanisme, remettant en cause la « simplicité » du modèle par défaut.

Le chapitre suivant sera consacré à définir le rôle précis de ces différentes voies de signalisation au cours de l'induction neurale, en s'appuyant sur des études effectuées sur différents modèles animaux.

Introduction

Partie III : Les voies de signalisation impliquées dans l'induction neurale

SOMMAIRE

Partie III : Les voies de signalisation impliquées dans l'induction neurale

I -	Rôle de la voie de signalisation BMP au cours de l'induction neurale.....	28
I.1 -	La voie de signalisation BMP	28
I.2 -	Nécessité et/ou suffisance de l'inhibition du signal BMP au cours de l'induction neurale.....	30
I.2.a -	Détermination de la nécessité de l'inhibition de la voie BMP.....	30
I.2.b -	Détermination de la suffisance de l'inhibition de la voie BMP	34
I.2.c -	Rôle du signal BMP au cours de l'induction neurale – Conclusion générale.....	37
II -	Rôle de la voie de signalisation FGF au cours de l'induction neurale	37
II.1 -	La voie de signalisation FGF.....	37
II.2 -	Implication de la voie de signalisation FGF au cours de l'induction neurale.....	38
II.2.a -	Etude du rôle du signal FGF dans des expériences d'explants et de greffes	38
II.2.b -	Poisson zèbre, induction neurale et signal FGF	41
II.2.c -	Xénope, induction neurale et signal FGF	42
II.2.d -	Poulet, induction neurale et signal FGF	43
II.2.e -	Souris, induction neurale et signal FGF.....	44
II.3 -	Remise en question du rôle du signal FGF : La relation MAPK-Smad.....	44
II.4 -	Rôle du signal FGF indépendamment du signal BMP	46
II.5 -	Réconciliation de l'implication du signal FGF et du modèle par défaut ???.....	47
II.6 -	Le rôle du signal FGF au cours de l'induction neurale – Conclusion générale.....	47
III -	Autres voies de signalisation impliquées au cours de l'induction neurale	48
III.1 -	La voie de signalisation Wnt	48
III.2 -	La voie de signalisation IGF.....	49
III.3 -	La signalisation Notch	49
III.4 -	Le cas de la signalisation Activine/Nodal	49
IV -	Induction neurale chez les tuniciers	50

Dans ce chapitre, je vais m'intéresser à l'aspect moléculaire de l'induction neurale chez les vertébrés, un court paragraphe étant également dédié à l'induction neurale chez les tuniciers. Comme nous le verrons, différentes approches expérimentales ont été utilisées, ces approches ayant en commun l'étude de l'effet de l'activation ectopique ou de l'inhibition de voies de signalisation sur le tissu ectodermique. La première approche expérimentale est l'étude du devenir de l'ectoderme après explantation. La seconde approche est l'étude de la mise en place du tissu neural dans des embryons. Je définirai les expériences sur embryons entiers comme les expériences *in vivo*, en opposition aux expériences d'explantation qui seront définies comme des expériences *ex vivo*.

I - ROLE DE LA VOIE DE SIGNALISATION BMP AU COURS DE L'INDUCTION NEURALE

Comme décrit précédemment, la signalisation BMP a été identifiée comme le signal permettant à l'ectoderme de se différencier en épiderme, ce même signal inhibant la différenciation de l'ectoderme en tissu neural (Wilson et Hemmati-Brivanlou, 1995). Ainsi, le modèle par défaut postule que l'inhibition de ce signal est suffisante à l'induction de la différenciation des cellules de l'ectoderme en cellules neurales. Cependant, un certain nombre de résultats semblent suggérer que cette inhibition n'est pas suffisante. Il est donc nécessaire de mettre en parallèle les différents résultats obtenus afin de mieux définir le rôle du signal BMP au cours de l'induction neurale.

I.1 - LA VOIE DE SIGNALISATION BMP

Les BMPs sont un sous-groupe de protéines extracellulaires de la superfamille des TGF- β . La signalisation des BMPs se fait par fixation à des récepteurs transmembranaires. Ces récepteurs hétérodimériques à activité sérine/thréonine kinase sont constitués d'un récepteur de type I et d'un récepteur de type II. La fixation d'un ligand entraîne l'activation par le récepteur de type II du récepteur de type I qui lui-même active la signalisation intracellulaire. Il existe deux types de signalisation intracellulaire : la signalisation Smad-dépendante, considérée aujourd'hui comme la principale voie de signalisation intracellulaire des TGF- β , et la signalisation Smad-indépendante impliquant entre autre les voies ERK, p38 ou encore JNK (Balemans et Van Hul, 2002; Bragdon et al., 2011; Gazzero et Canalis, 2006).

La signalisation Smad-dépendante consiste en la phosphorylation d'un R-Smad (Regulatory Smad) par le récepteur de type I suite à son activation par le récepteur de type II, après liaison du ligand extracellulaire. Le R-Smad en s'associant à un Co-Smad (Common Smad, Smad4) peut alors être transloqué dans le noyau où il agit en tant que facteur de transcription se liant aux éléments de réponse présents dans les promoteurs des gènes cibles, régulant ainsi leur expression.

Cette signalisation est aussi contrôlée par des facteurs extracellulaires (agissant sur les ligands) ou intracellulaires (agissant sur les protéines Smad). En ce qui concerne les facteurs extracellulaires, il

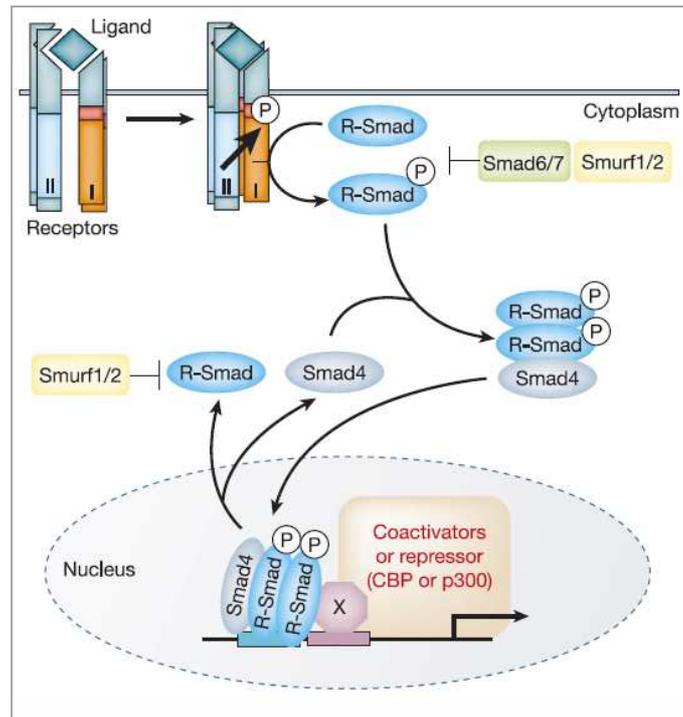


Figure 14 : la voie de signalisation TGF- β Smad-dépendante

Représentation schématique de la signalisation intracellulaire Smad-dépendante induite par la fixation d'un ligand aux récepteurs (Derynck et Zhang, 2003).

existe un certain nombre d'inhibiteurs capables de se fixer aux BMPs et de bloquer leur signalisation. Parmi ces protéines, les plus connues sont Chordin, Noggin et Follistatin (c'est-à-dire les trois premiers inhibiteurs du signal BMP identifiés au cours des études sur l'induction neurale) bien que plus d'une dizaine d'autres inhibiteurs extracellulaires des BMPs aient été identifiés chez les vertébrés (Balemans et Van Hul, 2002; Bragdon et al., ; Gazzo et Canalis, 2006). Quant aux facteurs intracellulaires, I-Smad (Inhibitory Smad, Smad6 et 7) ou Smurf (Smad ubiquitination regulatory factor, Smurf1 et 2) peuvent interférer dans l'association entre le R-Smad et le Co-Smad ou induire la dégradation des récepteurs (Fig. 14) (Hata et al., 1998; Kavsak et al., 2000; Suzuki, 2002).

Au travers des récepteurs de Type I et II, ainsi que de leurs associations, il est possible de définir au sein des TGF- β des sous-groupes distincts comprenant d'une part le groupe des BMPs, activant la signalisation intracellulaire via les Smad1, 5 et 8, et d'autre part, celui des TGF- β /Activine/Nodal, activant la signalisation intracellulaire via les Smad2 et 3 (Fig. 15).

Il est intéressant de noter que si ces deux sous-groupes possèdent une signalisation intracellulaire différente via leurs R-Smad respectifs, il existe tout de même certains acteurs communs à ces deux voies : les Co-Smad (Smad4 et Smad4b) et les I-Smad (Smad6 et Smad7). En effet, si Smad6 semble principalement inhiber la voie de signalisation intracellulaire Smad1/5/8, Smad7 participe à l'inhibition des voies de signalisation intracellulaire Smad1/5/8 et Smad2/3 (Goto et al., 2007; Hanyu et al., 2001; Hata et al., 1998; Ishisaki et al., 1999).

Type II	Type I	R-Smad
BMPRII	ALK-2 (ActRI) ALK-3 (BMP-RIA) ALK-6 (BMP-RIB)	Smad1, Smad5, Smad8
ActRII, ActRIIB ActRIIB	ALK-4 (ActRIB) ALK-7	Smad2 Smad2
TβRII	ALK-5 (TβRI) ALK-1 ALK-2	Smad2, Smad3 Smad1, Smad5
AMHR	ALK-3 ALK-2 ALK-6	Smad1, Smad5

Figure 15 : Signalisation Smad-dépendante activée en fonction des récepteurs des TGF-β impliqués.

Les R-Smad assurant la signalisation intracellulaire sont recrutés en fonction du type d'association de récepteurs de type I et de type II suite à la fixation du ligand. D'après (Derynck et Zhang, 2003).

I.2 - NECESSITE ET/OU SUFFISANCE DE L'INHIBITION DU SIGNAL BMP AU COURS DE L'INDUCTION NEURALE

Si l'implication du signal BMP, et principalement de BMP4, est clairement établie au cours de la différenciation de l'ectoderme en épiderme, l'importance de son inhibition au cours de l'induction neurale ne l'est pas à ce jour.

Afin de définir l'importance de cette inhibition, deux types d'approches expérimentales ont été utilisées afin de répondre à deux questions. I) Est-ce qu'une augmentation du signal BMP (que ce soit par perte de son inhibition, ou par son activation ectopique) est capable d'inhiber l'induction neurale? II) L'inhibition du signal BMP induit-elle du tissu neural ectopique dans des régions de l'ectoderme à devenir épidermique (que ce soit par augmentation de l'expression de ces inhibiteurs, ou par blocage de sa signalisation)?

Si la première approche a pour principal but de chercher à déterminer si l'inhibition du signal BMP est **nécessaire** au cours de l'induction neurale, la seconde a pour but de chercher à montrer si cette inhibition est **suffisante** afin d'induire la mise en place de tissu neural, le modèle par défaut postulant que l'inhibition du signal BMP est **nécessaire** et **suffisante** à l'induction neurale.

I.2.a - Détermination de la nécessité de l'inhibition de la voie BMP

Une des observations fondatrices du modèle par défaut est la perte d'identité épidermique des cellules d'explants ectodermiques après dissociation/réagrégation des cellules chez le xénope. Cette perte d'identité épidermique fut interprétée comme une perte par dilution du signal à l'origine

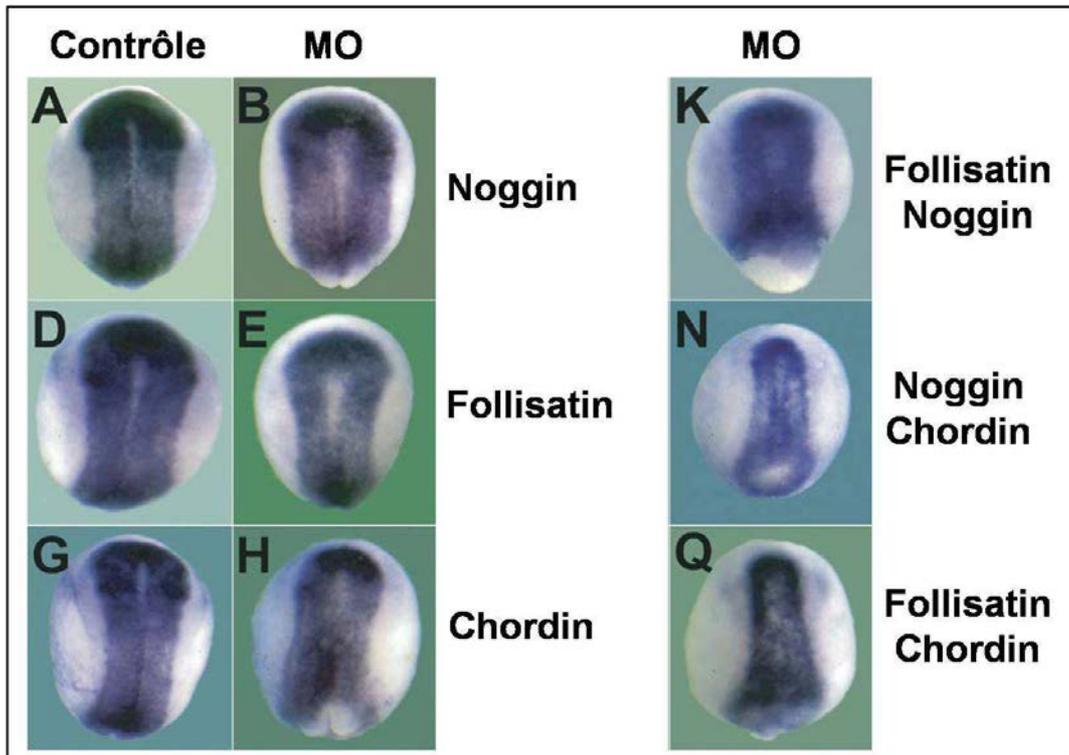


Figure 16 : Effet de la répression de l'expression (knock-down) de *Follistatin*, *Chordin* et *Noggin* sur la mise en place de la plaque neurale chez le xénope.

Analyse par hybridation *in situ* de l'expression du marqueur de la plaque neurale *Sox2* au stade 14-15 suite à la répression de *Follistatin*, *Chordin* et *Noggin* par injection de morpholinos. (A, D et G) : expression de *Sox2* dans les embryons contrôles. (B, E et H) : expression de *Sox2* dans les morphants respectivement de *Noggin*, *Follistatin* et *Chordin*. (K, N et Q) : expression de *Sox2* dans les morphants respectivement de *Follistatin/Noggin*, de *Noggin/Chordin* et de *Follistatin/Chordin*. D'après (Khokha et al., 2005).

de la différenciation en épiderme (à savoir le signal BMP) (Godsave et Slack, 1989; Grunz et Tacke, 1989; Sato et Sargent, 1989). Cette hypothèse fut par la suite confirmée par l'ajout de BMP4 au cours de la dissociation des explants, ceci devenant épidermiques (Fig. 11) (Wilson et Hemmati-Brivanlou, 1995).

In vivo, que ce soit chez le xénope ou chez le poisson zèbre, les expériences de perte de fonction d'antagonistes de BMP induisent une ventralisation de l'embryon. Cette ventralisation est accompagnée d'une perte partielle ou totale de tissu neural (Fig. 16, 17) (Hammerschmidt et al., 1996; Khokha et al., 2005; Schulte-Merker et al., 1997). Cependant, l'augmentation du signal BMP (ou la non inhibition du signal BMP dans la partie dorsale de l'embryon) entraîne dans ces conditions expérimentales la perte (ou la non mise en place) de l'organisateur et de l'ensemble des signaux émis par celui-ci et qui sont nécessaires à la formation des structures dorsales au cours du développement précoce de l'embryon. Ainsi, ce type de résultat ne permet pas de corréler directement l'absence de tissu neural avec une absence d'inhibition du signal BMP. Autrement dit, ces expériences ne permettent pas de dissocier le rôle du signal BMP dans le patterning dorsoventral de son rôle dans l'induction neurale.

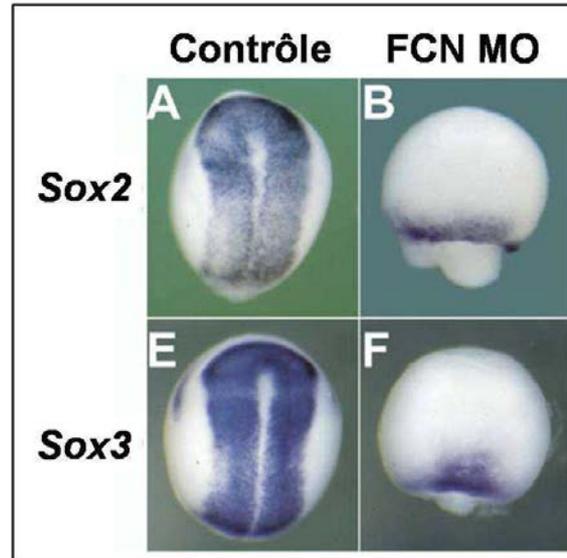


Figure 17 : Effet de la répression conjointe de l'expression de *Follistatin*, *Chordin* et *Noggin* sur la mise en place de la plaque neurale chez le xénope.

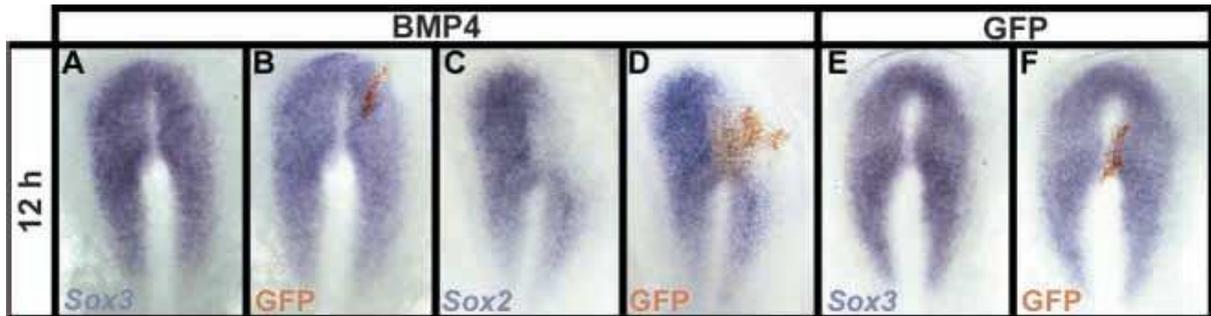
Analyse par hybridation *in situ* de l'expression des marqueurs de la plaque neurale *Sox2* et *Sox3* au stade 14-15 suite à la répression conjointe de l'expression de *Follistatin*, *Chordin* et *Noggin* par injection de morpholinos (FCN MO). (A et E) : expression de *Sox2* et *Sox3* dans les embryons contrôles. (B et F) : expression de *Sox2* et *Sox3* dans les morphants. D'après (Khokha et al., 2005).

Dans le cas de KO (Knock-Out) de *Noggin* (McMahon et al., 1998) et de *Chordin* (Bachiller et al., 2000) chez la souris, aucun défaut lié à une absence d'induction neurale n'est observé. Dans le cas des doubles KO *Noggin/Chordin* (Bachiller et al., 2000), seules les structures neurales antérieures sont perdues. Ces résultats suggèrent que l'inhibition (probablement partielle) du signal BMP au niveau de la plaque neurale présomptive n'est pas nécessaire à la mise en place du tissu neural chez la souris.

Cependant, chez le xénope, si l'inhibition commune de *Chordin*, *Noggin* et *Follistatin* entraîne une forte ventralisation de l'embryon (et une perte presque totale de l'expression des marqueurs neuraux), il est intéressant de noter que l'inhibition unique de chacun d'entre eux ou de deux d'entre eux à la fois n'entraîne pas de perte de la plaque neurale (Fig. 16) (Khokha et al., 2005). Ceci suggère une possible redondance fonctionnelle des inhibiteurs de la voie BMP.

Ainsi, les expériences de KO d'inhibiteurs du signal BMP chez la souris ne permettent pas de conclure quant à la suffisance ou non de l'inhibition de la voie BMP au cours de l'induction neurale, ces KO n'entraînant probablement pas une perte complète de l'inhibition de BMP au niveau de la plaque neurale présomptive.

Comme énoncé précédemment, une des premières observations *in vivo* allant à l'encontre du modèle par défaut est l'absence d'altération de la mise en place de la plaque neurale chez le poulet suite à la greffe d'une source de BMP au niveau de l'aire pellucide (c'est-à-dire de l'ectoderme dit embryonnaire, en opposition à l'aire opaque qui correspond à l'ectoderme extra-embryonnaire) à devenir neural (Streit et al., 1998). Cependant, chez le poulet, des explants de plaque neurale présomptive prélevés avant la gastrulation et mis en culture expriment les marqueurs *Sox2* et *Sox3*,



Figures 18 : Effet de la surexpression de *BMP4* dans la plaque neurale présomptive chez le poulet.

Analyse par hybridation *in situ* de l'expression de *Sox2* (C-D) et *Sox3* (A-B, E-F) après 12 heures de développement suite à l'électroporation de *BMP4* dans l'aire pellucide à devenir neural au stade HH3+ (A-D). Le marquage GFP indique les cellules ayant été électroporées. D'après (Linker et Stern, 2004).

expression perdue suite à un traitement au *BMP4* entraînant une différenciation des explants en épiderme (Wilson et al., 2000). Puisque le signal BMP affecte l'acquisition du devenir neural des explants, il est envisageable que le signal BMP soit bloqué *in vivo* par les inhibiteurs exprimés au niveau du nœud de Hensen.

Notons également que l'électroporation de *BMP4* au niveau de l'ectoderme neural présomptif altère l'expression de *Sox2* mais pas de *Sox3*, suggérant que dans ces conditions expérimentales, le signal BMP n'altère pas l'induction neurale mais en affecte la différenciation (Fig. 18) (Linker et Stern, 2004). Ceci suggère que l'inhibition du signal BMP n'est pas nécessaire au cours de l'induction neurale, mais est nécessaire au maintien de l'identité neurale.

Chez le poisson zèbre, il a été montré que l'augmentation du signal BMP induit une perte de l'expression de *Sox3* dans la partie de l'ectoderme participant par la suite à la formation du prosencéphale et du mésencéphale, mais n'affecte pas son expression dans l'ectoderme plus caudal (Koshida et al., 2002; Kudoh et al., 2004; Rentzsch et al., 2004). Ceci suggère que l'inhibition de BMP n'est nécessaire que dans la partie postérieure de la plaque.

D'une manière générale, une augmentation du signal BMP entraîne une ventralisation des embryons accompagnée de la perte partielle ou totale de tissu neural. Cependant, il semble difficile de dissocier dans ces conditions les effets faisant suite à la ventralisation de l'embryon d'un effet direct du signal BMP au cours de l'induction neurale. De plus, les données obtenues chez le poulet et le poisson zèbre ne suggèrent pas une nécessité de l'inhibition du signal BMP au cours de l'induction neurale. Cependant, ces études n'envisagent pas la possible inhibition (au moins partielle) de l'augmentation du signal BMP par les inhibiteurs endogènes dans le contexte des expériences effectuées.

L'ensemble de ces données permet tout de même de proposer une vision consensuelle de la nécessité de l'inhibition au cours de la formation du tissu neural, que ce soit au cours de l'induction neurale comme chez le xénope, ou plus tardivement au cours de la mise en place et de la régionalisation de la plaque neurale, comme chez le poisson zèbre ou le poulet.

I.2.b - Détermination de la suffisance de l'inhibition de la voie BMP

Dans le but de déterminer si l'inhibition du signal BMP est suffisante pour induire du tissu neural, deux approches sont utilisées. La première approche consiste en l'inhibition globale du signal BMP. La seconde consiste à inhiber le signal BMP dans une région restreinte de l'épiderme.

Inhibition globale du signal BMP

Il a été montré que le devenir épidermique des explants ectodermiques chez le xénope est perdu au profit d'un destin neural lorsque le signal BMP est inhibé (que ce soit par des microinjections préalables de *Noggin*, de *Smad7*, de dominant-négatifs de *BMP4*, de *BMP7* ou des récepteurs *ActRII* ou *Alk3* dans la cellule oeuf) (Hawley et al., 1995; Hemmati-Brivanlou et Melton, 1994; Lamb et al., 1993; Wawersik et al., 2005; Xu, 1995). Chez la souris, lorsque des explants ectodermiques prélevés sur des embryons au stade 7 dpc (*day post coitum* : jour post coït) sont exposés aux protéines Chordin et Noggin, l'expression des gènes neuraux antérieurs *Six3* et *Hesx1* ainsi que l'expression du gène pan-neural *Sox2* augmente (Yang et Klingensmith, 2006). Ces observations appuient l'idée d'une inhibition du signal BMP suffisante pour l'induction neurale.

D'une manière générale, l'augmentation globale de l'expression des inhibiteurs de BMP *in vivo*, en particulier de *Chordin*, *Noggin* et *Follistatin*, entraîne une expansion du territoire neural, liée à une dorsalisation de l'embryon, que ce soit chez le xénope (Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Sasai et al., 1995b; Smith et Harland, 1992) ou chez le poisson zèbre (Furthauer et al., 1999; Miller-Bertoglio et al., 1997). Cette dorsalisation est également observée chez le poisson zèbre suite au traitement à la dorsomorphine, une molécule de synthèse inhibant les récepteurs Alk2, 3 et 6 des BMPs. De plus, un traitement à la dorsomorphine diminue le phénotype ventralisé dû à une perte de l'expression de *Chordin* (Yu et al., 2008b).

La surexpression de formes dominantes-négatives des récepteurs de la voie BMP tel que *tAR* (récepteur de l'Activine de type II tronqué, c'est-à-dire *ActrII* tronqué) ou encore de *tBR* (récepteur de BMP de type I tronqué, c'est-à-dire *Alk3* tronqué) chez le xénope induit une dorsalisation de l'embryon accompagné d'une expansion du territoire neural (Hemmati-Brivanlou et Melton, 1994; Xu, 1995).

De manière intéressante, la microinjection de *Smad5-sbn* (*Smad5 Somitabun*, un *Smad5* muté ne permettant pas la transduction intracellulaire du signal BMP) entraîne également une dorsalisation de l'embryon et une expansion du territoire neural (Hild et al., 1999). Chez la souris, le KO de *Alk3* induit l'expression des marqueurs neuraux antérieurs *Hesx1* et *Six3* et du marqueur pan-neural *Sox1* dans la totalité de l'ectoderme, suggérant que l'inhibition du signal BMP permet la différenciation de cellules à devenir épidermique en tissu neural (Di-Gregorio et al., 2007).

Ainsi, les expériences visant à diminuer globalement le signal BMP *in vivo* ont pour effets une dorsalisation de l'embryon. Si effectivement cette dorsalisation est accompagnée d'une expansion du

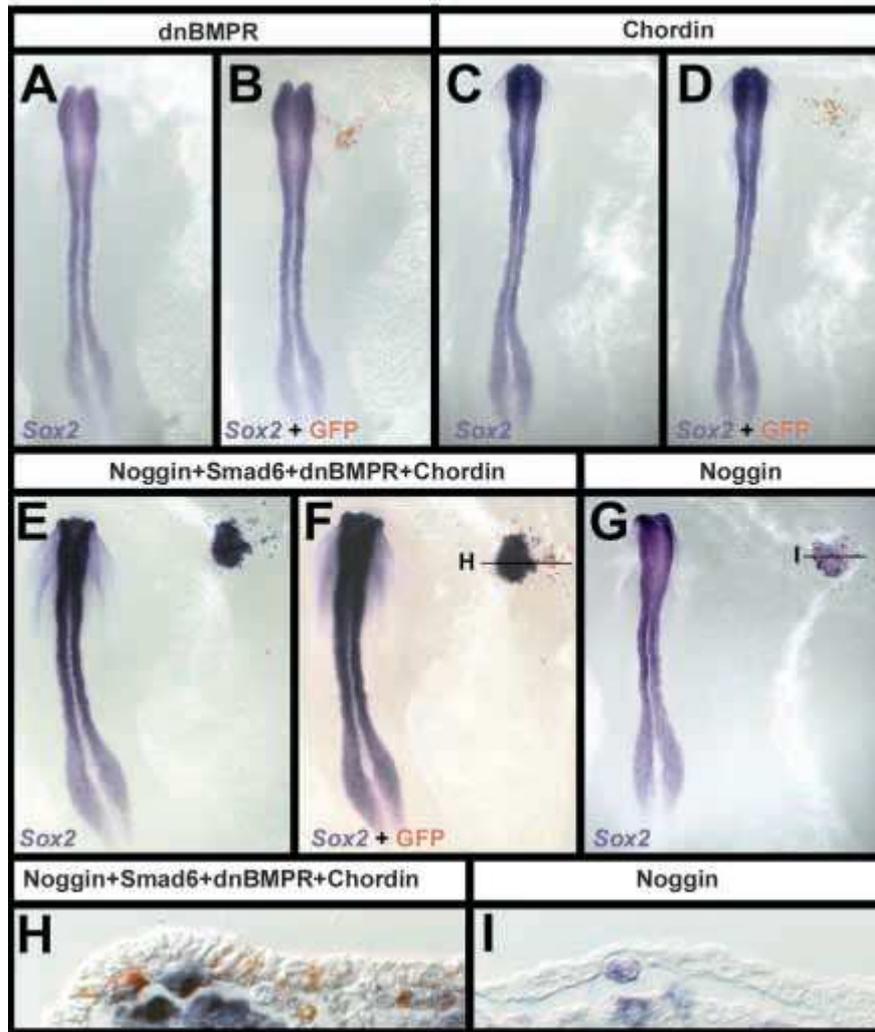


Figure 19 : L'inhibition du signal BMP n'induit pas la formation de tissu neural chez le poulet.

Analyse par hybridation *in situ* de l'expression de *Sox2* suite à l'électroporation de *dnBMPR* (A et B) et *Chordin* (C et D) dans l'aire pellucide, de *Noggin* (G) ou de *Noggin+Smad6+dnBMPR+Chordin* (E et F) dans l'aire opaque au stade HH3+. L'apparente expression suite aux électroporations de *Noggin* (G) et de *Noggin+Smad6+dnBMPR+Chordin* (E et F) correspond à du bruit de fond, l'absence de marquage dans les embryons électroporés *Noggin* et *Noggin+Smad6+dnBMPR+Chordin* étant confirmée par coupe transversale (H et I). Le marquage GFP indique les cellules ayant été électroporées. D'après (Linker et Stern, 2004)

territoire neural, c'est-à-dire de la différenciation en tissu neural de cellules à devenir épidermique, il reste difficile de corréler directement l'absence du signal BMP au niveau de ces cellules avec une induction de la différenciation en cellules neurales.

Inhibition localisée du signal BMP

Chez le poulet, l'application d'une source de *Chordin* au niveau de l'épiderme présomptif n'induit pas l'expression des marqueurs neuraux *Sox2* ou *Sox3*. De la même manière, aucune expression de *Sox3* n'est observée suite à l'application d'une source de *Chordin* au niveau de l'aire

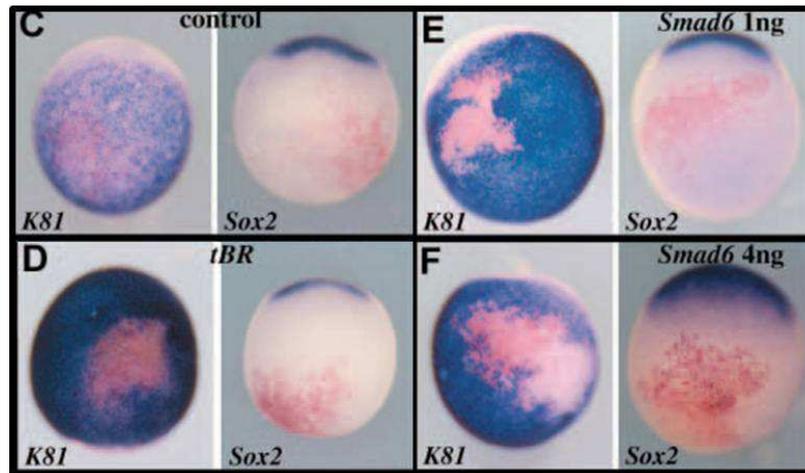


Figure 20 : L'inhibition du signal BMP dans l'épiderme présomptif n'induit pas la formation de tissu neural ectopique chez le xénope.

Analyse par hybridation *in situ* au stade 13 de l'expression du marqueur épidermique *K81* et du marqueur neural *Sox2* dans des embryons microinjectés avec *tBR* (D) ou *Smad6* (E et F) dans une cellule animale ventrale au stade 16 cellules. Les cellules issues de la cellule microinjectée exprime *LacZ*. D'après (Delaune et al., 2005).

opaque. Suite à une greffe du nœud de Hensen pour une courte durée (3 heures) au niveau de l'aire opaque au stade HH3+, aucune expression de *Sox3* n'est observée au stade HH6 (environ 12 heures après). Cependant, si la greffe est remplacée par une source de Chordin, *Sox3* est exprimé dans la zone greffée de l'aire opaque. Ces résultats suggèrent que si Chordin (et donc l'inhibition du signal BMP) n'induit pas la formation de tissu neural, elle participe à son maintien après son induction par d'autres signaux émis par le nœud (Streit et al., 1998). De la même manière, l'inhibition du signal BMP suite à l'électroporation de *dnBMPPR*, *Chordin*, *Noggin*, *Smad6* ou *dnBMPPR/Chordin/Noggin/Smad6* au niveau de l'aire opaque n'induit pas l'expression de *Sox2* (Fig. 19) (Linker et Stern, 2004), confirmant que l'inhibition du signal BMP n'est pas suffisante.

Chez le xénope, afin de découpler le rôle du signal BMP au cours de l'induction neurale de sa fonction de patterning des axes embryonnaires, d'autres approches expérimentales ont été mises en œuvre. L'une d'entre elle consiste à modifier la signalisation de la voie BMP dans un nombre réduit de cellules afin de ne pas impacter le développement général de l'embryon, cellules préférentiellement distantes de la plaque neurale endogène.

Il a ainsi été montré que l'inhibition du signal BMP (par microinjection de *tBR* ou de *Smad6*) au niveau de cellule(s) de l'ectoderme à devenir épidermique entraîne une absence d'expression de *K81* (*Keratin81*) dans les cellules microinjectées, c'est-à-dire un blocage de la différenciation de ces cellules ectodermiques en épiderme (Fig. 20). Cependant, l'absence d'expression de *Sox2* dans ces cellules soutient que l'inhibition du signal BMP n'est pas suffisante pour induire du tissu neural (Delaune et al., 2005). Ces résultats suggèrent qu'un ou plusieurs autres signaux sont nécessaire(s). L'un des signaux qui pourraient être impliqués est le signal FGF. En effet, la même équipe de recherche a également montré que l'inhibition du signal BMP dans les mêmes conditions expérimentales, cette fois-ci par microinjection de *Smad5-sbn*, entraîne l'expression de *Sox2* de manière ectopique mais cette expression est perdue si dans le même temps le signal FGF est inhibé (Marchal et al., 2009). Ces deux études suggèrent que l'inhibition du signal BMP n'est pas suffisante

pour induire du tissu neural ectopique. De plus, ces études appuient l'existence d'un rôle important du signal FGF au cours de l'induction neurale, comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

I.2.c - Rôle du signal BMP au cours de l'induction neurale – Conclusion générale

En s'appuyant sur les différentes données énoncées jusqu'ici, il semble possible d'avancer que les divergences de résultats concernant le rôle de la voie de signalisation BMP au cours de l'induction neurale se fondent principalement sur des différences de modèles, de techniques expérimentales et d'interprétations des données obtenues. Cependant, une vision globale des diverses observations faites jusqu'à aujourd'hui permet de proposer que l'inhibition du signal BMP est nécessaire au cours de l'induction neurale, la question de la suffisance de cette inhibition n'étant pas expérimentalement étayée.

De plus, comme nous allons le voir dans les chapitres suivants, d'autres voies de signalisation semblent jouer des rôles majeurs au cours de l'induction neurale, ceci allant également à l'encontre de l'idée de suffisance de l'inhibition du signal BMP et donc du modèle par défaut.

II - ROLE DE LA VOIE DE SIGNALISATION FGF AU COURS DE L'INDUCTION NEURALE

Depuis l'énoncé du modèle par défaut, un ensemble de données ont montré que l'inhibition du signal BMP n'était pas suffisante pour l'induction neurale, impliquant que la différenciation des cellules de l'ectoderme en cellules neurales nécessite un signal inducteur. De manière concomitante à ces recherches, l'attention de la communauté scientifique s'est portée sur le signal FGF. Comme nous le verrons dans ce chapitre, si la voie de signalisation FGF a très vite été identifiée comme une potentielle voie inductrice de tissu neural, son implication précise reste encore aujourd'hui très controversée.

II.1 - LA VOIE DE SIGNALISATION FGF

Les FGFs (Fibroblast Growth Factors) forment une famille de facteurs de croissance majoritairement extracellulaires. Cette famille comprend entre 19 et 27 membres en fonction des espèces chez les vertébrés (Oulion et al., 2012). Ils sont impliqués dans un grand nombre de processus biologiques, notamment au cours du développement embryonnaire. Leur signalisation s'effectue à travers leur fixation aux FGFRs (FGF Receptors) en association à l'héparane sulfate, sous forme de dimère 2-2-2. Ces récepteurs de la famille des RTKs (Recepteurs Tyrosine Kinase) sont au nombre de quatre chez les vertébrés. En fonction des épissages alternatifs, en particulier des exons codant pour les domaines extracellulaires, différentes isoformes de ces récepteurs sont synthétisées, chacune ayant une affinité spécifique pour les différents FGFs (Bottcher et Niehrs, 2005).

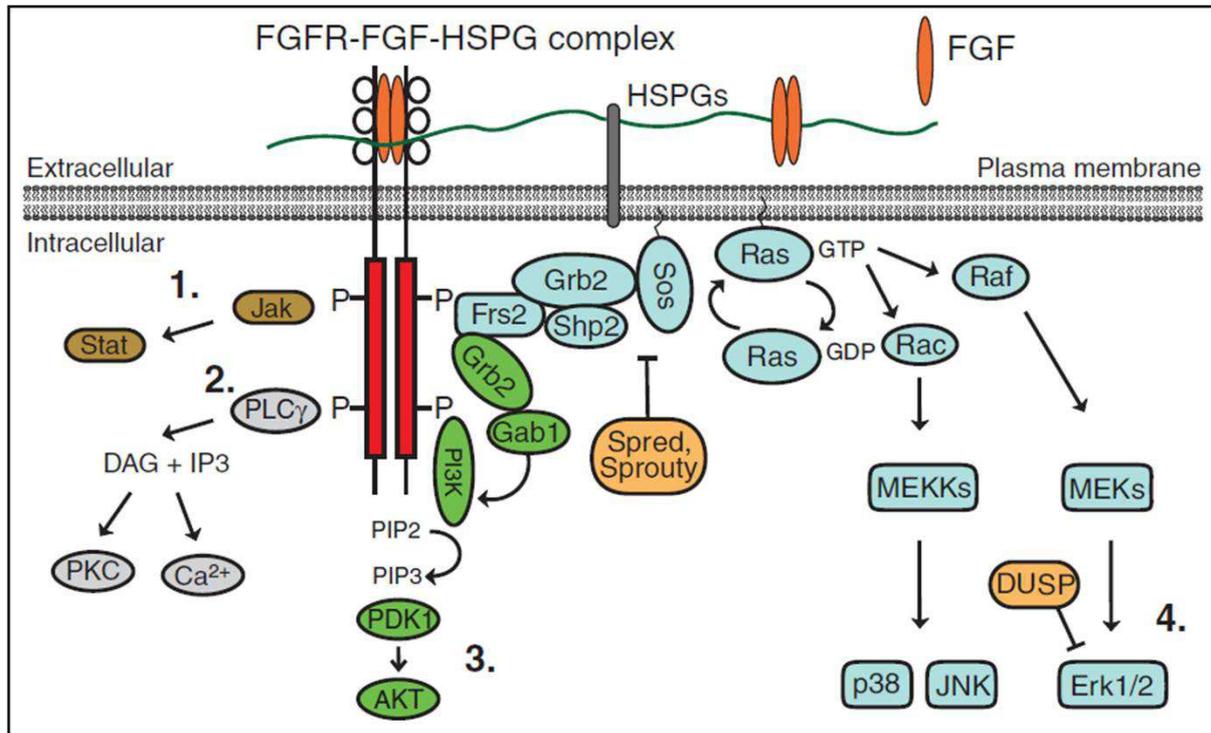


Figure 21 : Signalisation intracellulaire de la voie FGF.

Représentation des quatre voies de signalisation intracellulaires activées en aval de la fixation des FGFs à leurs récepteurs. (1) : voie de signalisation Jak/Stat (Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription) en marron. (2) : voie de signalisation PLC γ (phosphoinositide phospholipase C gamma) en gris. (3) : voie de signalisation PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) en vert. (4) : voie de signalisation MAPK/Erk (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) en bleu. Les protéines Spred, Sprouty et DUSP (Dual specificity phosphatase) en orange sont des inhibiteurs intracellulaires de la voie de signalisation FGF. D'après (Lanner et Rossant, 2010).

La dimérisation du récepteur entraîne au niveau de son domaine intracellulaire une transphosphorylation de résidus tyrosine spécifiques. Ceci a pour effet d'activer différentes voies de signalisation intracellulaires telles que les voies MAPK, PDK/Akt, Jak/Stat ou PLC γ /PKC (Fig. 20) (Lanner et Rossant, 2010).

II.2 - IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION FGF AU COURS DE L'INDUCTION NEURALE

II.2.a - Etude du rôle du signal FGF dans des expériences d'explants et de greffes

Suite à la proposition du concept d'induction neurale en 1924, Spemann a montré que le mésoderme sous-jacent à l'ectoderme était nécessaire à la formation de la plaque neurale au cours de la gastrulation (Spemann, 1938). Cette observation fut à l'origine de la recherche des signaux mésodermiques soutenant la formation de tissu neural au niveau de l'ectoderme. Ainsi, en 1993, Kengaku et Okamoto identifièrent la molécule bFGF (basic FGF, FGF2) comme étant capable d'induire

la formation de tissu neural dans des d'explants ectodermiques chez le xénope (Kengaku et Okamoto, 1993), premier indice d'un rôle potentiel du signal FGF au cours de l'induction neurale.

Au cours de la même période, il fut également observé que le signal FGF est fortement impliqué *in vivo* dans la formation du mésoderme chez le xénope, et qu'il peut également induire la formation de mésoderme dans des explants ectodermiques (Isaacs, 1997b). Dans ce cas, il est possible que la formation de tissu neural dans les explants où la voie est FGF est activée soit le résultat de la différenciation d'une partie de l'explant en mésoderme. Cependant, en fonction des conditions expérimentales (concentration, moment et durée des traitements), il apparaît que cette induction de mésoderme n'est pas effective, des explants ectodermiques plus âgés ne répondant plus de la même manière et ne se différenciant plus en mésoderme (Kengaku et Okamoto, 1993; Kengaku et Okamoto, 1995). Ainsi, afin d'étudier le rôle du signal FGF au cours de l'induction de tissu neural (que ce soit dans des explants ectodermiques ou dans des régions à devenir épidermique de l'ectoderme), il est nécessaire de vérifier l'absence de formation de mésoderme. En effet, dans ce type d'expériences, il est nécessaire de dissocier une induction neurale par le signal FGF d'une induction neurale par des signaux provenant du mésoderme formé suite à l'augmentation du signal FGF.

Suite à la proposition du modèle par défaut, l'implication du signal FGF au cours de la différenciation des explants ectodermiques en tissu neural lorsque le signal BMP est inhibé fut très vite confirmée chez le xénope (Launay et al., 1996; Sasai et al., 1996) (voir le chapitre : Le « modèle par défaut », un modèle contesté). Cependant, ces observations ont été précisées, notamment suite à l'utilisation d'un panel plus large de marqueurs neuraux spécifiques de différentes régions le long de l'axe antéropostérieur. En effet, dans ces conditions expérimentales de pertes de signal BMP, il fut observé que malgré l'inhibition du signal FGF par la microinjection préalable de l'ARNm de *XFD* (une forme dominant-négatif du récepteur aux FGFs, FGFR1), les marqueurs neuraux antérieurs *Otx2*, *OtxA* et le marqueur pan-neural *NCAM* (*Neural Cell Adhesion Molecule*) s'expriment tandis que les marqueurs neuraux postérieurs *En2* et *HoxB9* ne sont pas exprimés (Barnett et al., 1998; Launay et al., 1996). Dans le cas de microinjections de *XFD* et d'une forme dominant-négatif de *Ras* (un acteur d'une des voies de signalisation activées en aval de FGFR), les marqueurs neuraux antérieurs *Noggin*, *Neurogenin* et *XBF2* s'expriment dans les explants déplétés de signal BMP (Ribisi et al., 2000), confirmant que l'inhibition du signal FGF n'affecte pas l'expression de marqueurs neuraux antérieurs dans ce contexte.

De plus, il fut montré que la greffe d'un organisateur (organisateur de Spemann ou nœud de Hensen) sur un explant ectodermique préalablement microinjecté avec *XFD* n'était pas capable d'induire du tissu neural (Launay et al., 1996). Cette observation fut également précisée par l'étude de l'expression de marqueurs neuraux dans des explants de Keller (explants au stade gastrula précoce composés du mésoderme dorsal présomptif et du neuroectoderme sus-jacent ainsi que de l'organisateur de Spemann). Dans les explants de Keller surexprimant *XFD*, les marqueurs postérieurs *En2*, *Krox20* et *HoxB9* ne sont pas exprimés, au contraire des marqueurs neuraux antérieurs *Nrp1*, *Otx2* et *XAG1* (Holowacz et Sokol, 1999).

Le signal FGF semble également avoir un rôle dans la postériorisation du tissu neural dans les expériences d'explants. En effet, lorsqu'un explant prélevé à un stade plus tardif (jeune gastrula) dans une région de la plaque neurale devant former du cerveau antérieur est exposé au signal FGF, l'explant exprime alors *En2* qui est un marqueur de cerveau postérieur, mais n'exprime pas *OtxA* (qui

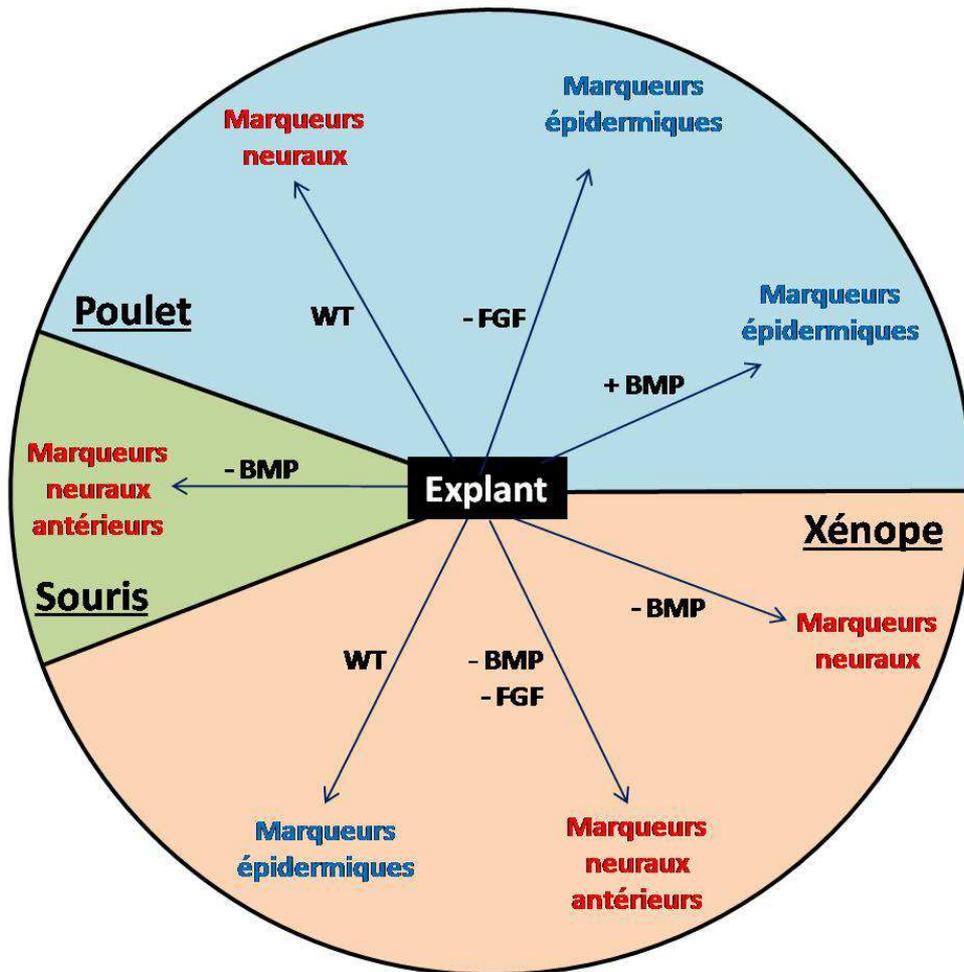


Figure 22 : Schématisation du destin des explants ectodermiques en fonction de modifications de voies de signalisation.

Schéma résumant les modifications du devenir cellulaire suite à la modification des voies de signalisation BMP et/ou FGF dans des explants ectodermiques de souris, de poulet et de xénope. Notons que chez le poulet, l'explant correspond à de l'ectoderme prélevé la région de l'aire pellucide à devenir neural.

est normalement exprimé dans le cerveau antérieur). De la même manière, des explants de la plaque neurale devant former du cerveau postérieur expriment le marqueur de moelle épinière *XIHbox6* mais n'expriment plus *En2* suite à une exposition au signal FGF (Cox et Hemmati-Brivanlou, 1995). Ces observations indiquent que le signal FGF est impliqué dans la postériorisation du tissu neural dans les expériences d'explants.

Une étude récente chez le xénope a montré l'importance du stade de développement des explants auquel sont étudiées les expressions de gènes neuraux. Lorsque *Noggin* est surexprimé dans des explants ectodermiques, l'expression de *Sox3* est maintenue après le stade 11 tandis que *Sox2* s'exprime à partir de ce même stade. Cependant, lorsque dans les mêmes conditions expérimentales le signal FGF est inhibé par microinjection de *XFD*, *Sox2* et *Sox3* ne s'expriment plus à partir du stade 12 (Rogers et al., 2008). Cette observation indique que le signal FGF ne serait pas nécessaire au cours de l'induction du tissu neural dans les explants ectodermiques, mais participerait au maintien de l'expression des gènes neuraux.

Chez le poulet, les explants d'ectoderme de la plaque neurale présomptive forment du tissu neural. Cependant, lorsque ces explants sont traités au SU5402, un inhibiteur des FGFRs (Mohammadi et al., 1997), leur destin neural est perdu au profit d'un destin épidermique (Wilson et Edlund, 2001; Wilson et al., 2000), suggérant l'implication du signal FGF au cours de l'induction du tissu neural. Ces observations viennent appuyer les résultats précédemment obtenus lors des expériences de greffe de l'organisateur. En effet, il avait été montré qu'une greffe du nœud de Hensen dans l'aire opaque entraîne l'expression de *Sox3* (Streit et al., 1998). Cependant, et comme chez le xénope, lorsque le signal FGF est bloqué par un traitement au SU5402 suite à la greffe de l'organisateur, cette expression est perdue (Streit et al., 2000).

Conclusion

L'ensemble de ces observations portant sur la réponse des explants ectodermiques à une modulation du signal FGF montre que ce signal est impliqué au cours de l'induction neurale. Cependant, il semble que le signal FGF possède un rôle de maintenance et non d'induction de l'expression de gènes neuraux dans les explants ectodermiques. Les données obtenues montrent également que le signal FGF participe à la mise en place du tissu neural postérieur mais n'est pas impliqué dans la mise en place du tissu neural antérieur. Ceci peut être expliqué par un rôle du signal FGF dans le patterning antéropostérieur du tissu neural, fonction difficilement dissociable de son implication au cours de l'induction neurale à proprement parlé.

II.2.b - Poisson zèbre, induction neurale et signal FGF

De manière identique aux autres vertébrés, la mise en place de l'axe dorsoventral au cours du développement du poisson zèbre implique une restriction du signal BMP à la partie ventrale de l'embryon au stade blastula. Il a été montré que c'est le signal FGF qui permet cette restriction ventrale de l'expression de *BMP4* et *BMP7*, et ceci indépendamment de l'action des inhibiteurs Chordin et Noggin. En effet, une surexpression de *FGF3*, *FGF8* ou *FGF24* entraîne une perte de l'expression de *BMP4* et *BMP7* et une dorsalisation de l'embryon, tandis que l'inhibition du signal FGF par un traitement au SU5402 entraîne une ventralisation de ce dernier (Furthauer et al., 2004). Il est donc nécessaire de noter que cette observation complique l'identification d'un possible rôle du signal FGF au cours de l'induction neurale, la modification de cette voie de signalisation ne permettant pas de dissocier les effets observés sur la mise en place de la plaque neurale des effets de dorsalisation et/ou ventralisation dus à l'opposition des voies FGF et BMP.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'inhibition du signal BMP n'est pas nécessaire au cours de l'induction neurale dans la partie postérieure de l'ectoderme chez le poisson zèbre (Koshida et al., 2002; Kudoh et al., 2004; Rentzsch et al., 2004). De plus, il a été montré que l'induction de tissu neural au niveau de l'ectoderme postérieur est sous le contrôle du signal FGF, son inhibition entraînant une perte d'expression de *Sox3*. Cette induction est indépendante du signal BMP dont l'inhibition ne restaure pas l'expression de *Sox3* dans un contexte de perte de fonction du signal FGF (Kudoh et al., 2004; Rentzsch et al., 2004).

Au contraire, si le signal BMP n'affecte pas la mise en place du tissu neural postérieur, il a été montré que son inhibition est nécessaire au cours de l'induction du neuroectoderme antérieur. En effet, la surexpression de *BMP2* ou d'un récepteur au BMP constitutivement actif bloque l'expression de *Sox3* uniquement dans cette région. De plus, si l'inhibition du signal FGF affecte l'expression de *Sox3* dans le neuroectoderme postérieur, cette expression n'est pas affectée dans le neuroectoderme antérieur (Rentzsch et al., 2004).

Conclusion

L'ensemble de ces résultats chez le poisson zèbre nous montre que si l'inhibition du signal BMP est nécessaire au cours de l'induction neurale, cela n'est le cas que dans la région antérieure de l'ectoderme à devenir neural. Le signal FGF apparaît quant à lui comme un signal clef au cours de la mise en place du tissu neural postérieur. Ainsi, ces observations participent fortement à étayer la possibilité d'un modèle alternatif au modèle par défaut.

II.2.c - Xénope, induction neurale et signal FGF

Comme je l'ai cité précédemment, le signal FGF est impliqué dans la mise en place du mésoderme chez les vertébrés (Isaacs, 1997a). Une autre fonction bien connue du signal FGF est son rôle dans le contrôle des mouvements cellulaires au cours de la gastrulation (Amaya et al., 1991; Ciruna et al., 1997; Griffin et al., 1995; Isaacs et al., 1994). Il est donc expérimentalement difficile de dissocier son action inductrice de mésoderme de son implication dans les mouvements de gastrulation et de sa potentielle action au cours de l'induction neurale. Ceci explique pourquoi chez le xénope, la grande majorité des observations portant sur l'induction neurale s'appuient sur des expériences d'explants. Cependant, les expériences *in vivo* apportent des informations concernant l'implication du signal FGF au cours de ce mécanisme.

Dans le but de découpler les différents rôles (hypothétiques ou effectifs) du signal FGF, il fut développé des embryons transgéniques n'exprimant *XFD* qu'à partir du stade gastrula. Dans ce contexte, aucune altération de la formation du tissu neural ne fut observée (Kroll et Amaya, 1996). Cependant, il apparaît fortement possible que l'inhibition du signal FGF à partir de ce stade de développement soit trop tardive pour affecter l'induction neurale, dans l'éventualité qu'il soit impliqué dans ce mécanisme.

Lorsque le signal FGF est inhibé cette fois-ci par microinjection de *XFD*, on observe une perte des tissus neuraux postérieurs. Bien que dans ces conditions la formation du mésoderme soit affectée rendant les interprétations difficiles, il est tout de même à noter qu'il n'y a pas de perte de l'expression de marqueurs neuraux antérieurs. Ceci suggère que si le signal FGF est bien impliqué dans l'induction neurale, il n'est pas nécessaire à la formation des tissus neuraux antérieurs (Amaya et al., 1993; Holowacz et Sokol, 1999; Launay et al., 1996). Cette observation fut par la suite corroborée par l'injection d'un dominant-négatif de *Ras* qui induit des phénotypes similaires (Ribisi et al., 2000).

Chez les vertébrés, il existe quatre récepteurs aux FGFs. Il était considéré que la microinjection de *XFD* était capable d'entraîner une hétérodimérisation de ce récepteur tronqué avec les autres FGFRs et ainsi de bloquer au moins partiellement leur signalisation. Cependant des

résultats différents furent obtenus en utilisant un dominant négatif de FGFR4 (que nous appellerons dn-FGFR4).

La microinjection de *dn-FGFR4* dans huit cellules du pôle animal au stade 32 cellules entraîne une altération du développement des structures neurales antérieures, la formation des structures télencéphaliques et oculaires étant affectée, ce qui n'est pas le cas lors de microinjection à des concentrations identiques d'ARNm de *XFD* (Hongo et al., 1999). Dans cette étude, l'inhibition du signal FGF en utilisant dn-FGFR4 a pour effet la perte de l'expression de marqueurs neuraux antérieurs tels que *BF-1* ou *Rx-1*. Il fut également montré que la microinjection de *dn-FGFR4* dans des explants ectodermiques inhibe l'expression de marqueurs neuraux suite à la greffe de l'organisateur. De manière intéressante, lorsque les explants surexprimant dn-FGFR4 sont mis en contact avec un organisateur prélevé au stade gastrula précoce, il n'y a pas d'expression des marqueurs antérieurs. Au contraire Lorsqu'ils sont mis en contact avec un organisateur prélevé au stade gastrula tardif, il n'y a pas d'expression des marqueurs postérieurs (Hongo et al., 1999). Cette étude a mis en évidence plusieurs points importants. Tout d'abord, il semble que le signal FGF soit impliqué dans l'induction des tissus neuraux antérieurs et postérieurs. Ensuite, en fonction de la forme dominant-négatif utilisée, les phénotypes induits ne sont pas identiques, suggérant que l'inhibition du signal FGF n'est pas totale.

Une autre étude, utilisant cette fois-ci le SU5402, a permis de confirmer qu'outre la perte de la formation de mésoderme et des crêtes neurales, l'inhibition du signal FGF induit une perte d'expression de *Sox2* aux stades gastrula précoce et tardif, montrant ainsi que le tissu neural n'est pas induit (Delaune et al., 2005).

Conclusion

L'ensemble de ces observations obtenues *in vivo* chez le xénope nous indique qu'en fonction des modalités d'inhibitions du signal FGF, les phénotypes observés peuvent être différents, suggérant d'une part que le signal FGF peut supporter différents rôles biologiques en fonction du récepteur par lequel il signale, et d'autre part que plusieurs résultats cités dans ce paragraphe peuvent refléter une inhibition incomplète de ce signal.

II.2.d - Poulet, induction neurale et signal FGF

Tout comme pour le xénope, une majorité des expériences portant sur le rôle du signal FGF au cours de l'induction neurale chez le poulet est basée sur l'étude du devenir d'explants ectodermiques ou sur l'effet de greffes, comme je l'ai exposé plus tôt. Cependant des informations obtenues *in vivo* semblent soutenir un rôle du signal FGF au cours de la mise en place du neuroectoderme.

L'analyse temporelle et spatiale de l'expression de marqueurs neuraux tels que *Sox3* (Streit et Stern, 1999a) et *Ern1* (Streit et al., 2000), mais également de membres de la famille des FGFs, a permis de proposer FGF8 comme un acteur potentiel de l'induction neurale chez le poulet. En effet, bien que *FGF8* ne soit pas exprimé dans l'épiblaste, son patron d'expression dans l'hypoblaste est en partie superposable à celui des marqueurs pré-neurax dans l'épiblaste sus-jacent avant l'initiation

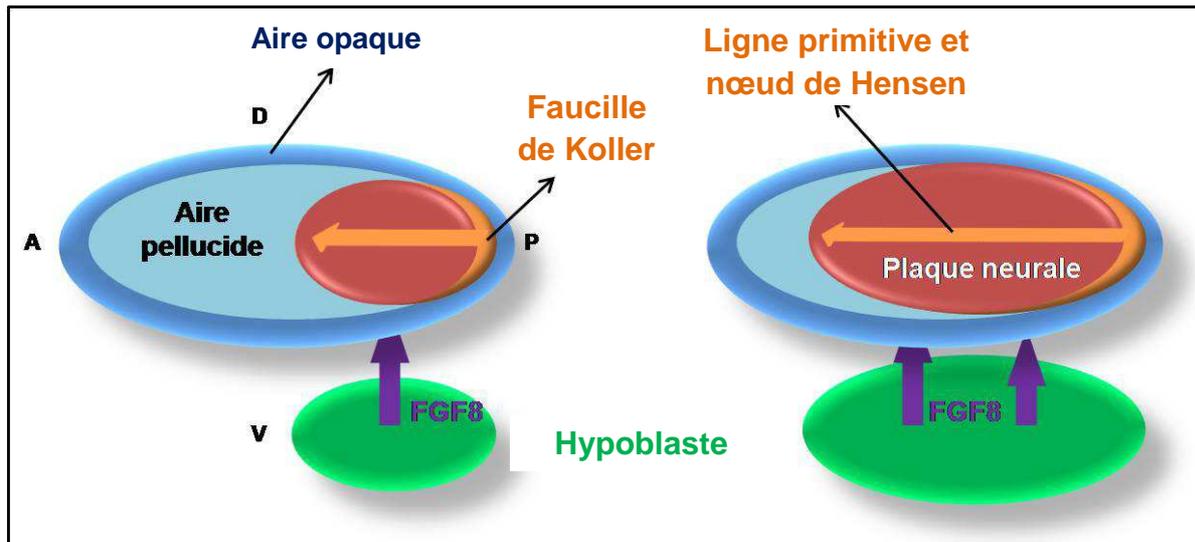


Figure 23 : Schématisation simplifiée d'un modèle d'induction neurale impliquant FGF8 chez le poulet.

Illustration du modèle d'induction neurale soutenue par le groupe de Claudio Stern. Ce modèle implique une signalisation verticale de FGF8 de l'hypoblaste (en vert) vers l'épiblaste (en bleu clair et en rouge) induisant l'induction de tissu neural différencié, c'est-à-dire la plaque neurale. Cette induction suit la progression caudo-rostrale du nœud de Hensen (symbolisé par la tête de la flèche) et de la formation de la ligne primitive (en orange) au cours de la gastrulation. a : partie antérieure ; d : partie dorsale ; p : partie postérieure ; v : partie ventrale. D'après (Sheng et al., 2003; Stern, 2005).

de la gastrulation (Fig. 23) (Streit et al., 2000). L'hypothèse proposée par le groupe de Claudio Stern est une implication du signal FGF via *FGF8* d'une part dans l'induction du mésoderme, et d'autre part dans l'induction du tissu neural via une diffusion verticale du signal de l'hypoblaste vers l'épiblaste. Cette hypothèse est soutenue par l'expérience montrant qu'une expression ectopique de *FGF8* au niveau de l'aire opaque (en utilisant une technique de greffe de bille imprégnée de la protéine FGF8) induit une expression des marqueurs neuraux *Sox3* et *Ernl* (Streit et al., 2000; Streit et Stern, 1999b).

II.2.e - Souris, induction neurale et signal FGF

Chez la souris, il a été montré que deux KO différents de *FGFR1* provoquent des phénotypes similaires mais ne bloquent pas l'induction de tissu neural (Deng et al., 1994; Yamaguchi et al., 1994). Comme énoncé précédemment, les souris KO *Alk3* expriment des marqueurs neuraux dans tout l'ectoderme. Dans ce contexte, l'inhibition du signal FGF par un traitement au SU5402 ne bloque pas l'expression endogène ni l'expression ectopique des marqueurs neuraux *Six3*, *Hesx1* et *Sox2* (DiGregorio et al., 2007), suggérant que le signal FGF n'est pas impliqué dans l'induction neurale.

II.3 - REMISE EN QUESTION DU ROLE DU SIGNAL FGF : LA RELATION MAPK-SMAD

La protéine Smad1 est constituée de trois domaines, à savoir les domaines MH1 en 5' et MH2 en 3', ces deux domaines étant reliés par un troisième domaine appelé "linker" (Fig. 24). De manière

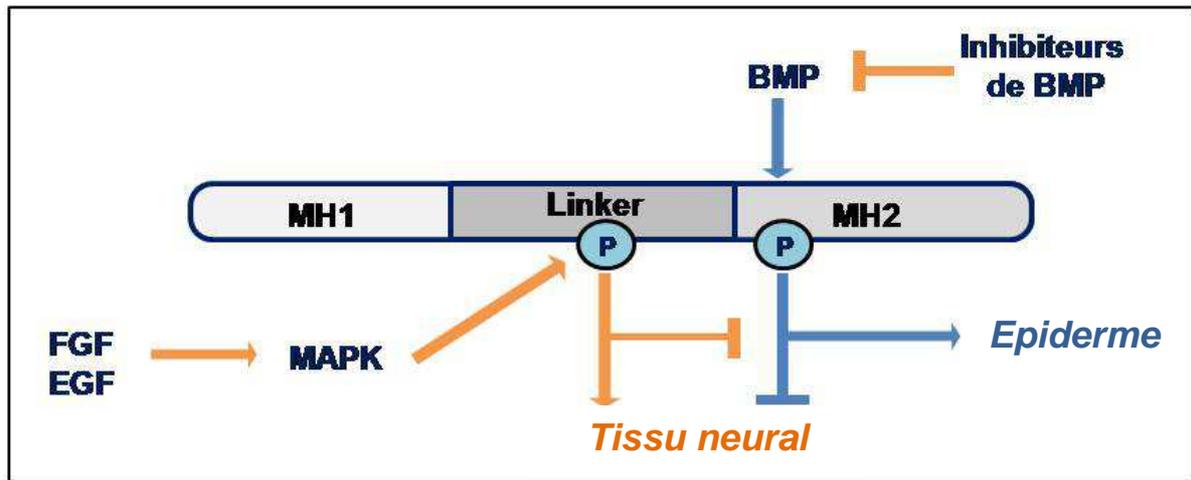


Figure 24 : Représentation schématique de l'opposition des voies de signalisation MAPK et BMP au niveau de Smad1.

La voie MAPK est activée par les voies de signalisation FGF et EGF. Tout comme les inhibiteurs de la voie BMP, elle correspond à une signalisation pro-neurale et est représentée en orange. La voie de signalisation BMP en bleu correspond à une signalisation pro-épidermique. D'après (Kretzschmar et al., 1997).

simplifiée, la phosphorylation du domaine MH2 permet la translocation de la protéine dans le noyau. Cependant, il a été montré que le domaine linker peut être phosphorylé par la voie EGF (Epidermal Growth Factor) au travers de sa signalisation intracellulaire MAPK. Cette phosphorylation bloque la translocation de Smad1 dans le noyau et donc la signalisation de la voie BMP (Kretzschmar et al., 1997). Il fut par la suite précisé que la voie de signalisation FGF, qui signale aussi via la voie MAPK, est capable de bloquer le signal BMP (Koshida et al., 2002), également au travers du blocage de la translocation de Smad1 (Pera et al., 2003). Cette activité inhibitrice de la voie MAPK a également été identifiée dans des expériences de dissociation/réagrégation de cellules d'explants ectodermiques chez le xénope. Comme je l'ai déjà expliqué précédemment, il avait été proposé dans un premier temps qu'un signal pro-épidermique (qui se révéla être le signal BMP) était dilué lors de la dissociation des cellules d'explants ectodermiques de xénope (Godsave et Slack, 1989; Grunz et Tacke, 1989; Sato et Sargent, 1989). Cependant, dans une étude plus récente, il fut observé une signalisation de la voie BMP dans des cellules d'explants ectodermiques dissociés. Il fut également observé que la dissociation elle-même induisait une activité MAPK. Cette activité fut proposée comme suffisante pour inhiber le signal BMP au travers de la phosphorylation du domaine linker de Smad1, et ainsi permettre l'induction du tissu neural (Fig. 24) (Kuroda et al., 2005).

La mise en évidence de la capacité d'inhibition du signal BMP par la voie MAPK a modifié les interprétations de plusieurs expériences proposant que le signal FGF posséderait un rôle d'inducteur de tissu neural. En effet, dans le cas d'expériences d'induction de tissu neural sans inhibition expérimentale du signal BMP, il n'est pas possible de définir si le signal FGF agit comme un inducteur de tissu neural ou comme un inhibiteur du signal BMP. Notons que la seconde hypothèse est encore à ce jour le principal argument en faveur du modèle par défaut depuis sa proposition.

II.4 - ROLE DU SIGNAL FGF INDEPENDAMMENT DU SIGNAL BMP

Les différentes expériences appuyant que le signal FGF est la voie de signalisation principale d'induction de tissu neural ne démontraient pas une fonction inductrice de tissu neural par FGF de manière indépendante de sa capacité à bloquer le signal BMP. Afin de découpler l'implication des voies de signalisation FGF et BMP au cours de l'induction neurale, le comportement de cellules ectodermiques déplétées de signal BMP a été étudié suite à la modification du signal FGF.

Dans ces conditions expérimentales, il a été montré chez le xénope que la microinjection conjointe d'une concentration faible de *eFGF* et de *Smad6* ou *tBR* dans un blastomère animal ventral à devenir épidermique induit l'expression de *NCAM* (*Neural Cell Adhesion Molecule*), et ceci en l'absence d'induction de mésoderme. Au contraire, la microinjection d'*eFGF* seul ne réprime pas l'expression du marqueur épidermique *K81* ou l'expression de marqueurs neuraux. Comme nous l'avons vu précédemment, l'inhibition du signal BMP dans les mêmes conditions n'induit pas non plus la formation de tissu neural (Fig. 25) (Delaune et al., 2005). Ceci suggère que le signal FGF est nécessaire au cours de l'induction de tissu neural ectopique, additionné à l'inhibition du signal BMP. Dans cette étude, il fut également montré que l'inhibition du signal FGF par un traitement au SU5402 d'explants ectodermiques avant une greffe de l'organisateur bloque l'expression de *NCAM* (Delaune et al., 2005), suggérant que le signal FGF est nécessaire afin de conférer à l'ectoderme sa capacité de différenciation en tissu neural.

Puisque le modèle par défaut propose que l'inhibition du signal BMP est suffisante pour induire du tissu neural, le signal BMP fut inhibé à différents niveaux de la voie de signalisation (par microinjection de *Noggin*, *tBR* et *Smad6*) dans un contexte de signal FGF bloqué (par un traitement au SU5402). L'absence d'expression des marqueurs neuraux *NCAM* et *Sox2* a permis de confirmer qu'en l'absence de signal FGF, l'inhibition du signal BMP n'est pas suffisante pour induire un devenir neurale (Delaune et al., 2005).

Enfin, comme il avait été montré précédemment, l'inhibition du signal BMP dans des explants ectodermiques (par surexpression de *Smad6* dans cette expérience) induit l'expression de *NCAM*, expression perdue lorsque le signal FGF est également bloqué (Delaune et al., 2005), confirmant la nécessité du signal FGF au cours de cette induction neurale.

Peu après, il a été confirmé par le même groupe que l'inhibition du signal FGF associée à l'inhibition du signal BMP (en surexprimant *Smad5-sbn*) dans l'ectoderme à devenir épidermique entraîne la perte de l'expression de marqueurs neuraux exprimés suite à l'inhibition du signal BMP seul. En outre, cette étude a également permis d'identifier au sein de la famille des FGFs, FGF4 comme un acteur de l'induction neurale (Marchal et al., 2009).

Ces études ont permis de montrer que chez le xénope le signal FGF peut induire du tissu neural, et ceci indépendamment de son activité inhibitrice du signal BMP.

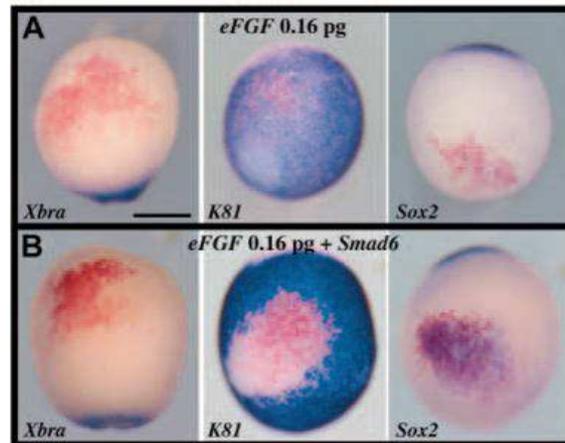


Figure 25 : Le signal FGF induit du tissu neural ectopique dans des embryons de xénope déplétés en signal BMP.

Les embryons de xénope ont été injectés au stade 16 cellules dans une cellule animale ventrale. L'expression des gènes *Xbra*, *K81* et *Sox2*, respectivement marqueur du mésoderme, de l'épiderme et du tissu neural, a été analysée par hybridation *in situ* au stade 13. Les cellules issues de la cellule microinjectée expriment *LacZ*. (A) : surexpression d'*eFGF*. (B) : surexpression d'*eFGF* et de *Smad6*. D'après (Delaune et al., 2005).

II.5 - RECONCILIATION DE L'IMPLICATION DU SIGNAL FGF ET DU MODELE PAR DEFAULT ???

Une étude récente apporte des éléments pouvant réconcilier le rôle du signal FGF et l'unique nécessité de l'inhibition du signal BMP au cours de l'induction neurale. Il a tout d'abord été montré chez le xénope que l'inhibition du signal BMP par microinjection de *Smad5-sbn* dans un blastomère animal ventral induit l'expression ectopique de *Zic1* (un gène neural précoce), même si le signal FGF est inhibé. Au contraire, l'expression des gènes neuraux précoces *Zic3* et *FoxD5a* est sous le contrôle du signal FGF, au travers de FGF4. De manière intéressante, cette étude montre également que l'inhibition du signal BMP induit l'expression de FGF4 (Marchal et al., 2009). Ces résultats montrent que l'inhibition du signal BMP est suffisante pour induire l'expression de gènes nécessaire à la formation du tissu neural indépendamment du signal FGF, mais est également capable d'activer la signalisation FGF. En résumé, cette étude propose de réconcilier le modèle par défaut avec l'implication pro-neurale du signal FGF en montrant que l'activité du signal FGF est en partie dépendante de l'inhibition du signal BMP.

II.6 - LE ROLE DU SIGNAL FGF AU COURS DE L'INDUCTION NEURALE – CONCLUSION GENERALE

Les activités des voies de signalisation BMP et FGF semblent être étroitement liées au cours de l'induction neurale chez les vertébrés. Cependant, l'interaction entre ces deux voies n'est pas encore clairement définie chez tous les modèles. Par exemple, il n'est pas possible d'affirmer à l'heure actuelle que l'inhibition de la voie BMP par la voie FGF est un mécanisme participant à l'induction neurale. Dans l'hypothèse que cela soit le cas, il n'est pas possible de dissocier l'activité

inhibitrice du signal BMP d'une activité neuralisante directe du signal FGF dans la majorité des expériences présentées ci-dessus.

De plus, il apparaît que le signal FGF est impliqué dans différents mécanismes au cours de la neurogenèse tels que la régionalisation ou la détermination du tissu neural induit. Il est donc difficile de dissocier les différentes activités de la voie de signalisation FGF et donc de conclure quant à son rôle précis au cours de l'induction neurale.

III - AUTRES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES AU COURS DE L'INDUCTION NEURALE

Dans ce chapitre, et puisqu'au cours de ce travail de thèse je me suis focalisé sur les voies de signalisation BMP et FGF, je ne parlerai que succinctement d'autres voies de signalisation connues pour être impliquées dans l'induction neurale chez les vertébrés.

III.1 - LA VOIE DE SIGNALISATION WNT

La voie Wnt, via sa voie de signalisation canonique, fut identifiée comme possible acteur de l'induction neurale au cours d'expériences sur des explants ectodermiques. Cependant, les modalités de son implication semblent diverger en fonction des modèles étudiés (Moon, 2005; Sokol, 1999). Chez le xénope, le premier résultat suggérant un rôle de la voie Wnt fut la formation d'un second axe de développement antérieur suite à la surexpression de *Wnt1* ou de *Wnt3a* (Steinbeisser et al., 1993), observation appuyée par la suite par la caractérisation du rôle du signal Wnt au cours de la mise en place du centre de Nieuwkoop (Larabell et al., 1997). Il a également été montré que l'activation de la voie Wnt dans des explants ectodermiques par microinjection de *Wnt8* ou de β -caténine entraîne l'expression du marqueur neural *NCAM*, mais participe également à l'inhibition de l'expression de *BMP4* dans ces explants (Baker et al., 1999), suggérant dans ce contexte un rôle de capacitation de l'ectoderme via l'inhibition du signal BMP plus qu'un rôle inducteur de la différenciation en tissu neural. Cependant, il a depuis été montré que la surexpression d'un dominant négatif de la β -caténine inhibe l'expression des marqueurs précoces *Sox2* et *Sox3 in vivo* ainsi que l'expression de *Sox3* dans des explants ectodermiques également microinjecté avec *Noggin* (Heeg-Truesdell et LaBonne, 2006). Cette observation suggère une nécessité de l'inhibition du signal Wnt *in vivo*, contrairement à ce qui avait été précédemment proposé.

Des observations similaires quant au rôle du signal Wnt ont été rapportées chez le poulet. Lorsque *Wnt3a* est surexprimé dans des explants ectodermiques à devenir neural, l'expression des marqueurs neuraux est perdue au profit de l'expression de marqueurs épidermiques, l'inhibition additionnelle du signal BMP étant nécessaire à l'expression des marqueurs neuraux (Wilson et Edlund, 2001). Ceci suggère que l'inhibition au moins partiel du signal Wnt est nécessaire au cours de l'induction neurale.

Bien que ces données puissent paraître contradictoires, il est cependant possible de concilier les différents effets observés suite à une modification du signal Wnt. Il est ainsi possible de considérer que ce signal possède une activité pro-neurale précoce tandis que plus tardivement au cours du développement, son activité devient anti-neurale (Stern, 2005).

III.2 - LA VOIE DE SIGNALISATION IGF

Les fondements expérimentaux ayant permis de souligner le lien entre les voies de signalisation FGF et BMP repose sur l'étude du rôle d'EGF au cours de l'induction neurale, en particulier au travers de sa signalisation intracellulaire MAPK dépendante (Kretschmar et al., 1997). De la même manière, la voie de signalisation IGF (Insulin Growth Factor) peut, au travers de sa signalisation MAPK, induire une inhibition de la voie de signalisation BMP (Pera et al., 2003). IGF est également fortement impliqué dans la formation du tissu neural antérieur ainsi que de la tête (Pera et al., 2003), et ceci en partie via une inhibition de la voie Wnt (Richard-Parpaillon et al., 2002).

III.3 - LA SIGNALISATION NOTCH

La voie de signalisation Notch semble également impliquée dans l'induction neurale. En effet, il a été montré chez le xénope que la surexpression du ligand *Hh* (*Hedgehog*) ou de l'activateur transcriptionnel *Gli1* provoque à la fois une induction de l'expression de marqueurs neuraux dans des explants ectodermiques, mais aussi une augmentation de la taille du territoire neural *in vivo* (Lai et al., 1995). Au contraire, une diminution du signal Notch provoque une expansion du territoire épidermique (Min et al.).

Cependant, il est important de souligner que si des observations supportent l'implication de la voie de signalisation Notch au cours d'évènements de neuralisation (Lowell et al., 2006), son rôle au cours de l'induction neurale à proprement parlé reste encore à être démontré.

III.4 - LE CAS DE LA SIGNALISATION ACTIVINE/NODAL

Xnr3 est l'un des ligands de la famille Nodal du xénope qui en possède quatre. Il a été proposé comme capable d'hétérodimériser avec les BMPs et ainsi de fonctionner de la même manière que les antagonistes extracellulaires de ce signal (Hansen et al., 1997). Il a également été montré que Xnr3 est capable, en se fixant à FGFR1, d'activer la voie MAPK, et de ce fait de bloquer la signalisation de BMP (Yokota et al., 2003). De manière intéressante, il apparaît que ce mécanisme implique également FRL1 qui est un co-récepteur de Nodal aussi appelé Cripto (Yokota et al., 2003). En effet, la surexpression de *FRL1* dans des explants ectodermiques induit l'expression de gènes neuraux tels que *Zic3* ou *Neurogenin* (Yabe et al., 2003).

Rappelons qu'il a été montré par Chang et collaborateurs que l'inhibition de la voie Nodal par Smad7 semble nécessaire lors de l'induction de tissu neural ectopique chez le xénope (Chang et Harland, 2007). Cependant, une expérience similaire a montrée que l'induction de tissu neural ectopique induite par la surexpression de *Smad6* et de *eFGF* est perdue si dans le même temps la voie de signalisation Nodal est inhibée par surexpression de *Cerberus* (Linker et al., 2009).

L'ensemble de ces données obtenues chez le xénope ne permettent pas de conclure à un éventuel rôle pro- ou anti-neural de la voie de signalisation Nodal. De plus amples études restent nécessaire afin de pouvoir définir si cette voie de signalisation possède un rôle au cours de l'induction neurale.

IV **INDUCTION NEURALE CHEZ LES TUNICIERS**

Plusieurs espèces de tuniciers sont à l'heure actuelle communément utilisées comme modèles en biologie du développement. Cependant, deux espèces sont majoritairement utilisées, à savoir *Ciona intestinalis* et *Halocynthia roretzi*. Avant de parler plus précisément de la mise en place du tissu neural chez les tuniciers, précisons que le devenir de chaque cellule aux différents stades de développement est bien défini, ceci ayant permis d'identifier les cellules participant à la formation du tissu neural depuis les stades les plus précoces du développement (Cole et Meinertzhagen, 2004; Meinertzhagen et al., 2004; Nishida, 1987). Ainsi, au stade 8 cellules, les deux cellules **a4.2** (en rouge Fig. 26) participent à la formation de la partie antérieure du système nerveux, c'est-à-dire à la vésicule sensorielle (ou vésicule cérébrale sensorielle) tandis que les deux cellules **A4.1** (en jaune Fig. 26) et les deux cellules **b4.2** (en vert Fig. 26) participent à la formation de la partie postérieure du système nerveux, c'est-à-dire le tube neural (Nishida, 1987). La toute première observation concernant l'induction neurale porte sur la différenciation de manière autonome des blastomères **A4.1** isolés qui se neuralisent, ce qui n'est pas le cas des blastomères isolés **a4.2** et **b4.2** (Nishida, 1991), suggérant une différenciation autonome en tissu neural des cellules issues de la lignée **A** tandis que le devenir neural des cellules issues des lignées **a** et **b** est sous le contrôle d'une induction. En ce qui concerne la lignée cellulaire **a**, la signalisation FGF joue un rôle central au cours de la différenciation en tissu neural. Il avait été proposé qu'un signal provenant de cellules de la lignée **A** serait nécessaire à l'induction de l'expression du marqueur neural précoce *Otx* à partir du stade 32 cellules dans les cellules à devenir neural et il a été montré que la voie de signalisation Ras/MEK/ERK est responsable de cette induction (Hudson et Lemaire, 2001). *FGF9/16/20* est exprimé au bon endroit et au bon moment puisque son expression est observée à partir du stade 16 cellules dans les cellules de la lignée **A**, ainsi que dans quelques cellules de la lignée **B**, expression conservée au stade 32 cellules chez *C. intestinalis* (Bertrand et al., 2003). Il a de plus été montré que *FGF9/16/20* induit l'expression des marqueurs neuraux *Otx* et *Etr1* et la perte d'expression du marqueur épidermique *Epi1* dans des expériences d'explantation des cellules animales au stade huit cellules (Bertrand et al., 2003). Au contraire, l'injection d'un morpholino anti-*FGF9/16/20* induit la perte d'expression d'*Otx* et l'expression d'*Epi1* dans les cellules à devenir neural (Bertrand et al., 2003).

En ce qui concerne le rôle du signal BMP au cours de l'induction neurale chez les tuniciers, la surexpression chez *H. roretzi* du signal BMP par microinjection d'ARNm de *BMPb* (un orthologue des *BMP2* et *BMP4* de vertébrés) induit la formation de cellules sensorielles pigmentées ectopiques mais n'entraîne pas une perte ou une réduction du système nerveux central (Miya et al., 1997). De même, la diminution du signal BMP par microinjection de *Chordin* inhibe la formation de ces cellules sensorielles pigmentées mais n'interfère pas avec la formation de l'épiderme. De manière

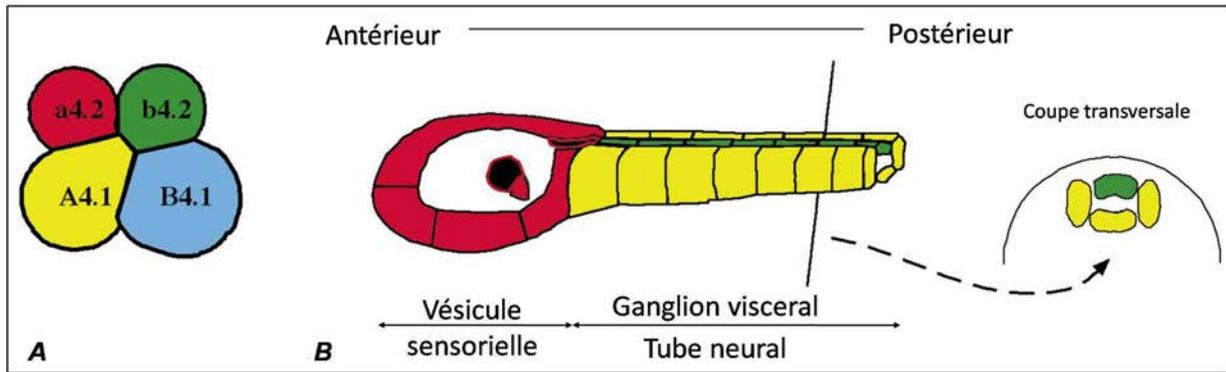


Figure 26 : Cartographie du devenir des cellules participant à la formation du système nerveux central chez *Ciona intestinalis* au stade 8 cellules.

(A) : vue latérale d'un embryon au stade 8 cellules. (B) : schématisation du système nerveux central, et coupe transversale au niveau du tube neural. Le système nerveux antérieur se forme à partir des cellules a4.2. Le tube neural se forme à partir des cellules a4.1 et de b4.2. D'après (Hudson et Lemaire, 2001).

intéressante, il est à noter que cette étude montre également que la mutualisation des signaux FGF et BMP est nécessaire à la formation de ces cellules pigmentées (Darras et Nishida, 2001b).

L'ensemble de ces observations montre tout d'abord que, contrairement aux vertébrés, l'inhibition du signal BMP n'est pas nécessaire au cours de l'induction neurale, une activation ou une inhibition de ce signal n'altérant pas la mise en place du système nerveux. Le signal FGF quant à lui joue un rôle central au cours de l'induction neurale chez les tuniciers. De plus, il a été montré un lien fonctionnel direct entre FGF9/16/20 et l'expression du marqueur neural précoce *Otx* (Bertrand et al., 2003), ceci étant une preuve indéniable de la capacité du signal FGF à induire directement une identité neurale indépendamment d'une inhibition du signal BMP chez les tuniciers.

Introduction

Partie IV : Induction neurale chez l'amphioxus

SOMMAIRE

Partie IV : Induction neurale chez l'amphioxus

I-	Induction neurale et organisateur chez l'amphioxus.....	54
I.1 -	Un organisateur chez l'amphioxus ???	54
I.2 -	Patrons d'expression de gènes et aspect temporel de l'induction neurale chez l'amphioxus.....	56
I.2.a -	Etude de l'expression de gènes orthologues de gènes exprimés dans l'organisateur des vertébrés	56
I.2.b -	Etude de l'expression de gènes exprimés dans l'ectoderme	57
II -	Mécanismes moléculaires de l'induction neurale chez l'amphioxus.....	59
II.1 -	Les voies de signalisation BMP/TGF- β	59
II.1.a -	Patrons d'expression des gènes de la voie BMP au cours de l'induction neurale	60
II.1.b -	Patrons d'expression des gènes codant pour les antagonistes de la voie de signalisation BMP au cours du développement embryonnaire précoce	60
II.1.c -	Patrons d'expression des gènes de la voie Activine/Nodal au cours de l'induction neurale.....	61
II.2 -	La voie de signalisation FGF – patrons d'expressions des FGFs au cours de l'induction neurale	61
III -	Rôle des voies de signalisation BMP, FGF et Activine/Nodal au cours de l'induction neurale chez l'amphioxus – Données fonctionnelles	63
III.1 -	Etude du rôle de la voie BMP au cours du développement précoce	63
III.2 -	Etude du rôle de la voie Activine/Nodal au cours du développement précoce.....	66
I.1 -	Etude du rôle de la voie FGF au cours du développement précoce	68
I.2 -	Conclusion générale	69

I INDUCTION NEURALE ET ORGANISATEUR CHEZ L'AMPHIOXUS

I.1 - UN ORGANISATEUR CHEZ L'AMPHIOXUS ???

Nous avons vu que chez les vertébrés la mise en place de la plaque neurale est induite par des signaux émis par l'organisateur. Chez les céphalochordés, même si peu d'études fonctionnelles concernant le contrôle moléculaire des premières étapes de la formation du système nerveux ont été publiées, il existe un certain nombre de résultats expérimentaux suggérant que la mise en place de la plaque neurale a également lieu par induction.

Les toutes premières expériences contribuant à comprendre les mécanismes de mise en place du système nerveux chez l'amphioxus furent réalisées par Tung *et collaborateurs*. A l'aide de marquage au Sulfate bleu du Nil de différents blastomères aux stades 4, 8, 16 et 32 cellules, le devenir cellulaire de ces blastomères au stade larvaire fut identifié (Tung et al., 1962b). Ainsi, ce sont les blastomères antérieurs du pôle animal au stade 8 cellules qui forment la vésicule cérébrale et les deux tiers antérieur du tube neural (Fig. 27A). Le tiers postérieur du tube neural dérive quant à lui des blastomères antérieurs de la partie végétale de l'embryon (Fig. 27B). De plus, ces expériences ont montré que ce sont les quatre blastomères animaux au stade huit cellules qui sont à l'origine de la quasi-totalité des tissus ectodermiques, c'est-à-dire la totalité de l'épiderme et les deux tiers antérieurs du tube neural (Fig. 27C).

De manière intéressante, une expérience d'isolation de blastomères avait montré que lorsque les quatre blastomères animaux (incluant donc les blastomères possédant un devenir neural) sont isolés au stade 8 cellules, l'embryon formé à partir de ces cellules ne possède pas de tube neural (et *a priori* de tissu neural différencié) (Tung et al., 1958). Ces résultats nous indiquent que la mise en place du tissu neural à partir des blastomères animaux antérieurs nécessite des informations provenant de la partie végétale de l'embryon, c'est-à-dire que les cellules à devenir neural nécessitent une stimulation des cellules environnantes (i.e. une induction) au cours du développement embryonnaire afin de se différencier en cellules neurales.

Si ces résultats suggèrent fortement l'existence d'un phénomène d'induction au cours de la mise en place du tissu neural, ils ne montrent pas quelles sont les structures inductrices. Afin de définitivement démontrer l'existence de ce phénomène d'induction et de définir quelles cellule(s) ou tissu(s) en sont à l'origine, Tung *et collaborateurs* entreprirent d'effectuer différentes expériences de transplantation. La plus intéressante de ces expériences en ce qui concerne la mise en place du tissu neural fut la reproduction de l'une des expériences de Spemann et Mangold, la greffe de l'organisateur putatif sur un embryon hôte. Dans le cas de l'embryon d'amphioxus, ce sont les lèvres blastoporales qui ont été transplantées dans le blastocoele d'un embryon hôte (Fig. 28A). Il en résulte la formation de deux types d'embryons au stade larvaire. Dans la majorité des cas, les larves possèdent un second tube digestif de petite taille (Fig. 28B). Dans un cas sur six, la larve possède une structure dorsale ectopique contenant entre autre un tube neural, une notochorde et deux rangées de somites (Fig. 28B) (Tung et al., 1962a). Ces résultats suggèrent que l'amphioxus possède comme les vertébrés un organisateur capable d'induire la formation de tissus dorsaux axiaux ectopiques.

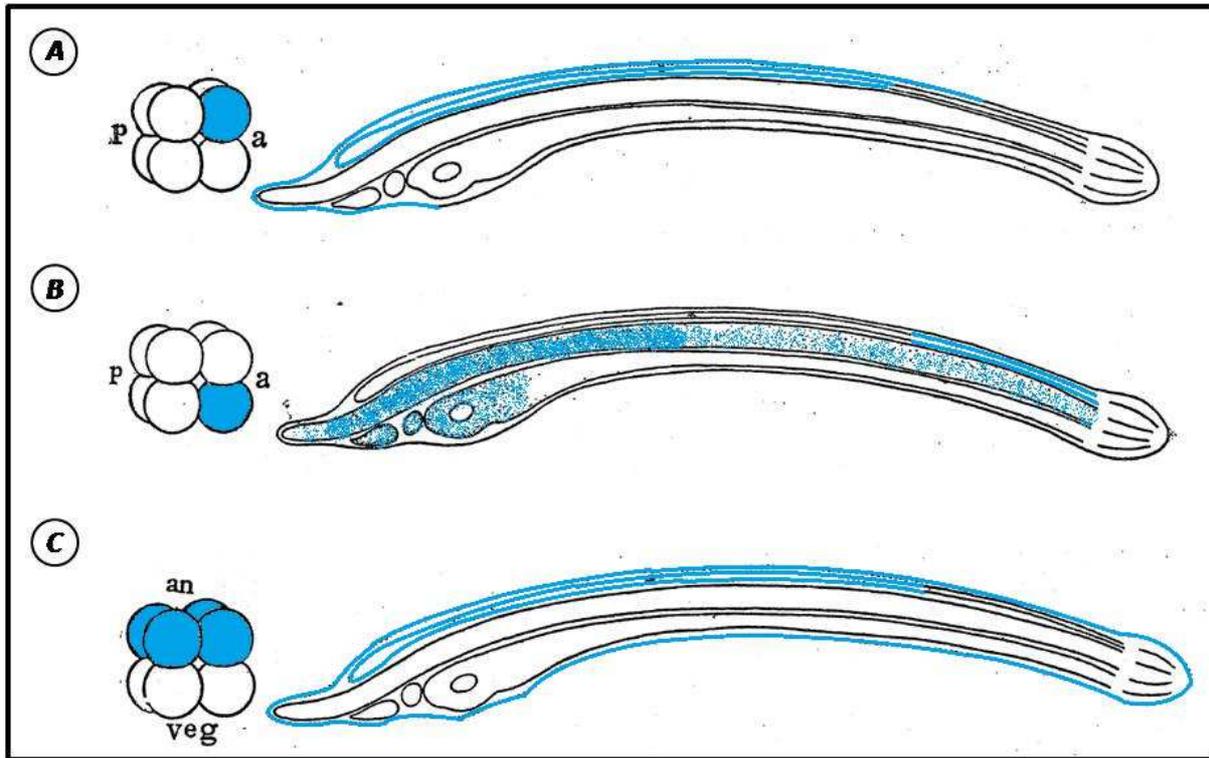


Figure 27 : Suivi du devenir des blastomères au stade 8 cellules par coloration au bleu du Nil.

(A-C) : Coloration de blastomère(s) au stade 8 cellules. A gauche sont représentés le(s) blastomère(s) marqué(s). A droite sont représentés par des pointillés ou en grisé les tissus marqués au stade larvaire. (A) : Coloration d'un blastomère antérieur du pôle animal. Au stade larvaire, les deux tiers antérieurs du tube neural ainsi que la totalité de l'épiderme dorsal et antérieur sont marqués. (B) : Coloration d'un blastomère antérieur du pôle végétal. Au stade larvaire, le tiers postérieur du tube neural ainsi que la notochorde et certains tissus endodermiques antérieurs sont marqués. (C) : Coloration des quatre blastomères du pôle animal. Au stade larvaire, les deux tiers antérieurs du tube neural ainsi que la totalité de l'épiderme sont marqués. a : partie antérieure ; an : pôle animal ; p : partie postérieure ; veg : pôle végétal. D'après (Tung et al., 1962b).

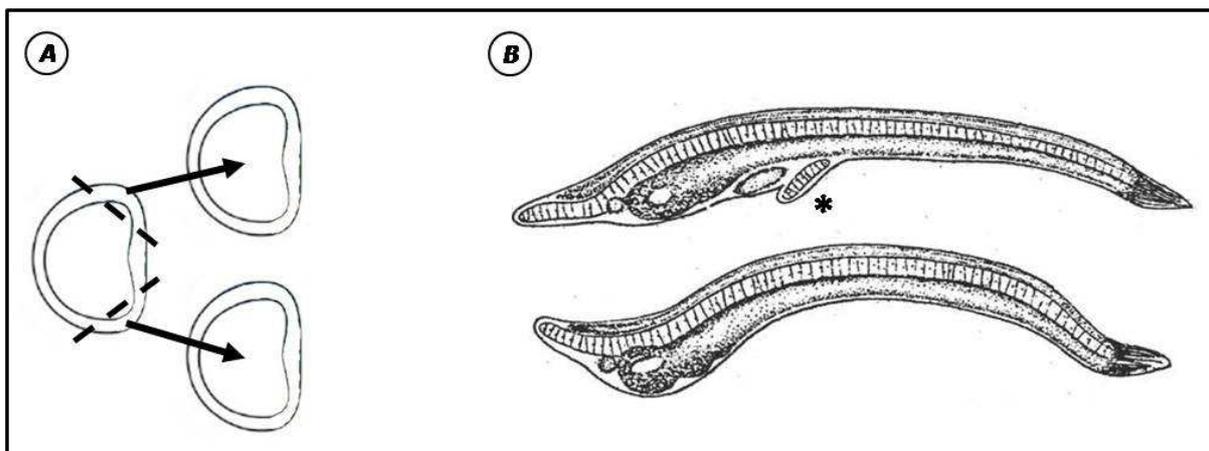


Figure 28 : Greffe de lèvres blastoporales chez l'amphioxus.

(A) : Schématisation de la greffe de chaque lèvre blastoporale au stade gastrula précoce dans le blastocoele de deux gastrulas précoces hôtes. (B) : Exemple de larves obtenues suite à la greffe d'une lèvre blastoporale. L'astérisque localise la formation de la structure dorsale ectopique. D'après (Tung et al., 1962a).

Cependant, il est à noter que si un phénomène d'induction semble bien être à l'origine de la formation de cette structure dorsale secondaire chez l'amphioxus, l'unique représentation d'une larve greffée ne montre qu'une structure dorsale secondaire partielle. De plus, aucune approche de lignage cellulaire n'a été réalisée, laissant le doute sur l'origine (ectopique ou induite) des structures nouvellement formées.

L'ensemble de ces résultats nous indique que certaines cellules sont très précocement destinées à engendrer le tissu neural chez l'amphioxus, et que la formation de ce tissu neural nécessite une induction. De plus, de la même manière que chez les vertébrés, l'amphioxus semble posséder une structure organisatrice capable entre autre d'induire la formation de tissu neural ectopique. Cependant, ces résultats ne permettent pas de comprendre les mécanismes moléculaires de l'induction neurale chez l'amphioxus.

I.2 - PATRONS D'EXPRESSION DE GENES ET ASPECT TEMPOREL DE L'INDUCTION NEURALE CHEZ L'AMPHIOXUS

Lorsque j'ai démarré mon travail de thèse, s'il n'existait que peu d'études fonctionnelles concernant le contrôle moléculaire de l'induction neurale chez l'amphioxus, l'étude de patrons d'expression de gènes apportait déjà certaines indications. Intéressons-nous aux gènes orthologues des gènes impliqués dans l'induction neurale et des gènes exprimés dans l'organisateur chez les vertébrés. Notons tout de même que pour de nombreux gènes, l'expression n'a pas été étudiée à tous les stades de développement chez l'amphioxus, en particulier au stade gastrula précoce, un stade essentiel pour l'étude de l'induction neurale.

I.2.a - Etude de l'expression de gènes orthologues de gènes exprimés dans l'organisateur des vertébrés

Un certain nombre de gènes orthologues des gènes exprimés dans l'organisateur chez les vertébrés sont exprimés au cours de la gastrulation chez l'amphioxus. Notons plus particulièrement l'expression au stade gastrula précoce de *Chordin*, de *Tsg* (*Twisted gastrulation*), *Vg1*, *Nodal*, *Lefty*, ou *Gooseoid* qui sont exprimés dans la lèvre blastopore dorsale (Yu et al., 2007). Ceci suggère d'une part qu'au stade gastrula précoce la structure proposée comme organisatrice chez l'amphioxus par Tung et collaborateurs (Fig. 29C, E-H) (Tung et al., 1962a), c'est-à-dire la lèvre dorsale du blastopore, montre une conservation d'expression de nombreux gènes avec les vertébrés. Ceci implique que si l'amphioxus a une structure homologue de l'organisateur, cette structure est déjà mise en place et exprime les signaux nécessaires à sa fonction à ce stade du développement. D'autre part, ces patrons d'expression suggèrent que l'induction neurale est en cours à ce stade (si l'on se base sur le postulat que l'induction neurale commence dès lors que la structure organisatrice est formée).

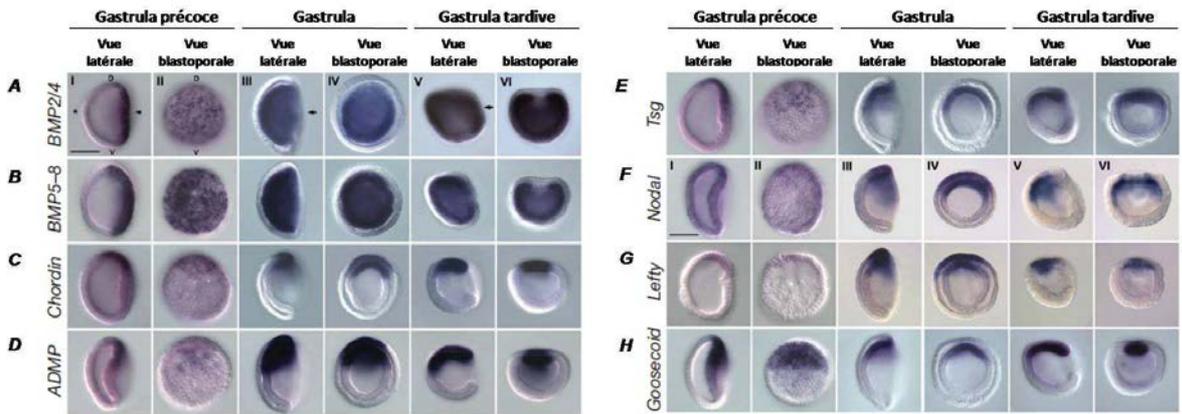


Figure 29 : Patterns d'expression de gènes au cours de la gastrulation.

Patterns d'expression des gènes *BMP2/4* (A), *BMP5-8* (B), *Chordin* (C), *ADMP* (D), *Twisted Gastrulation* (*Tsg*) (E), *Nodal* (F), *Lefty* (G) et *Goosecoid* (H) aux stades gastrula précoce, gastrula et gastrula tardive. L'astérisque indique le pôle animal ; la tête de flèche indique le pôle végétal ; D : partie dorsale ; V : partie ventrale ; la flèche indique le blastopore. Barre d'échelle (A) : 50µm. D'après (Yu et al., 2007).

I.2.b - Etude de l'expression de gènes exprimés dans l'ectoderme

En ce qui concerne l'expression de gènes pro-neuraux, intéressons-nous tout d'abord à *SoxB1a* (auss appelé *Sox1/2/3*). *SoxB1a* est exprimé à partir du stade gastrula dans l'ectoderme dorsal au niveau de la plaque neurale en formation (Fig. 30) (Holland et al., 2000). Cependant, une observation plus précise montre qu'à ce stade *SoxB1a* est également exprimé dans l'ectoderme ventral correspondant à l'épiderme présomptif (Yu et al., 2008a). *SoxB1a* n'est donc pas un gène uniquement neural comme ceci avait été proposé quelques années auparavant. Plus tard, au cours de la neurulation, *SoxB1a* est dans un premier temps exprimé dans l'ensemble de la plaque neurale avant de n'être exprimé qu'au niveau des bords de la plaque. Afin de mieux définir le patron de *SoxB1a* j'ai analysé de manière plus précise l'expression de ce gène qui est présentée dans la partie Résultats de ce manuscrit (voir la partie Résultats).

Neurogenin est exprimé au stade gastrula dans la partie dorsale de l'ectoderme. Au cours de la neurulation, *Neurogenin* s'exprime dans la plaque neurale, sauf dans sa partie la plus postérieure (Holland et al., 2000). Contrairement à *Neurogenin*, *Hu/Elav* est considéré comme un marqueur pan-neural chez l'amphioxus. Tout comme *Neurogenin*, il s'exprime à partir du stade gastrula dans la plaque neurale en formation, au niveau de l'ectoderme dorsal. Cependant, une étude précise de son expression montre qu'au cours de la neurulation *Hu/Elav* n'est plus exprimé dans la partie la plus antérieure de la plaque, et tout comme *Neurogenin*, *Hu/Elav* ne s'exprime pas dans la partie postérieure de la plaque neurale (Fig. 30) (Benito-Gutierrez et al., 2005; Lu et al., 2012; Satoh et al., 2001).

Un autre marqueur neural, *Brn1/2/4*, est exprimé à partir du stade gastrula dans l'ectoderme dorsal. Au cours de la neurulation, il est exprimé dans l'ensemble de la plaque neurale, à l'exception de quelques cellules au niveau de la vésicule cérébrale présomptive dans lesquelles *Brn1/2/4* ne semble plus être exprimé (Fig. 30) (Candiani et al., 2002).

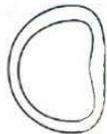
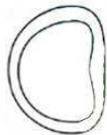
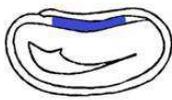
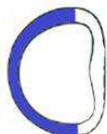
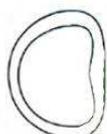
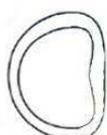
		Gastrula précoce	Gastrula	Neurula
Gènes pro-neuraux	<i>SoxB1a</i>			
	<i>Neurogenin</i>			
	<i>Hu/Elav</i>			
Gènes pro-épidermiques	<i>Dlx</i>			
	<i>AP-2</i>			
	<i>Dral</i>			

Figure 30 : Représentation schématique de l'expression de gènes pro-neuraux et pro-épidermique au cours du développement embryonnaire précoce.

Expression des gènes pro-neuraux *SoxB1a*, *Neurogenin* et *Hu/Elav* et des gènes pro-épidermique *Dlx*, *AP-2* et *Dral* aux stades gastrula précoce, gastrula tardive et neurula. L'expression des gènes est symbolisée en bleu. D'après ((Benito-Gutierrez et al., 2005; Holland et al., 2000; Holland et al., 1996; Meulemans et Bronner-Fraser, 2002; Satoh et al., 2001; Schubert et al., 1998)

Lorsque l'on s'intéresse aux marqueurs de la plaque neurale tels que *Hu/Elav*, *Brn1/2/4* ou *Neurogenin*, aucune donnée ne rapporte une expression avant le stade gastrula. Bien qu'il soit possible qu'il n'y ait effectivement pas d'expression de marqueurs neuraux plus précocement au cours du développement, le contraire est également envisageable puisque la plupart des études publiées sur ces gènes chez l'amphioxus se sont intéressées à leur expression uniquement à partir du stade gastrula.

Des gènes pro-épidermiques sont également exprimés dans l'ectoderme au cours de la gastrulation. *Dlx* est exprimé dans tout l'ectoderme au stade gastrula précoce. Plus tard au cours de la gastrulation, *Dlx* est exprimé dans tout l'ectoderme non neural de manière complémentaire à l'expression des marqueurs neuraux. Au stade neurula, *Dlx* est exprimé dans tous l'épiderme (Holland et al., 1996). Les gènes *AP-2* et *Dral* ne sont exprimés qu'à partir du stade gastrula dans le même territoire ectodermique que *Dlx*. Au stade neurula, *Dral* est exprimé dans tous l'épiderme tandis qu'*AP-2* n'est plus exprimé dans l'épiderme antérieur et postérieur, son expression étant restreinte à la partie médiane de l'embryon (Fig. 30) (Meulemans et Bronner-Fraser, 2002; Schubert et al., 1998).

L'ensemble de ces résultats montrent qu'au stade gastrula le territoire neural est déjà spécifié, suggérant que l'induction neurale a lieu à un stade plus précoce. Cependant, les patrons d'expression disponibles ne permettent pas de définir si l'induction neurale est initiée au cours de la gastrulation ou de la blastulation. Un des objectifs de mon travail a donc été de définir plus précisément le stade de développement auquel est initiée l'expression des marqueurs neuraux les plus précoces.

II - MECANISMES MOLECULAIRES DE L'INDUCTION NEURALE CHEZ L'AMPHIOXUS

D'un point de vue moléculaire, si aucune étude fonctionnelle ne s'est intéressée directement à l'induction neurale chez l'amphioxus, un certain nombre de résultats apportent des indications sur les mécanismes soutenant la mise en place du système nerveux. Puisque mon travail de thèse s'est focalisé sur le rôle des voies de signalisation BMP, Activin/Nodal/Vg1 et FGF au cours de l'induction neurale, et puisqu'il n'existe que très peu de données fonctionnelles concernant l'hypothétique implication d'autres signaux, je ne m'intéresserai dans ce chapitre qu'à ces trois voies de signalisation.

II.1 - LES VOIES DE SIGNALISATION BMP/TGF-BETA

En s'appuyant sur l'étude des relations d'orthologie entre membres de la famille des TGF- β chez les chordés, et plus largement chez les métazoaires, il est possible d'identifier chez l'amphioxus treize ligands et six récepteurs au sein de la famille TGF- β , ainsi qu'un Co-Smad (*Smad4*), un I-Smad (*Smad6/7*) et deux R-Smad (*Smad1/5/8* et *Smad2/3*). Dans le génome de *B. floridae* dix-huit séquences codant pour des ligands de la famille TGF- β ont été décrites, (Putnam et al., 2008). Cependant la position phylogénétique de cinq d'entre eux reste encore irrésolue (Satou et al., 2008) et aucune donnée concernant leur expression n'est rapportée à ce jour.

Nous ferons l'hypothèse que, comme chez les vertébrés, il existe deux principales voies de signalisation intracellulaires spécifiques aux voies BMP et Activine/Nodal/Vg1, chacune ne répondant qu'à la fixation de certains ligands à certaines association de récepteurs de type I et II.

Chez l'amphioxus, il existe trois récepteurs de type I et trois récepteurs de types II. D'après la fonction des orthologues de ces récepteurs chez les vertébrés (Bragdon et al., 2011), il est possible de penser que parmi les récepteurs de types I, *Alk3/6* est spécifique de la voie BMP, *Alk4/5/7* de la voie Activine/Nodal et *Alk1/2* des deux voies de signalisation. De la même manière, le récepteur de type II *BMPRII* serait spécifique de la voie BMP, *TGF- β RII* de la voie Activine/Nodal et *ActRII* des deux voies de signalisation.

Au niveau intracellulaire, les deux voies de signalisation partagent un Co-Smad, le *Smad4*, ainsi qu'un I-Smad, le *Smad6/7*. Enfin, il existe deux R-Smad chez l'amphioxus : le *Smad1/5/8* et le *Smad2/3*. De la même manière, on peut supposer que le *Smad1/5/8* participe à la signalisation de la voie BMP tandis que le *Smad2/3* participe à la signalisation de la voie Activine/Nodal.

II.1.a - Patrons d'expression des gènes de la voie BMP au cours de l'induction neurale

Aucun patron d'expression des gènes codant pour les récepteurs de la famille TGF- β n'a pour le moment été publié. En ce qui concerne les ligands de la voie de signalisation BMP, l'expression de quatre d'entre eux a été étudiée (à savoir *BMP2/4*, *BMP5-8*, *ADMP* et *BMP3/3b*). Aucun de ces quatre ligands n'est exprimé au stade blastula. Au stade gastrula précoce et gastrula, *BMP2/4* et *BMP5-8* sont exprimés dans l'ensemble du mésendoderme (Fig. 29A-B). *ADMP* est exprimé uniquement dans la partie dorsale du mésendoderme au stade gastrula précoce puis dans la lèvre blastoporale et dans l'ectoderme dorsal au stade gastrula (Fig. 29D) (Panopoulou et al., 1998; Yu et al., 2007). En ce qui concerne *BMP3/3b*, les auteurs rapportent une forte expression dans l'ensemble du mésendoderme ainsi qu'une faible expression dans l'ectoderme au stade gastrula (Sun et al., 2010). Au cours du développement précoce, *Smad1/5/8* et *Smad4* sont exprimés de manière ubiquitaire jusqu'au stade neurula d'après les données d'hybridation *in situ* (Yu et al., 2011).

L'étude de l'activation de la voie BMP au cours du développement embryonnaire est possible en analysant la localisation d'une forme phosphorylée particulière de *Smad1/5/8* par immunohistochimie. De manière intéressante, bien que l'expression la plus précoce des différents BMP étudiés ne soit observée qu'à partir du stade gastrula précoce, la voie BMP est active dès le stade deux cellules. Au stade blastula, à l'exception de quelques cellules, le signal BMP est actif dans tout l'embryon y compris le futur ectoderme. Enfin, il est intéressant de noter l'absence de *Smad1/5/8* phosphorylé dans une partie de l'ectoderme dorsal au stade gastrula, territoire ectodermique présomptif de la plaque neurale (Kozmikova et al., 2013).

II.1.b - Patrons d'expression des gènes codant pour les antagonistes de la voie de signalisation BMP au cours du développement embryonnaire précoce

Comme décrit précédemment, *Chordin* est exprimé à partir du stade gastrula précoce dans l'ectoderme dorsal ainsi que dans la partie mésendodermique de la future lèvre blastoporale dorsale. L'expression de *Chordin* s'étend au mésendoderme dorsal au stade gastrula (Yu et al., 2007).

Cerberus est un antagoniste particulier du signal BMP, puisqu'il est également un inhibiteur des voies Nodal et Wnt chez le xénope (Piccolo et al., 1999). Chez l'amphioxus, il est exprimé à partir du stade gastrula dans le mésendoderme dorsal antérieur, partie du mésendoderme situé sous l'ectoderme dorsal antérieur considéré comme la partie antérieure du neuroectoderme (Le Petillon et al., 2013; Onai et al., 2010). Cette expression est similaire à ce qui a pu être observé chez les vertébrés au cours de la gastrulation (Piccolo et al., 1999).

De manière étonnante, les patrons d'expression de *Chordin* et de *Cerberus* étaient les seuls patrons d'expression connus d'antagonistes de la voie BMP au commencement de ma thèse. En effet, en ce qui concerne *Noggin*, son expression n'est pas détectable par hybridation *in situ* malgré une présence dans des banques d'EST (Expressed Sequence Tag) (Yu et al., 2007). Pour cette raison j'ai étudié l'expression de *NBL1* (également appelé *Dan*), de *Gremlin* et de *Follistatin* et ai montré qu'aucun d'entre eux ne possèdent une expression précoce suggérant un possible rôle au cours de l'induction neurale (Le Petillon et al., 2013) (voir la partie Résultats).

II.1.c - Patrons d'expression des gènes de la voie Activine/Nodal au cours de l'induction neurale

Chez l'amphioxus, les études de relations d'orthologie permettent de supposer qu'il existe huit ligands pouvant participer à la signalisation de la voie Activine/Nodal., à savoir *Nodal*, *Vg1*, *Lefty*, *TGF- β* , *GDF1/3*, *Activin* et *Inhibin* (Satou et al., 2008). Aucune étude n'a été réalisée chez l'amphioxus concernant l'expression de *TGF- β* , *GDF1/3* et *Inhibin*. En ce qui concerne *Activin*, une étude rapporte que si ce gène est exprimé au cours du développement, quel que soit le stade étudié, son expression est trop faible pour être détectée, que ce soit par hybridation *in situ* ou par RT-PCR (Onai et al., 2010). *Vg1* est exprimé de manière ubiquitaire jusqu'au stade gastrula, stade auquel son expression est restreinte à l'ectoderme et au mésendoderme dorsal de l'embryon (Onai et al., 2010). *Nodal* possède un patron d'expression très proche de celui de *Vg1* jusqu'au stade gastrula, à l'exception d'une expression restreinte au pôle animal au stade blastula (Onai et al., 2010). *Lefty*, un antagoniste de *Nodal* chez les vertébrés, est exprimé à partir du stade blastula dans certaines cellules, avant d'être exprimé dans les mêmes territoires que *Nodal* et *Vg1* au cours de la gastrulation (Onai et al., 2010; Yu et al., 2007).

II.2 - LA VOIE DE SIGNALISATION FGF – PATRONS D'EXPRESSIONS DES FGFs AU COURS DE L'INDUCTION NEURALE

Chez l'amphioxus, il existe un seul récepteur aux FGFs. Au cours du développement, *FGFR* est exprimé dans tout l'embryon à l'exception de l'épiderme (Bertrand et al., 2011b). Cependant il semble qu'au cours de la gastrulation il soit exprimé de manière plus importante dans le mésendoderme antérieur (Bertrand et al., 2011b).

Il existe trois isoformes d'épissage de *FGFR* chez l'amphioxus et chacune d'entre elles possède un patron d'expression qui semble ubiquitaire jusqu'au stade gastrula. Cependant une étude de l'expression de ces trois isoformes par PCR quantitative montre des profils d'expression différents en fonctions des stades de développement (Belgacem, écriture du manuscrit en cours).

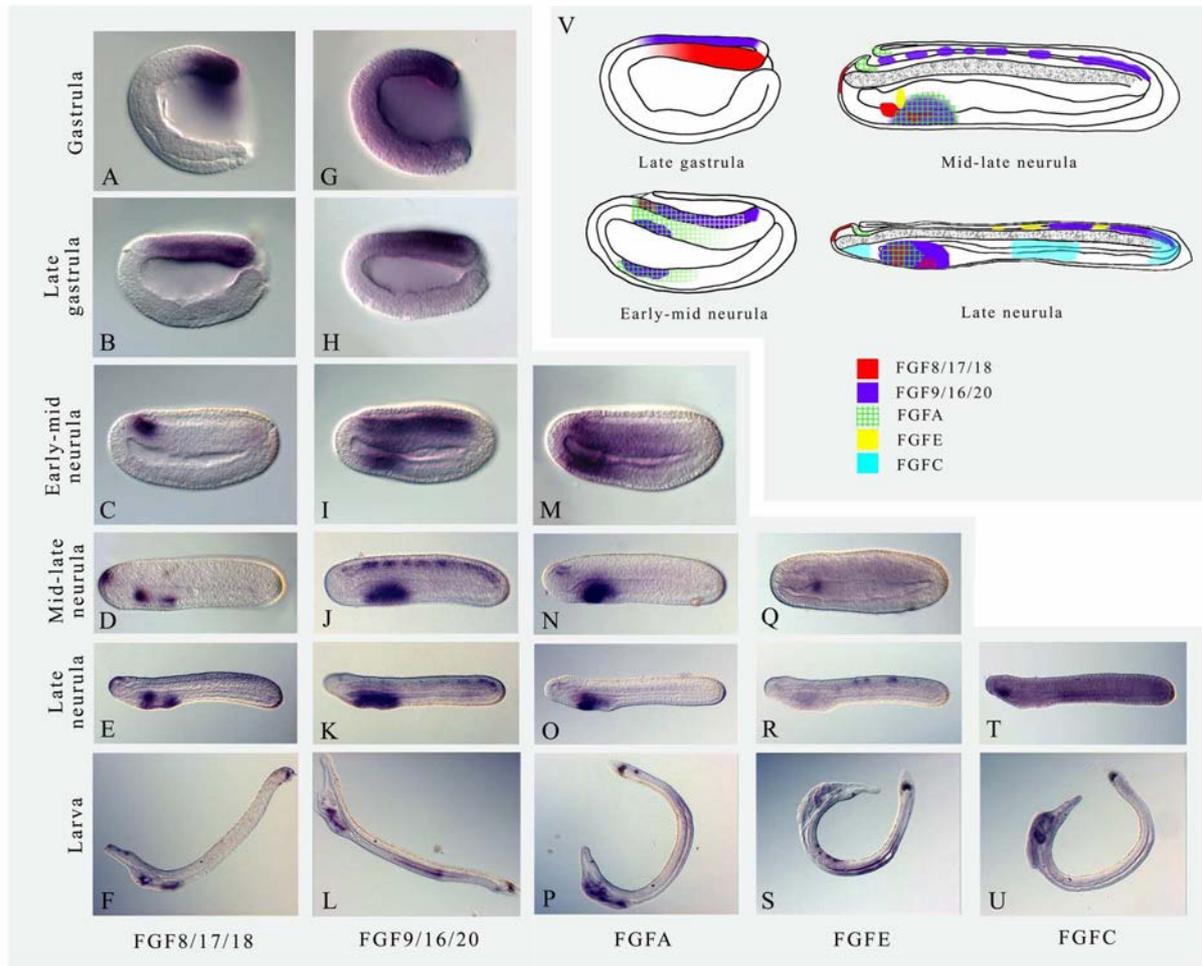


Figure 31 : Patterns d'expression des FGFs au cours du développement embryonnaire.

Patron d'expression de *FGF8/17/18* du stade gastrula au stade larvaire (A-F) et de *FGF9/16/20* (G-L) du stade gastrula au stade larve. Patron d'expression de *FGFA* (*FGF7/10/22*) du stade neurula au stade larve (M-P). Patron d'expression de *FGFE* (*FGF4/5/6*) du stade neurula tardive au stade larve (Q-S). Patron d'expression de *FGFC* (*FGF19/21/23*) du stade pré-buccal au stade larve (T-U). (V) : représentation schématique de l'expression de *FGF8/17/18*, *FGF9/16/20*, *FGFA*, *FGFE* et *FGFC* aux stades gastrula tardive, neurula, neurula tardive et pré-buccal. D'après (Bertrand et al., 2011b). Seuls les stades de développement auxquels une expression régionalisée est détectée sont présentés.

Chez les vertébrés, les ligands FGF sont subdivisés en huit sous-familles (Oulion et al., 2012). L'amphioxus possède huit FGFs, l'étude des relations d'orthologie par phylogénie ayant permis de clairement identifier uniquement trois FGFs, à savoir les *FGF1/2*, *FGF8/17/18/24* et *FGF9/16/20*. En ce qui concerne les autres FGFs, leurs positions phylogénétiques n'étant pas soutenues par phylogénie moléculaire, ils ont été nommés *FGFA*, *FGFB*, *FGFC*, *FGFD*, et *FGFE*. Cependant, l'étude de conservation de synténie a permis d'identifier *FGFA* comme l'orthologue putatif des *FGF7*, *10* et *22*; *FGFB* comme l'orthologue de *FGF3*; *FGFC* comme l'orthologue des *FGF19*, *21* et *23*; *FGFE* comme l'orthologue de *FGF4*, *5* et *6* (Bertrand et al., 2011b; Oulion et al., 2012). Il est donc supposé dans ces conditions que le *FGFD* de l'amphioxus soit l'orthologue des *FGF11*, *12*, *13* et *14*, puisqu'il n'est pas une duplication spécifique de l'un des FGFs d'amphioxus.

L'expression de deux FGFs, à savoir *FGFB* et *FGFD*, semble être trop faible pour pouvoir être détectée par hybridation *in situ*. Au contraire, *FGF1/2* est exprimé de manière ubiquitaire tout au long du

développement, sauf dans l'épiderme. *FGFA*, *FGFE* et *FGFC* ne sont respectivement exprimés qu'à partir des stades neurula, neurula tardive et pré-buccal (Fig. 31) (Bertrand et al., 2011b).

Bien qu'aucune expression n'ait été rapportée avant le stade gastrula, deux FGFs possèdent des patrons d'expression suggérant des rôles éventuels au cours de l'induction neurale, ou tout du moins au cours de la mise en place de la plaque neurale. En effet, *FGF8/17/18* est exprimé au stade gastrula dans le mésendoderme dorsal postérieur, expression conservée au stade neurula dans le mésoderme postérieur, territoire en partie sous-jacent au neuroectoderme. *FGF9/16/20* est quant à lui exprimé de manière ubiquitaire mais avec un niveau d'expression plus important dans la partie la plus postérieure de l'ectoderme dorsal au stade gastrula, puis dans la plaque neurale au cours de la neurulation (Fig. 31) (Bertrand et al., 2011b).

III - ROLE DES VOIES DE SIGNALISATION BMP, FGF ET ACTIVINE/NODAL AU COURS DE L'INDUCTION NEURALE CHEZ L'AMPHIOXUS – DONNEES FONCTIONNELLES

A l'exception des expériences menées par l'équipe de Tung il y a de cela un demi-siècle, aucune étude portant directement sur l'induction neurale chez l'amphioxus n'a été publiée. Cependant, des expériences concernant le rôle embryonnaire des voies BMP, FGF ainsi que Activine/Nodal permettent un certain nombre d'observations pouvant participer en partie à la compréhension de ce mécanisme.

III.1 - ETUDE DU ROLE DE LA VOIE BMP AU COURS DU DEVELOPPEMENT PRECOCE

La voie de signalisation BMP est impliquée dans une multitude de mécanismes développementaux. L'étude de cette voie de signalisation a permis, notamment par gain de fonction, de souligner le rôle que pourrait avoir le signal BMP au cours de l'induction neurale chez l'amphioxus. Un traitement d'embryons d'amphioxus au zBMP4 (protéine BMP4 de poisson zèbre) au stade blastula induit d'une part une perte (partielle) de l'expression de *SoxB1a* et d'autre part l'expression ectopique d'*AP-2* dans tout l'ectoderme, suggérant une différenciation de l'ensemble de l'ectoderme en épiderme (Fig. 32, 33B) (Yu et al., 2008a; Yu et al., 2007). Cependant, l'augmentation du signal BMP au cours du développement induit une ventralisation de l'embryon visible au stade neurula par la perte de l'expression du marqueur de mésoderme axial dorsal *Chordin* et par l'expression du marqueur de mésoderme ventral *Hex* dans la partie dorsale de l'embryon (Fig. 32) (Yu et al., 2007). Ces résultats ont par la suite été confirmés soit par traitement au hBMP2 (protéine BMP2 humaine) (Kozmikova et al., 2013), soit par microinjection de l'ARNm de *BMP2/4* d'amphioxus (Onai et al., 2010). On peut également noter l'expansion de l'activité de Smad1/5/8 dans le territoire dorsal de l'embryon au cours du développement par immunohistochimie suite à une activation ectopique de la voie BMP (Kozmikova et al., 2013; Lu et al., 2012).

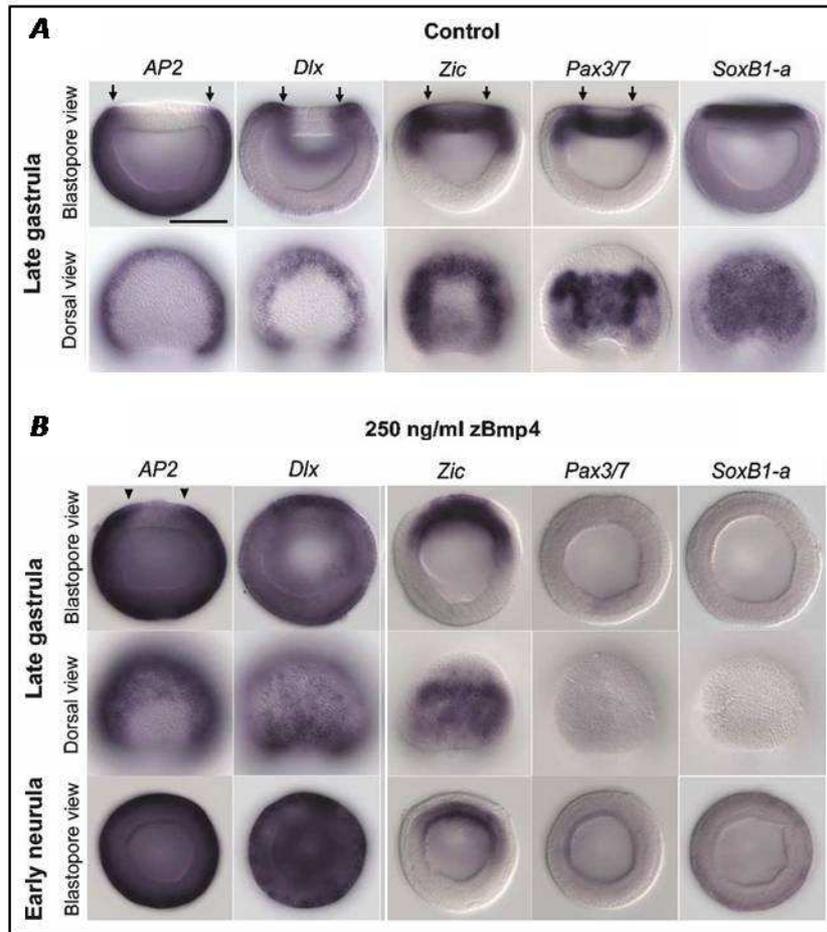


Figure 33 : Effet de l'augmentation ectopique de la voie de signalisation BMP sur le développement embryonnaire.

(A) : étude par hybridation *in situ* de l'expression des gènes *AP-2*, *Dlx*, *Zic*, *Pax3/7* et *SoxB1a* (*Sox1/2/3*) au stade gastrula tardive. (B) : étude par hybridation *in situ* de l'expression des gènes *AP-2*, *Dlx*, *Zic*, *Pax3/7* et *SoxB1a* (*Sox1/2/3*) au stade gastrula tardive et au stade neurula suite au traitement au zBMP4 au stade blastula. Les flèches (A) et la tête de flèches (B) indiquent la limite médiane de l'expression des gènes dans l'ectoderme. Barre d'échelle : 50µm. D'après (Yu et al., 2008a).

Dans ce contexte de ventralisation de l'embryon, la différenciation de l'ectoderme dorsal en épiderme peut être due soit à l'activation de la voie BMP dans cette région, soit à la perte des signaux inducteurs de tissu neural au cours du développement.

L'observation de l'expression des gènes *Pax3/7* et *Zic* (*Zic1-5*) permet une interprétation plus précise de ces résultats. *Pax3/7* est exprimé au stade gastrula dans le mésendoderme dorsal puis au stade gastrula tardive dans le mésendoderme axial et paraxial dorsal et dans les bords de la plaque neurale (Holland et al., 1999; Yu et al., 2008a). *Zic* est exprimé à partir du stade gastrula dans la partie dorsale de l'ectoderme ainsi que dans le mésendoderme. Au stade gastrula tardive, l'expression neurale de *Zic* est réduite à la partie antérieure et aux bords de la plaque neurale (Gostling et Shimeld, 2003; Yu et al., 2008a).

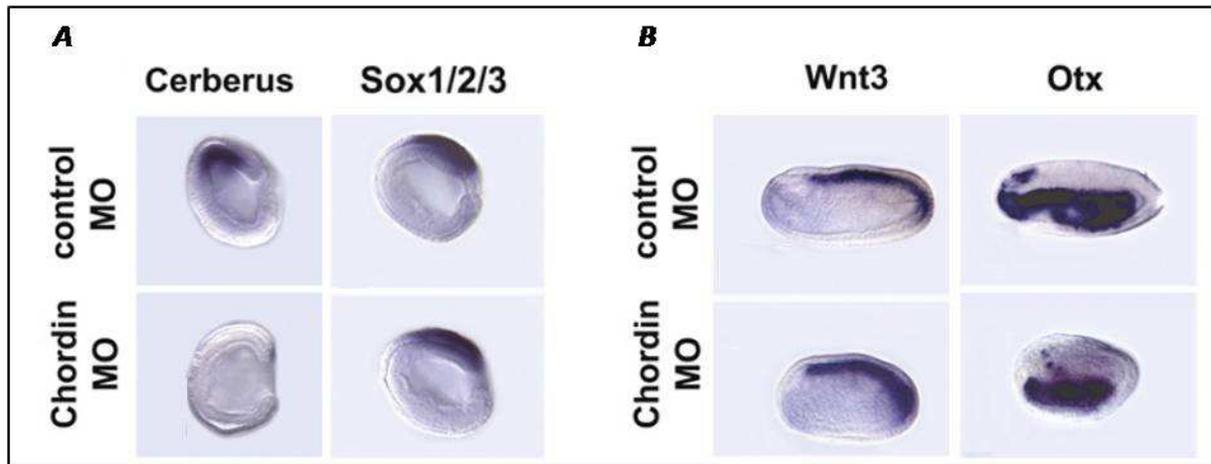


Figure 34 : Effet de l'inhibition de *Chordin* sur l'établissement du tissu neural antérieur.

Etude par hybridation *in situ* de l'expression des gènes *Cerberus* et *Sox1/2/3* au stade gastrula (A) et *Wnt3* et *Otx* au stade neurula (B), suite à l'inhibition de *Chordin* par microinjection de morpholino anti-*Chordin*. D'après (Onai et al., 2010).

Dans les embryons traités au stade blastula au zBMP4, on observe que les marqueurs épidermiques tels qu'*AP-2* et *Dlx* sont exprimés dans l'ensemble de l'ectoderme au stade gastrula tardive. Ceci suggère que l'ensemble de l'ectoderme est devenu épidermique. Cependant, il est intéressant de noter que l'expression d'*AP-2* est plus faible au niveau de la partie dorsale de l'ectoderme dans les embryons traités. Ce territoire ectodermique exprime également *Zic*. Puisqu'un autre marqueur des bords de la plaque neurale, *Pax3/7*, n'est pas exprimé dans l'ectoderme des embryons traités, il est possible d'interpréter l'expression de *Zic* comme une expression correspondant à du tissu neural antérieur (Fig. 33) (Yu et al., 2008a). Ceci suggère que dans ces conditions de ventralisation de l'embryon suite à l'augmentation du signal BMP, il y a induction neurale et que le signal BMP participe à la perte de cette identité neurale au cours du développement.

Dans le but d'étudier plus précisément l'effet d'une augmentation du signal BMP au cours du développement embryonnaire, l'expression de *Chordin* a été réprimé par microinjection de morpholinos anti-*Chordin*. Dans ce cas, l'expression de *SoxB1a* dans l'ectoderme dorsal au stade gastrula n'est pas affectée, suggérant qu'il n'y a pas eu de perturbation de l'induction neurale (Fig. 34A) (Onai et al., 2010).

Au stade neurula, dans les embryons sauvages, les marqueurs neuraux *Otx* et *Wnt3* possèdent un patron d'expression complémentaire dans la plaque neurale. *Otx* s'exprime dans la partie la plus antérieure de la plaque, territoire présomptif de la vésicule cérébrale, tandis que *Wnt3* est exprimé dans la partie de la plaque neurale postérieure à l'expression d'*Otx* (Fig. 34B) (Onai et al., 2010; Schubert et al., 2001).

Dans les embryons déprimés de *Chordin*, le territoire neural exprimant *Otx* est fortement réduit tandis que l'expression de *Wnt3* dans le tube neural est conservée (Fig. 34B) (Onai et al., 2010). Cette observation suggère que l'inhibition du signal BMP est requise pour la mise en place ou le maintien de l'identité neurale antérieure. Cependant, il est à noter que l'expression mésendodermique de *Cerberus* au stade gastrula est perdue suite à l'inhibition de *Chordin*. Chez les vertébrés *Cerberus* a un rôle important au cours de la mise en place du tissu neural antérieur (Bouwmeester et al., 1996; Piccolo et al., 1999). De plus, *Cerberus* est également un inhibiteur du signal BMP (Piccolo et al.,

1999). Il est donc difficile de dissocier la probable implication de l'inhibition des expressions de *Cerberus* et de *Chordin* dans ce contexte de perte de tissu neural antérieur.

Si le rôle de la voie de signalisation BMP a principalement été étudié par gain de fonction, il a également été montré qu'il était possible de bloquer le signal BMP en utilisant un inhibiteur chimique, la dorsomorphine (Yu et al., 2008b). Il a tout d'abord été montré qu'un traitement à la dorsomorphine permet une réduction, si ce n'est une perte, de la phosphorylation de Smad1/5/8 (Kozmikova et al., 2013; Lu et al., 2012), confirmant ainsi une inhibition effective de la voie de signalisation BMP. L'observation de l'expression des marqueurs neuraux *SoxB1a* et *Brn1/2/4*, ainsi que du marqueur épidermique *AP-2* après traitement à la dorsomorphine au stage blastula suggère que l'inhibition de la voie BMP entraîne une expansion des domaines neuraux au dépend du domaine épidermique (Kozmikova et al., 2013).

L'ensemble de ces résultats indique que, comme chez les vertébrés, une activation de la voie BMP entraîne une ventralisation de l'embryon accompagnée d'une perte de tissu neural au profit d'un destin épidermique. Au contraire une diminution de ce signal entraînerait une dorsalisation de l'embryon accompagnée d'une expansion du territoire neural. De plus il semble que la nécessité de l'inhibition au moins partielle du signal BMP au cours du développement de la plaque neurale antérieure soit un caractère partagé avec les vertébrés.

III.2 - ETUDE DU ROLE DE LA VOIE ACTIVINE/NODAL AU COURS DU DEVELOPPEMENT PRECOCE

L'étude majeure portant sur le rôle de la voie de signalisation Activin/Nodal chez l'amphioxus est une étude montrant une opposition de cette voie avec la voie de signalisation BMP au cours de la mise en place des axes antéropostérieur et dorsoventral (Onai et al., 2010).

Afin de bloquer le signal Activine/Nodal, les embryons ont été traités au SB505124 (DaCosta Byfield et al., 2004), un inhibiteur chimique de cette voie de signalisation. Un traitement au stade blastula entraîne la perte d'expression au stade gastrula des marqueurs dorsaux tels que *SoxB1a* ou *Chordin* tandis que l'expression du marqueur d'ectoderme ventral *Evx* est étendue dorsalement. L'absence d'expression de *Wnt3* au stade neurula tardive confirme l'absence de mise en place de tissu neural (Fig. 35A) (Onai et al., 2010). Ceci indique que l'inhibition du signal Activine/Nodal entraîne une ventralisation de l'embryon, tout comme entraîne une augmentation du signal BMP.

De manière intéressante, lorsque le signal Activine/Nodal est inhibé au stade gastrula précoce, il y a formation des structures dorsales tels que les somites ou le tube neural, comme le montrent les expressions de *Wnt3* et d'*Actine* (Fig. 35B). Ceci suggère que l'effet du traitement est trop tardif pour ventraliser l'embryon, ou, si l'on fait l'hypothèse que le signal Activine/Nodal est un signal pro-neural, que l'induction neurale a eu lieu avant le traitement, c'est-à-dire avant le stade gastrula précoce (Onai et al., 2010).

Comme précisé précédemment, *Cerberus* est un antagoniste de plusieurs voies de signalisation, y compris de la voie de signalisation Nodal chez les vertébrés (Piccolo et al., 1999). La surexpression de *Cerberus* chez l'amphioxus semble confirmer une fonction inhibitrice de la voie Nodal. En effet, la

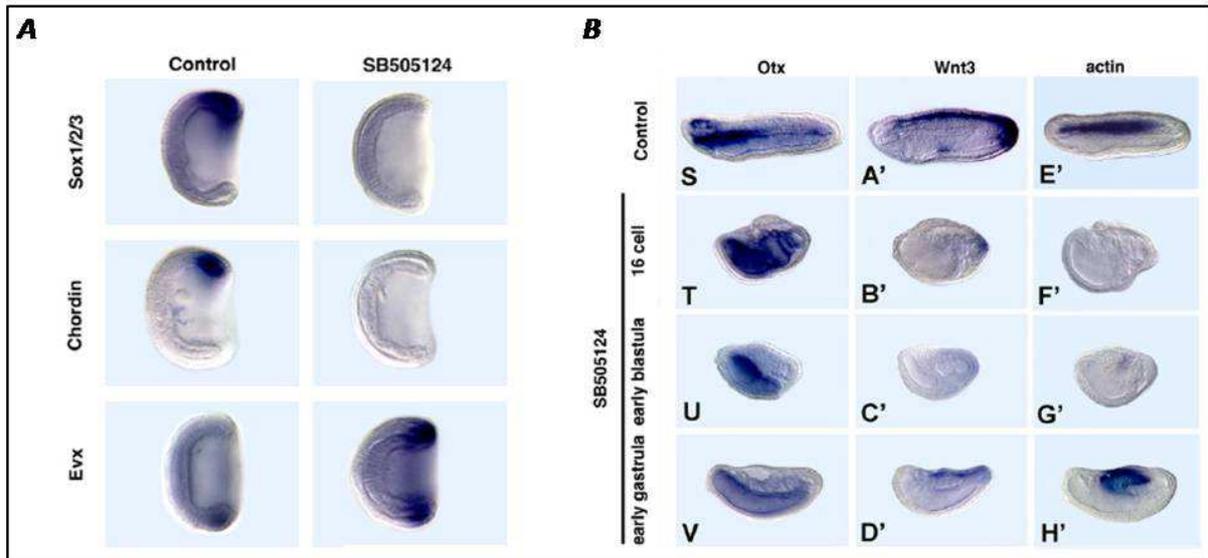


Figure 35 : Effet de l'inhibition de la voie de signalisation Activine/Nodal sur le développement embryonnaire.

(A) : étude par hybridation *in situ* de l'expression des gènes *SoxB1a* (*Sox1/2/3*), *Chordin* et *Evx* au stade gastrula suite au traitement au SB505124 au stade blastula. (B) : étude par hybridation *in situ* de l'expression des gènes *Otx*, *Wnt3* et *Actine* au stade pré-buccal suite au traitement au SB505124 aux stades 16 cellules, blastula précoce ou gastrula précoce. D'après (Onai et al., 2010).

microinjection de *Cerberus* induit un phénotype ventro-postérieur illustré par la perte d'expression des marqueurs neuraux *Wnt3* et *Otx* dans l'ectoderme, mais également par la perte d'expression du mésoderme dorsal *Brachyury* ou du marqueur épidermique antérieur *FoxQ2* (Onai et al., 2010).

Dans cette même étude, dans le but de montrer l'opposition des voies BMP et Activine/Nodal, les auteurs ont utilisé un traitement à la protéine Activine (protéine humaine Activine A) afin d'augmenter le signal Activine/Nodal au cours du développement embryonnaire. Le traitement à l'Activine induit une perte de l'expression au stade gastrula du marqueur ventral *Evx* tandis que l'expression des marqueurs dorsaux *Goosecoid* et *Chordin* est étendue ventralement, que ce soit dans le mésendoderme ou dans l'ectoderme (Fig. 36A). Ceci montre que le traitement Activine induit une dorsalisation de l'embryon, au contraire de l'inhibition de la voie de signalisation Activine/Nodal. Rappelons qu'au stade neurula, les marqueurs neuraux *Otx* et *Wnt3* possèdent un patron d'expression complémentaire dans la plaque neurale. *Otx* s'exprime dans la partie la plus antérieure de la plaque tandis que *Wnt3* est exprimé dans la partie postérieure à *Otx* de la plaque neurale. De manière intéressante, dans les embryons traités à l'Activine, *Otx* et *Wnt3* sont exprimés dans l'ensemble de l'ectoderme et ils gardent leur patron complémentaire. Ceci montre que l'activation du signal Nodal induit une différenciation de l'ensemble de l'ectoderme en tissu neural sans modification apparente du patterning antéro-postérieur (Fig. 36B) (Onai et al., 2010).

L'ensemble de ces résultats suggère que le signal Activine/Nodal pourrait être un acteur de l'induction neurale chez l'amphioxus. Cependant, tout comme pour le signal BMP, il n'est pas possible dans les expériences de gain et perte de fonction du signal Activine/Nodal *in vivo* de dissocier son rôle au cours du patterning dorsoventral d'une activité inductrice de tissu neural.

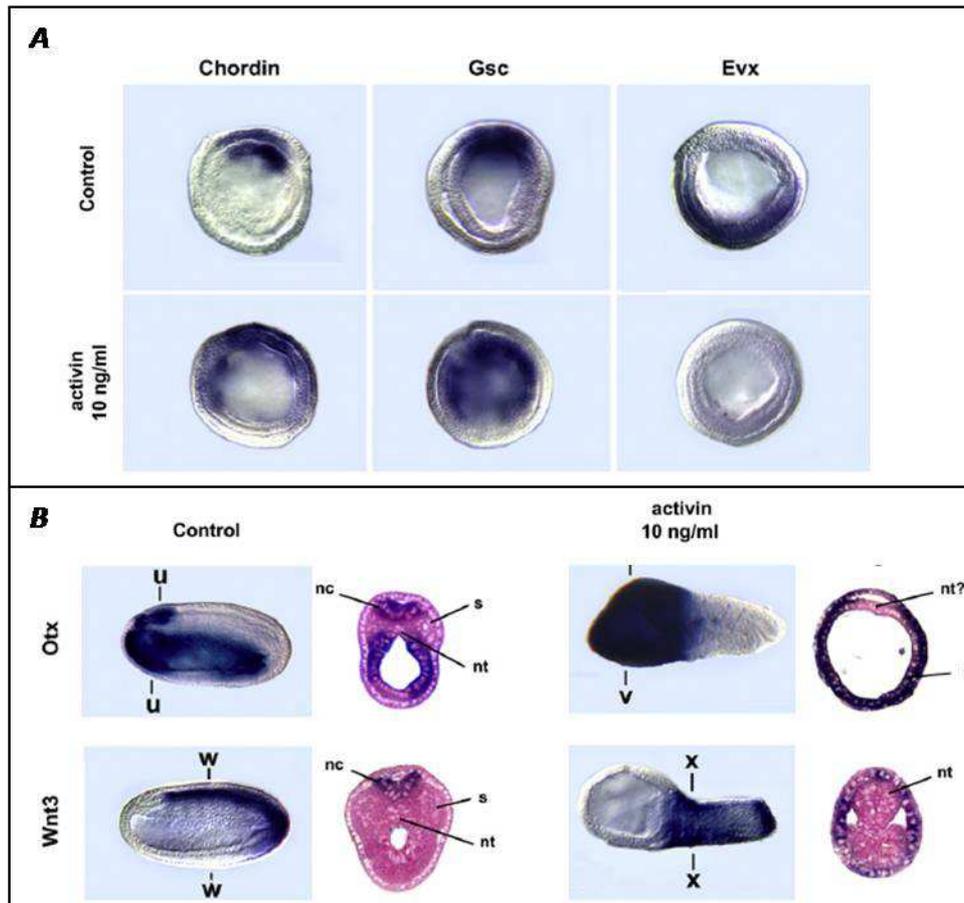


Figure 36 : Effet de l'activation ectopique de la voie de signalisation Activine/Nodal sur le développement embryonnaire.

(A) : étude par hybridation *in situ* de l'expression des gènes *Chordin*, *Gooseoid* (*Gsc*) et *Evx* au stade gastrula (coupe optique blastoporale) suite au traitement à l'Activine au stade blastula. (B) : étude par hybridation *in situ* de l'expression des gènes d'*Otx* et *Wnt3* au stade neurula suite au traitement à l'Activine aux stades blastula. Le niveau des coupes transversales est localisé pour les embryons contrôles marqués *Wnt3* et *Otx* et pour les embryons traités marqués *Wnt3* et *Otx* respectivement avec les annotations u, w, v et x. nc : tube neural ; nt : notochorde ; s : somite. D'après (Onai et al., 2010).

III.3 - ETUDE DU ROLE DE LA VOIE FGF AU COURS DU DEVELOPPEMENT PRECOCE

Chez l'amphioxus, il n'existe qu'une étude portant sur la voie de signalisation FGF d'un point de vue fonctionnelle. Cette étude a permis d'identifier un rôle majeur du signal FGF au cours de la formation des somites antérieures. En effet, en inhibant avant la gastrulation le signal FGF à l'aide de l'inhibiteur chimique SU5402, il a été observé une perte des trois somites antérieures au cours du développement embryonnaire.

En ce qui concerne la formation du tissu neural, il a également été montré au cours de cette étude que l'inhibition de la voie FGF ou de la voie MAPK au stade blastula ne bloque pas l'expression de *Neurogenin*, un marqueur de la plaque neurale. De la même manière, l'inhibition précoce (stade 4-8 cellules) du signal FGF qui altère fortement la gastrulation (observation allant dans le sens d'une implication du signal FGF au cours des mouvements de gastrulation comme chez les vertébrés (Amaya et al., 1991; Ciruna et al., 1997; Sun et al., 1999)) n'inhibe pas complètement l'expression de

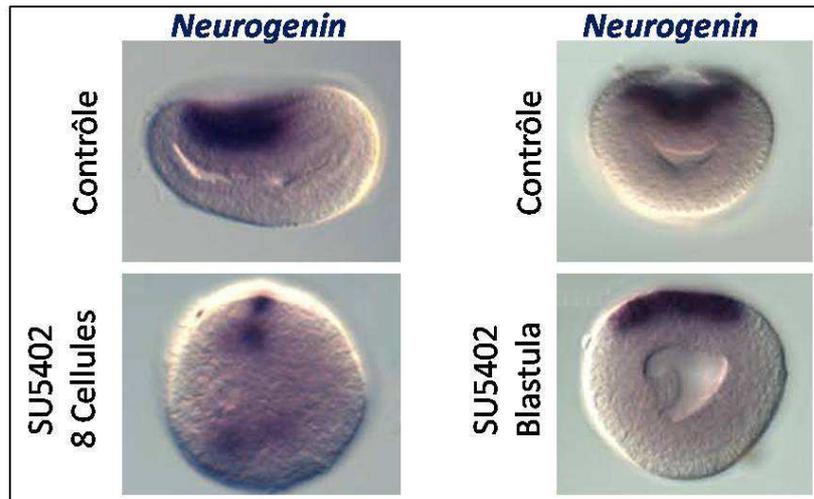


Figure 37 : Effet de l'inhibition du signal FGF au cours de la neurulation.

Etude de l'expression de *Neurogenin* suite à l'inhibition du signal FGF par traitement au SU5402 (50 μ M) aux stades 8 cellules ou blastula. Les embryons de droite sont en vue blastoporale. L'expression de *Neurogenin* indique que la formation de la plaque neurale n'est pas affectée par un traitement au SU5402 au stade blastula. Les embryons de gauche sont en vue latérale. L'expression de *Neurogenin* dans quelques cellules indique qu'un traitement au SU5402 au stade 8 cellules ne bloque pas totalement la mise en place de tissu neural. D'après (Bertrand et al., 2011b).

Neurogenin qui dans ces embryons est exprimé dans quelques cellules (Fig. 37) (Bertrand et al., 2011b). Ceci suggère que, chez l'amphioxus, le signal FGF n'est pas impliqué dans l'induction neurale.

IV - CONCLUSION

L'ensemble de ces observations nous indique que l'amphioxus semble posséder une structure organisatrice homologue de l'organisateur des vertébrés qui participe à l'induction neurale. D'un point de vue moléculaire, la modulation des voies de signalisation BMP et Activine/Nodal entraîne des changements de patterning dorsoventral accompagnés de changements de destin ectodermique. Cependant, il n'est pas possible de clairement définir si ces voies sont impliquées directement ou non dans l'induction neurale. De manière intéressante, bien que les données ne soient que très partielles, le signal FGF ne semble pas être un acteur de l'induction neurale. Ceci suggère soit que les mécanismes d'induction neurale chez l'amphioxus impliquent des signaux inducteurs différents du signal FGF, soit que le modèle par défaut comme il l'avait été proposé par Hemmati-Brivanlou et Melton est une hypothèse envisageable chez l'amphioxus.

INTRODUCTION - BILAN

90 ans après la proposition du concept d'induction neurale par Hilde Mangold et Hans Spemann (1924), l'étude des premières étapes de la formation du système nerveux central chez les vertébrés a mis en évidence un mécanisme particulièrement complexe impliquant plusieurs voies de signalisation. Cependant, l'interconnexion de ces différentes voies de signalisation au cours de l'induction neurale, mais également au cours de mécanismes tels que la mise en place des axes de développement embryonnaire, a rendu peu aisé l'interprétation de leurs fonctions respectives dans ces différents processus. Il apparaît tout de même que les voies de signalisation BMP et FGF aient chacune un rôle majeur au cours de l'induction neurale chez les vertébrés. Cependant, la fonction précise de ces deux voies de signalisation semble différer en fonction des modèles d'études utilisés. Chez les chordés non vertébrés, les seules études à l'échelle moléculaire portant sur l'induction neurale ont été réalisées chez les tuniciers chez qui la voie de signalisation FGF est particulièrement impliquée. L'induction neurale ne nécessite pas l'inhibition du signal BMP contrairement aux vertébrés. Cette divergence peut être expliquée par l'absence chez les tuniciers d'une structure homologue à l'organisateur des vertébrés et à un mode de développement particulier à cette lignée de chordés.

Si depuis la proposition du modèle par défaut la communauté scientifique n'a eu de cesse de chercher à définir un modèle unique d'induction neurale chez les vertébrés, l'aspect évolutif de ce mécanisme n'a que très peu été envisagé. C'est dans cette optique que s'est inscrit mon travail de thèse.

Résultats et discussion

SOMMAIRE

Résultats et discussion

I -	Etude de l'expression de gènes de la voie de signalisation TGF- β et du gène SoxB1a au cours du développement embryonnaire de l'amphioxus	73
I.1 -	Patrons d'expression des récepteurs aux BMPs	73
I.2 -	Patrons d'expressions des antagonistes extracellulaires de la voie de signalisation BMP	74
I.3 -	Patron d'expression de Vg1 précisé	75
I.4 -	Patron d'expression de SoxB1a revisité	77
II -	Etude fonctionnelle du rôle des voies de signalisation BMP et FGF au cours de l'induction neurale – Résultats préliminaires	79
II.1 -	Inhibition de la voie de signalisation BMP – résultats préliminaires	79
II.1.a -	Inhibition de la voie BMP par inhibition de la signalisation extracellulaire	79
II.1.b -	Inhibition de la voie BMP par inhibition de la signalisation intracellulaire	81
II.1.c -	Conclusion	86
II.2 -	Activation ectopique de la voie de signalisation FGF : résultats préliminaires	86
II.3 -	Activation ectopique de la voie de signalisation FGF dans des embryons déplétés en signal BMP	88
II.4 -	Conclusion générale	89
III -	Regard à partir des céphalochordés sur l'évolution de l'induction neurale dans la lignée des chordés	90
IV -	Analyse et critique des données présentées dans l'article et perspectives expérimentales	117
V -	Données additionnelles sur l'induction neurale chez l'amphioxus	122

Ce chapitre « Résultats et discussion » est divisé en quatre parties distinctes. La première partie présente un certain nombre de résultats concernant l'étude des patrons d'expression de gènes d'intérêt que j'ai dû développer pour les utiliser au cours de mon étude sur l'induction neurale (que ce soient des gènes des voies de signalisation TGF- β pouvant être impliqués au cours de l'induction neurale ou le marqueur pan-neural *SoxB1a*). La seconde partie porte sur les résultats préliminaires concernant l'étude fonctionnelle des voies de signalisation BMP et FGF au cours de l'induction neurale. Dans la troisième partie, je présente dans un premier temps sous forme d'article les données que j'ai obtenues sur le mécanisme d'induction neurale chez l'amphioxus. Cet article est suivi d'une analyse critique des résultats présentés, de l'exposé d'expériences complémentaires envisagées ainsi que de résultats additionnels obtenus au cours de cette étude et non présentés dans l'article. Enfin, dans la quatrième partie, je présente dans un premier temps des données additionnelles relatives à l'aspect temporel de l'induction neurale chez l'amphioxus, et dans un second temps une technique expérimentale prometteuse pour l'étude de ce mécanisme.

I - ETUDE DE L'EXPRESSION DE GENES DE LA VOIE DE SIGNALISATION TGF-B ET DU GENE SOXB1A AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE L'AMPHIOXUS

Dans ce chapitre, je m'intéresserai à l'expression de gènes codant pour les récepteurs de la famille des TGF- β , pour les ligands de cette famille ainsi que pour leurs antagonistes. En effet, au commencement de ma thèse, l'expression de très peu de ces gènes était connue. La voie de signalisation BMP jouant un rôle central au cours de l'induction neurale chez les vertébrés, il semblait nécessaire de définir dans un premier temps les patrons d'expressions des gènes codant pour les acteurs de cette voie chez l'amphioxus.

I.1 - PATRONS D'EXPRESSION DES RECEPTEURS AUX BMPs

L'amphioxus possèdent trois récepteurs aux TGF- β de type I (*Alk1/2*, *Alk3/6* et *Alk4/5/7*) et trois récepteurs de type II (*BMPRII*, *ActRII* et *TGF β RII*). Parmi ces récepteurs, je me suis plus particulièrement intéressé à l'expression des récepteurs pouvant participer à la signalisation de la voie BMP. Aucune analyse de l'expression de *TGF β RII* n'a été réalisée.

L'analyse de l'expression de *BMPRII* et *ActRII* n'a pas permis d'identifier une expression régionalisée au cours du développement. De la même manière, aucune expression régionalisée des récepteurs *Alk1/2* et *Alk4/5/7* n'a pu être mise en évidence. Il est possible que ces quatre récepteurs soient trop peu exprimés, ne rendant pas possible la détection de l'expression par hybridation *in situ*. Il est également envisageable qu'ils soient exprimés de façon ubiquitaire, ceci ne permettant pas de distinguer une expression du gène ciblé d'un bruit de fond dû à l'hybridation *in situ* elle-même.

Le seul récepteur de la famille TGF- β possédant un patron d'expression régionalisé est *Alk3/6*. *Alk3/6* est exprimé au stade blastula dans les cellules de la partie animale de l'embryon (Fig. 38A) qui participent par la suite à la formation de l'ectoderme. Au cours de la gastrulation, *Alk3/6* est dans un premier temps exprimé dans l'ensemble du mésendoderme postérieur (Fig. 38B, C), mais plus tard,

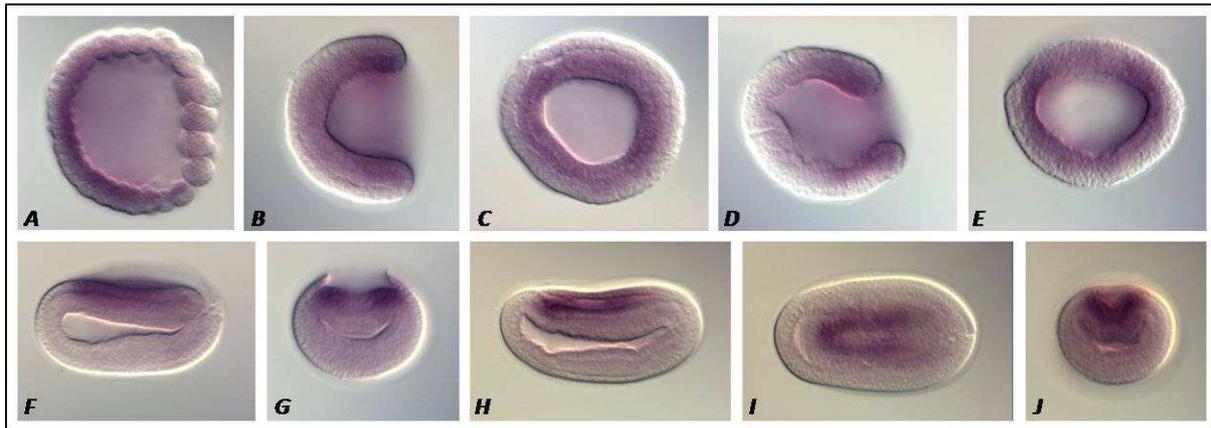


Figure 38 : Patron d'expression du récepteur *Alk3/6*.

(A) : vue latérale au stade blastula. L'expression est restreinte à la partie animale de l'embryon. (B-C) : stade gastrula. *Alk3/6* est exprimé dans l'ensemble du mésendoderme postérieur. (B) vue latérale. (C) : Vue blastoporale. (D-E) : stade gastrula tardive. *Alk3/6* est exprimé dans le mésoderme paraxial et l'endoderme. (D) vue latérale. (E) : vue blastoporale. (F-G) : stade neurula précoce. *Alk3/6* est exprimé au niveau des bords de la plaque neurale. (F) vue latérale. (G) : vue blastoporale. (H-J) : stade neurula. *Alk3/6* est exprimé dans la plaque neurale. (H) vue latérale. (I) : vue dorsale. (J) : vue blastoporale.

l'expression dans le mésendoderme dorsal axial au stade gastrula tardive est perdue (Fig. 38D). Au stade neurula précoce *Alk3/6* est exprimé au niveau des bords de la plaque neurale (Fig. 38F, G) puis au stade neurula également dans la partie antérieure de la plaque neurale (Fig. 38I, J).

L'expression du récepteur de la voie BMP *Alk3/6* au niveau des bordures de la plaque neurale au cours de la neurulation est consistante avec les observations concernant l'implication de la voie de signalisation BMP au cours de la spécification de la limite entre les tissus neuraux et épidermiques, que ce soit chez l'amphioxus (Yu et al., 2008a) ou chez les vertébrés (Patthey et Gunhaga, 2013).

I.2 - PATRONS D'EXPRESSIONS DES ANTAGONISTES EXTRACELLULAIRES DE LA VOIE DE SIGNALISATION BMP

Chez les vertébrés, les antagonistes des BMPs participent à l'induction neurale, leur expression au niveau de l'organisateur et dans le neuroectoderme présomptif bloquant l'activité anti-neurale du signal BMP. Parmi les antagonistes extracellulaires de la voie de signalisation BMP, *Chordin*, *Noggin* et *Follistatin* sont les inhibiteurs du signal BMP les plus impliqués au cours de l'induction neurales chez les vertébrés.

Chez l'amphioxus, seul le patron d'expression de *Chordin* est connu (Yu et al., 2007). Cette étude rapporte également l'identification de *Noggin* dans la banque d'EST (Expressed sequence Tag) utilisée. Cependant, aucune sonde ribonucléique ne permet d'identifier une expression au cours des stades gastrula et neurula. J'ai tout de même cherché à identifier une expression de *Noggin* cette fois-ci du stade 8 cellules au stade larvaire. Cependant, aucune expression n'a été identifiée au cours des différents stades de développement. De la même manière, aucune expression de *Follistatin* n'a pu être détectée au cours du développement précoce. Que ce soit *Noggin* ou *Follistatin*, si ces gènes sont exprimés au cours du développement précoce et plus particulièrement au cours de la gastrulation, leur expression est trop faible pour être détectée par hybridation *in situ*.

Ceci implique que si une activité anti-BMP doit exister au niveau dorsale, chez l'amphioxus elle est portée uniquement (ou principalement) par *Chordin*, tandis que *Noggin* et *Follistatin* doivent jouer d'autres rôles chez l'amphioxus.

J'ai également cherché à identifier si d'autres antagonistes de la voie de signalisation BMP possèdent des patrons d'expression suggérant une activité au cours de l'induction neurale chez l'amphioxus. Je me suis plus particulièrement intéressé aux gènes de la famille NBL1, à savoir *Cerberus*, *Gremlin* et *DAN* (Le Petillon et al., 2013).

Parmi ces trois gènes, le patron d'expression de *Cerberus* était connu (Onai et al., 2010). *Cerberus* est exprimé au stade gastrula dans la partie antérieure du mésendoderme dorsale avant d'être exprimé dans le mésendoderme dorsal paraxial au niveau des somites antérieures au stade neurula précoce. En ce qui concerne *Gremlin*, aucune expression n'est identifiable avant le stade gastrula tardive au cours duquel une expression restreinte est observée dans le mésendoderme ventral. Par la suite, *Gremlin* est exprimé au niveau des bordures de la plaque neurale et dans l'endoderme ventral. Concernant *DAN*, aucune expression n'est identifiable au cours de la gastrulation ou de la neurulation.

Pour une analyse plus précise de l'expression de ces trois gènes, se référer à l'article que nous avons publié et qui est présenté comme annexe n°1 (Identification and expression analysis of BMP signaling inhibitors genes of the DAN family in amphioxus).

A l'exception de *Chordin*, il n'a été identifié à ce jour aucun autre antagoniste extracellulaire de la voie de signalisation BMP possédant un patron d'expression consistant avec une implication au cours de l'induction neurale chez l'amphioxus.

I.3 - PATRON D'EXPRESSION DE Vg1 PRECISE

La première étude du patron d'expression de *Vg1* chez l'amphioxus rapporte une expression ubiquitaire au cours de la blastulation (Onai et al., 2010). La première expression régionalisée est observée au stade gastrula précoce au niveau de l'ectoderme dorsal ainsi que dans la moitié dorsale du mésendoderme. Cependant, l'expression au stade blastula dans cette étude correspond à un stade blastula précoce, aucune expression n'étant rapporté pour des stades de développement plus tardifs avant le début de la gastrulation.

Au cours de mes travaux, j'ai identifié une expression régionalisée de *Vg1* au cours de la blastulation, à un moment du développement précédent de peu le début de la gastrulation (Fig. 39A-D). Bien qu'il soit difficile d'orienter l'embryon à ce stade du développement, il est possible de supposer que l'expression observée de *Vg1* au stade blastula est localisée au niveau de la partie dorsale du pôle végétal, puisque *Vg1* est exprimé au cours de la gastrulation au niveau de la lèvre blastopore dorsale (Fig. 39E). Il est à noter qu'au vu du marquage observé dans les stades embryonnaires précédents le stade blastula, il n'est pas possible de définir clairement si ceci est une expression ubiquitaire ou du bruit de fond.

Chez les vertébrés, *Vg1* est impliqué dans l'induction de la formation du mésoderme (Birsoy et al., 2006). L'expression de *Vg1* chez l'amphioxus dans la partie dorsale du pôle végétal est cohérente avec une probable fonction conservée avec les vertébrés et suppose que l'induction de la formation du mésoderme est effective à la fin du stade blastula. *Vg1* est également impliqué dans l'induction

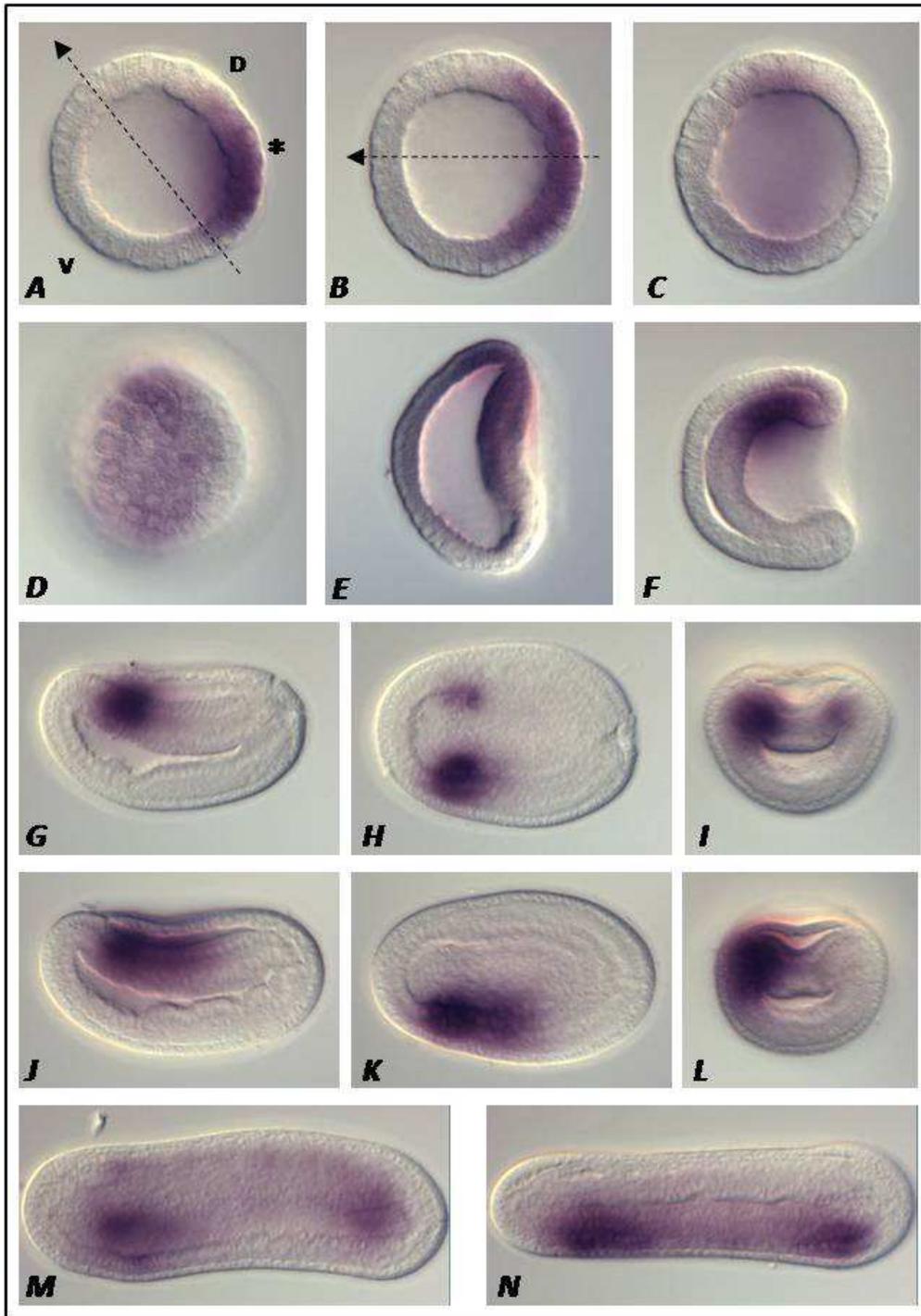


Figure 39 : Patron d'expression de *Vg1*.

(A-D) : stade blastula. *Vg1* est exprimé au niveau de la future lèvre blastoporale dorsale. (A) : vue latérale. (B) : vue dorsale. Les flèches en A et B correspondent à l'orientation végétale-animale de l'embryon. (C-D) : vue depuis la position symbolisée par l'astérisque en A. (D) : focus sur les cellules exprimant *Vg1*. (E) : vue latérale d'une gastrula précoce. *Vg1* est exprimé dans l'ectoderme et dans le mésendoderme dorsal. (F) : vue latérale d'une gastrula. *Vg1* est exprimé dans le mésendoderme dorsal, ainsi que faiblement dans l'ectoderme dorsal. (G-I) : stade neurula précoce. *Vg1* est exprimé dans le mésoderme paraxial antérieur correspondant aux somites antérieures, son expression diminuant dans le mésoderme paraxial droit. (G) : vue latérale. (H) : vue dorsale. (I) : coupe optique d'une vue blastoporale. (J-L) : stade neurula. *Vg1* est exprimé uniquement dans le mésoderme paraxial gauche, cette expression s'étendant plus postérieurement qu'au stade neurula précoce. (J) : vue latérale. (K) : vue dorsale. (L) : coupe optique d'une vue blastoporale. (M-N) : stade neurula tardive. *Vg1* est exprimé dans la partie ventrale des somites gauches les plus antérieurs ainsi que dans les somites gauches les plus postérieurs de l'embryon. (M) : vue latérale. (N) : vue dorsale.

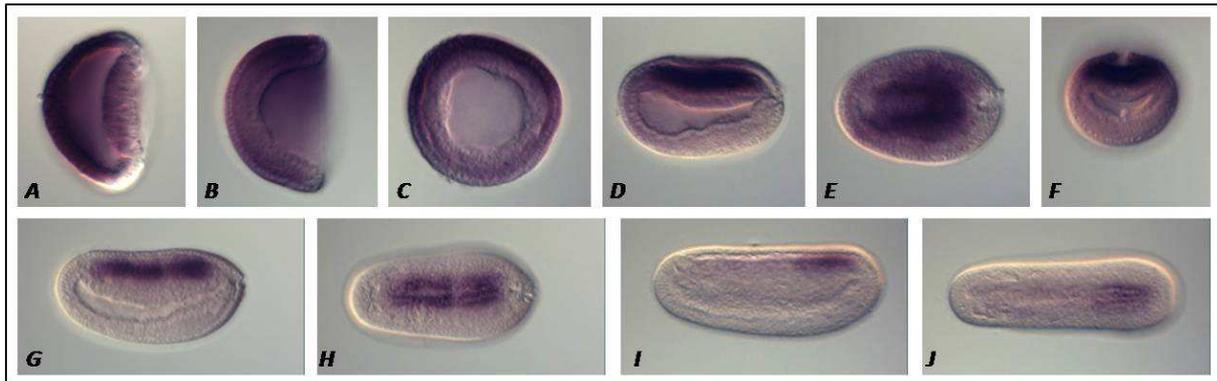


Figure 40 : Patron d'expression de *SoxB1a*.

(A) : stade gastrula précoce. *SoxB1a* est exprimé dans tout l'ectoderme. (B-C) : stade gastrula. *SoxB1a* est exprimé dans tout l'ectoderme, le marquage étant plus fort dans le neuroectoderme que dans l'épiderme. (B) : vue latérale. (C) : vue blastoporale. (D-F) : stade neurula précoce. *SoxB1a* est exprimé dans toute la plaque neurale, le marquage dans l'épiderme est faible. (D) : vue latérale. (E) : vue dorsale. (F) : vue blastoporale. (G-H) : stade neurula. *SoxB1a* est uniquement exprimé au niveau des bordures de la plaque neurale. (G) : vue latérale. (H) : vue dorsale. (I-J) : stade neurula tardive. *SoxB1a* est exprimé dans la partie postérieure de la plaque neurale. (I) : vue latérale. (J) : vue dorsale.

de la formation du nœud de Hensen chez le poulet (Ohta et al., 2006). Si l'on suppose une fonction conservée de *Vg1* chez le poulet et chez l'amphioxus, cela suggère une induction de la formation de l'organisateur putatif chez l'amphioxus à la fin de la blastulation.

I.4 - PATRON D'EXPRESSION DE SOXB1A REVISITE

Précédemment appelé *Sox1/2/3* suite à son identification comme l'orthologue des *Sox1*, 2 et 3 de vertébrés (Holland et al., 2000), ce gène fut renommé par la suite *SoxB1a*. En effet sa position phylogénétique le place au sein de la famille des *SoxB1*. De plus, il a depuis été identifié chez l'amphioxus deux autres gènes paralogues de *SoxB1a* à savoir *SoxB1b* et *SoxB1c*, ces gènes semblant être issus de deux duplications spécifiques à l'amphioxus (Meulemans et Bronner-Fraser, 2007).

La description des patrons d'expression publiés proposent que *SoxB1a* est exprimé au niveau de la plaque neurale présomptive à partir du stade gastrula précoce. Cette expression reste par la suite restreinte à la plaque neurale jusqu'au stade neurula pendant lequel elle devient postérieure dans un premier temps avant de ne plus être détectable. Cependant, une observation plus précise de ces patrons d'expression (Fig. 40) (Yu et al., 2008a; Yu et al., 2007) mais également des patrons d'expression obtenus au cours de mes travaux m'a permis d'observer un patron d'expression différent de ce qui avait été décrit jusqu'à aujourd'hui. En effet, *SoxB1a* est exprimé dans tous l'ectoderme au stade gastrula précoce (Fig. 40A). Cette expression est conservée dans tout l'ectoderme au stade gastrula, y compris dans la partie de l'ectoderme exprimant des marqueurs épidermiques, le marquage étant plus intense au niveau de la plaque neurale (Fig. 40B, C). L'expression de *SoxB1a* se restreint par la suite à la plaque neurale au cours de la neurulation.

De manière intéressante, les premières descriptions de l'expression de *SoxB1a* au cours de la gastrulation révélait une expression pan-neural, comme *Sox2* chez les vertébrés à ce stade du développement (Kishi et al., 2000; Okuda et al., 2006; Rex et al., 1997). Cependant l'expression pan-ectodermique que je décrit ici permet d'observer une expression plutôt semblable à celle de *Sox3*

chez les vertébrés (Okuda et al., 2006; Penzel et al., 1997; Rex et al., 1997), mais également semblable à celle d'un certain nombre de *SoxB1* chez différents métazoaires tel que l'échinoderme *Strongylocentrotus purpuratus*, l'hémichordé *Saccoglossus kowalevskii*, le mollusque *Patella vulgata* ou encore le cnidaire *Acropora millepora* (Kenny et al., 2003; Le Gouar et al., 2004; Lowe et al., 2003; Shinzato et al., 2008). Ce résultat semble appuyer une fonction de spécification de l'ectoderme de *SoxB1* (et non pas uniquement du neuroectoderme).

II - ETUDE FONCTIONNELLE DU ROLE DES VOIES DE SIGNALISATION BMP ET FGF AU COURS DE L'INDUCTION NEURALE – RESULTATS PRELIMINAIRES

Dans ce chapitre sont présentés les méthodes utilisées afin d'étudier les effets de perte et de gain de fonction des voies de signalisation BMP et FGF ainsi que les premiers résultats obtenus.

II.1 - INHIBITION DE LA VOIE DE SIGNALISATION BMP – RESULTATS PRELIMINAIRES

La voie de signalisation BMP peut être bloquée au niveau de sa signalisation extracellulaire ou intracellulaire. Afin d'étudier l'effet d'une inhibition du signal BMP sur la mise en place des territoires neuraux et épidermiques, différentes stratégies ont été utilisées. La première stratégie consiste à bloquer la fixation des BMP à leurs récepteurs à l'aide de l'inhibiteur extracellulaire Chordin. La seconde consiste à bloquer la signalisation intracellulaire de la voie BMP en utilisant des molécules de synthèse qui entrent en compétition avec le R-Smad et bloque sa phosphorylation par le récepteur de type I.

II.1.a - Inhibition de la voie BMP par inhibition de la signalisation extracellulaire

Traitement à la protéine Chordin

La première stratégie afin de bloquer le signal BMP consista à traiter les embryons avant le début de la gastrulation (au cours du stade de clivage (3 hpf) ou au stade blastula (5 hpf)) avec un inhibiteur extracellulaire de la voie BMP, en l'occurrence la protéine Chordin de souris (R&D Systems). Des concentrations allant de 200ng/ml à 2µg/ml ont été utilisées, aucune concentration n'induisant de changement morphologique identifiable jusqu'au stade neurula, si ce n'est un léger retard de développement.

Chez les vertébrés, l'inhibition du signal BMP par augmentation de l'expression de *Chordin* induit une expansion du territoire neural (Miller-Bertoglio et al., 1997; Sasai et al., 1995b). Chez l'amphioxus, en l'absence de modification morphologique de l'embryon, j'ai cherché à identifier si le traitement Chordin induisait un changement du devenir des cellules ectodermiques en analysant l'expression du marqueur neural *Neurogenin*. Au stade gastrula, aucun changement d'expression de *Neurogenin* n'est identifié, aucune expansion du territoire d'expression dans l'ectoderme dorsal n'étant visible.

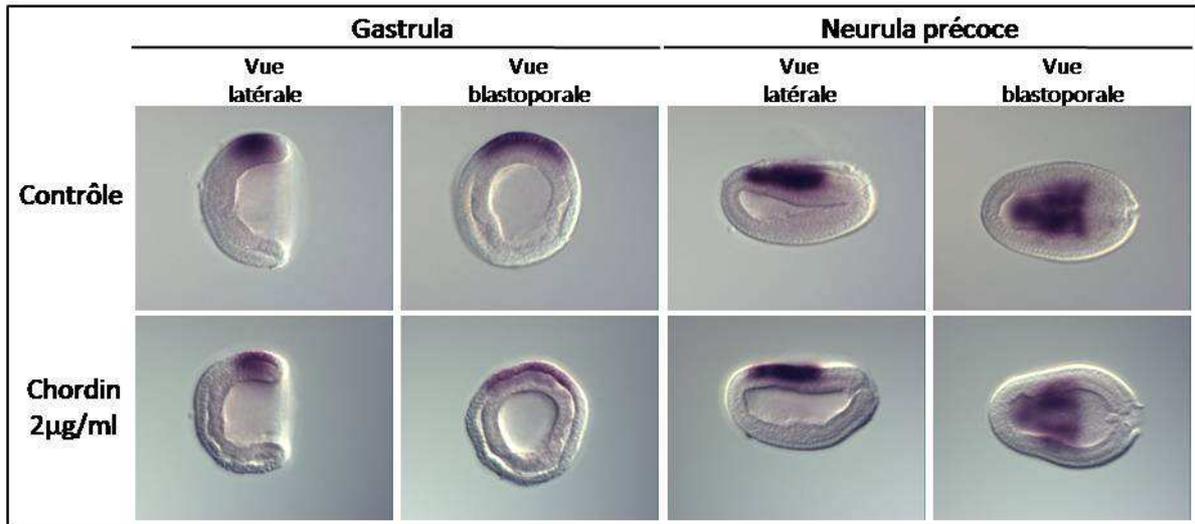


Figure 41 : Expression de *Neurogenin* dans des embryons traités avec Chordin.

Analyse de l'expression de *Neurogenin* par hybridation *in situ* aux stades gastrula et neurula précoce dans des embryons traités à 2µg/ml de protéine Chordin au stade blastula.

De la même manière, aucun changement du territoire d'expression de *Neurogenin* n'est observé au stade neurula précoce (Fig. 40).

Suite à l'exposition des embryons à Chordin, l'absence de changement de modification du territoire neural peut être interprétée de deux manières. La première hypothèse est l'absence d'effet du traitement. Il est possible que la protéine Chordin de souris n'est pas d'affinité ou une affinité faible pour les ligands BMP d'amphioxus et ne permette pas d'inhiber la signalisation BMP chez l'amphioxus. La seconde hypothèse est la non implication du signal BMP ou de Chordin lors de la mise en place du tissu neural chez l'amphioxus. Cependant, cette seconde hypothèse est bien moins probable si l'on se réfère au patron d'expression de *Chordin* au cours de la gastrulation, ou encore à la perte de plaque neurale induite par la ventralisation suite à un traitement à la protéine zBMP4 (Yu et al., 2008a; Yu et al., 2007).

Surexpression de *Noggin*

Noggin est un inhibiteur de la signalisation BMP chez les vertébrés (Zimmerman et al., 1996). De plus, la fonction de *Noggin* semble être conservée à l'échelle des eumétazoaires (Chandramore et al. 2010). Chez l'amphioxus, malgré l'absence d'expression au cours du développement précoce, j'ai émis l'hypothèse que *Noggin* était également un inhibiteur de la voie de signalisation BMP.

Suite à la microinjection de l'ARNm *Noggin* d'amphioxus dans l'œuf non fécondé, l'analyse de l'expression de *Neurogenin* au stade neurula a permis d'observer une absence de mise en place de tissu neural pour la moitié des embryons (Fig. 41I, J), les embryons exprimant *Neurogenin* ayant une morphologie proche d'une morphologie sauvage, avec un retard de développement (Fig. 41E, F). L'observation de deux phénotypes peut-être expliquer par une quantité d'ARNm *Noggin* microinjectée ou traduite plus faible chez les embryons exprimant *Neurogenin*. Au contraire de *Neurogenin*, l'analyse de l'expression de *K1* a permis d'observer que l'ensemble de l'ectoderme se différencie en épiderme dans les embryons ayant un phénotype fort (Fig. 41K, L). L'absence de mise en place de tissu neural pouvant être due à une modification de la mise en place de l'axe

dorsoventral, j'ai analysé au stade gastrula l'expression de marqueurs dorsaux et ventraux chez des embryons microinjectés avec l'ARNm *Noggin*. Dans les embryons microinjectés, le marqueur dorsal *Nodal* n'est plus exprimé pour une partie des embryons (Fig. 41U, V). Au contraire, le territoire d'expression du marqueur ventral *Evx* est étendu dorsalement pour la majorité des embryons observés (Fig. 41W, X). Outre la pénétrance limitée de l'effet de la microinjection de l'ARNm *Noggin* pour une partie des embryons, ces résultats confirment que la surexpression de *Noggin* induit une ventralisation.

La surexpression de *Noggin* induit un changement de patterning dorsoventral ne permettant pas de conclure quant à l'effet de l'inhibition du signal BMP sur la détermination du devenir des cellules de l'ectoderme. J'ai donc cherché à identifier l'effet de la surexpression de *Noggin* dans des explants ectodermiques. *K1* est exprimé dans la totalité des explants (Fig. 41Y). La différenciation de l'ensemble des cellules des explants en cellules épidermique suggère que le signal BMP n'est pas inhibé.

L'augmentation de signal BMP au cours du développement embryonnaire précoce induit une ventralisation des embryons. Intuitivement, et comme chez les vertébrés, il est attendu une dorsalisation de l'embryon suite à l'inhibition de la voie de signalisation BMP. Cependant, la surexpression de *Noggin* induit une ventralisation des embryons, et ne bloque pas l'acquisition d'un devenir épidermique par les cellules de l'ectoderme. Il est donc possible de penser que la voie BMP n'est pas inhibée par *Noggin*, ou ne l'est que partiellement. Il est également possible de penser que *Noggin* inhibe des voies de signalisation ayant des activités dorsalisantes, une étude récente montrant que *Noggin* inhibe également les protéines Activine et *Nodal* chez le xénope (Bayramov et al., 2011).

II.1.b - Inhibition de la voie BMP par inhibition de la signalisation intracellulaire

La seconde stratégie utilisée afin d'inhiber la voie de signalisation BMP a été l'utilisation de molécules de synthèse capables de bloquer la transduction intracellulaire du signal BMP en bloquant la phosphorylation du R-Smad par le récepteur de type I des BMPs. Deux molécules analogues ont été utilisées : les molécules DMH1 et dorsomorphine (respectivement SIGMA D8946 et SIGMA P5499). *In vivo*, ces deux molécules induisent chez le poisson zèbre une dorsalisation des embryons (Hao et al., 2009; Yu et al., 2008b), un phénotype identique à celui d'une perte de signalisation BMP par augmentation de l'expression de *Chordin*, *Noggin* ou *Follistatin* (Furthauer et al., 1999; Miller-Bertoglio et al., 1997). De plus, contrairement à la dorsomorphine, la DMH1 n'inhibe pas le récepteur des VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Hao et al., 2009).

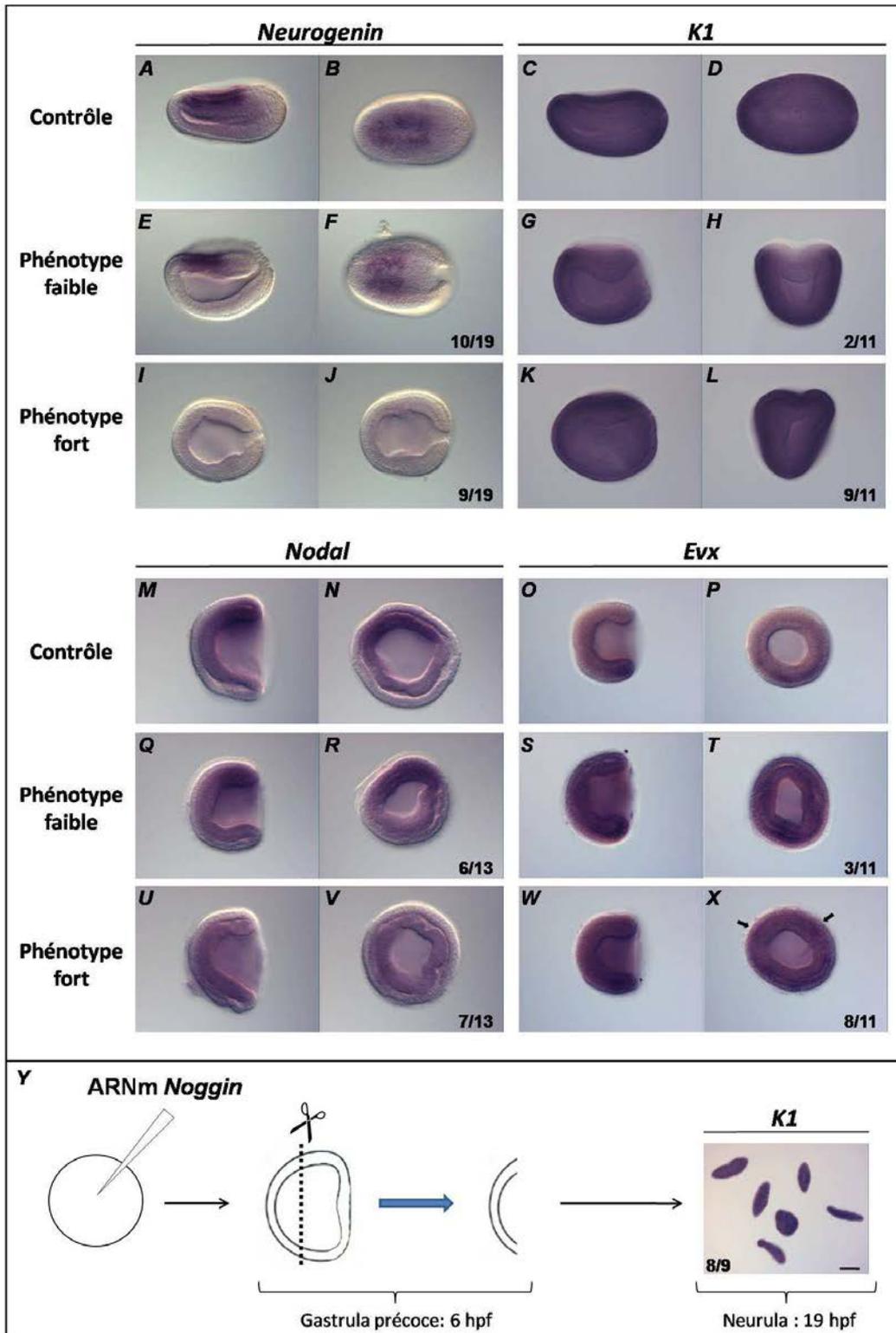


Figure 41 : Effets de la surexpression de *Noggin* au cours du développement.

Analyse par hybridation *in situ* de l'expression au stade neurula de *Neurogenin* (A-B, E-F, I-J) et de *K1* (C-D, G-H, K-L) et au stade gastrula de *Nodal* (M-N, Q-R, U-V) et d'*Evx* (O-P, S-T, W-X) suite à la microinjection de l'ARNm *Noggin*. Pour chaque panel, les photos de gauche sont des vues latérales, Les photos de droite sont des vues dorsales pour *Neurogenin*, dorsale (D) et blastoporales (H, L) pour *K1*, et des vues blastoporales pour *Nodal* et *Evx*. Les flèches indiquent la limite dorsale de l'expression ventrale d'*Evx*. (Y) : Procédure expérimentale de l'excision de l'ectoderme après microinjection de *Noggin* et analyse de l'expression de *K1*. Barre d'échelle : 50µm.

Traitement à la DMH1

L'utilisation de la molécule commerciale DMH1 ne fut pas possible. En effet, la dissolution dans le DMSO de la molécule lyophilisée (comme conseillé par le fabricant) ne fut pas complète. La concentration de la solution n'étant pas connue (et le problème de dissolution pouvant refléter un problème de qualité de la molécule), la DMH1 commerciale ne fut pas utilisée.

Après avoir contacté Charles C. Hong, le leader de l'équipe ayant synthétisée la DMH1 et l'ayant identifiée comme un inhibiteur des récepteurs au BMPs (Hao et al., 2009), il accepta très gentiment de nous en fournir gracieusement une quantité suffisante pour nos expériences.

Les embryons ont été exposés à partir du stade de clivage ou du stade blastula à des concentrations de DMH1 allant jusqu'à 25µM. Malheureusement, les différents lots d'embryons utilisés pour ces expériences se sont révélés mauvais, les embryons contrôles de ces différentes expériences se développant mal. Il n'a donc pas été possible d'utiliser les embryons traités à la DMH1 dans leur grande majorité, en particulier les embryons traités aux plus fortes concentrations. Toutefois, l'observation de la morphologie des embryons n'a pas permis d'identifier de phénotype particulier, suggérant que la DMH1 n'a pas d'effet sur le développement précoce chez l'amphioxus.

Traitement à la dorsomorphine

Afin de bloquer la voie de signalisation BMP, j'ai donc utilisé la dorsomorphine, une molécule analogue de DMH1. Les embryons ont été traités au stade de clivage ou au stade blastula à des concentrations allant de 5µM à 50µM. Un effet dose-dépendant a été observé, et ceci pour les traitements au stade de clivage et au stade blastula. Les concentrations inférieures à 25µM ont un effet faible jusqu'au stade neurula, la morphologie générale de l'embryon n'étant pas profondément affectée. Il est à noter qu'un retard de développement a tout de même été identifié pour les embryons traités à des concentrations proches de 25µM.

Les traitements à des concentrations supérieures à 25µM induisent également un fort retard de développement et une gastrulation fortement altérée. Les phénotypes observés sont stade-dépendants et dose-dépendants. En effet, les phénotypes les plus sévères sont observés pour un traitement à une concentration de 50µM au stade de traitement le plus précoce, à savoir le stade de clivage. La mort des embryons est également observée, le début du phénomène étant également stade-dépendant et dose-dépendant (Fig. 42). La mort des embryons peut refléter une toxicité de la dorsomorphine à forte concentration, ce phénomène n'étant pas observé pour des traitements à des concentrations de dorsomorphine inférieures à 25µM.

D'une manière générale, la totalité des embryons traités à un stade et à une concentration donnés ne présentent pas le même phénotype. De plus, la proportion d'embryons présentant le même phénotype diminue d'autant plus que le traitement est précoce et que la concentration de dorsomorphine est forte. Ceci peut-être expliqué par une pénétrance du traitement inférieure à 100%. Il est également possible que suite à la protonation de la molécule permettant d'éviter une précipitation de la dorsomorphine dans l'eau de mer, une partie des molécules perdent leur activité. Puisque le traitement à la dorsomorphine semble affecter la gastrulation, il est également possible que le mouvement d'invagination du mésendoderme au cours de la gastrulation soit également

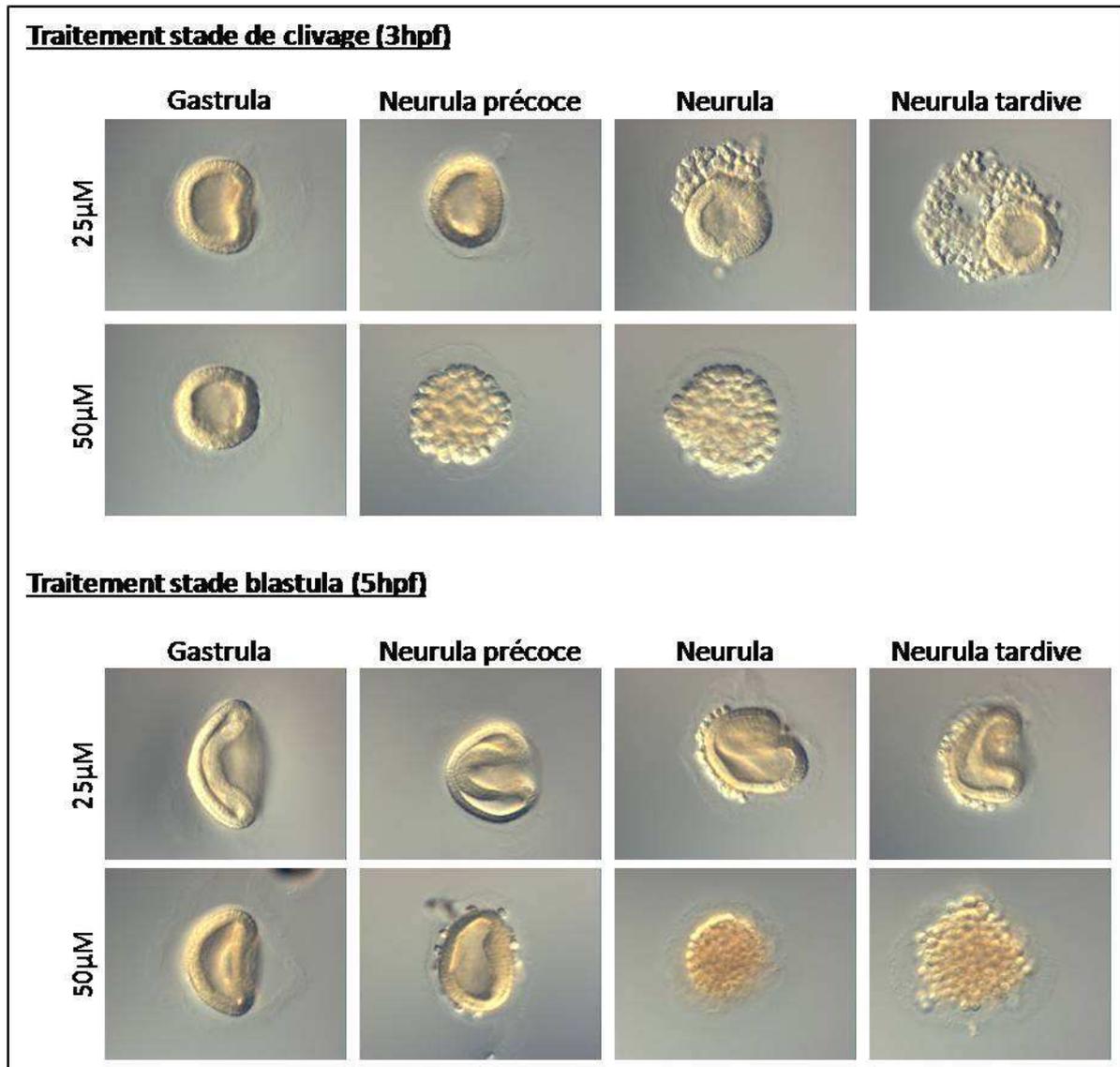


Figure 42 : Effets des traitements à la dorsomorphine sur le développement embryonnaire.

Etude de l'effet de fortes concentrations de dorsomorphine sur le développement embryonnaire en fonction du stade de traitement. Les embryons présentés sont dans leur chorion.

affecté. Ceci pourrait expliquer d'une part le retard de développement observé, mais également les morphologies différentes et les embryons commençant à exogastruler consécutivement à l'altération de la gastrulation.

Un grand nombre de traitements à la dorsomorphine (principalement aux stades de clivage et blastula, à des concentrations différentes et sur des lots d'embryons différents) ont permis d'observer que les phénotypes induits pour des conditions de traitements identiques sont reproductibles. De plus la proportion d'embryons présentant le même phénotype pour chaque traitement est au minimum de 60%. Malgré l'absence d'homogénéité des phénotypes induits par le traitement à la dorsomorphine, ces observations permettent de considérer que les résultats obtenus avec le traitement dorsomorphine sont fiables.

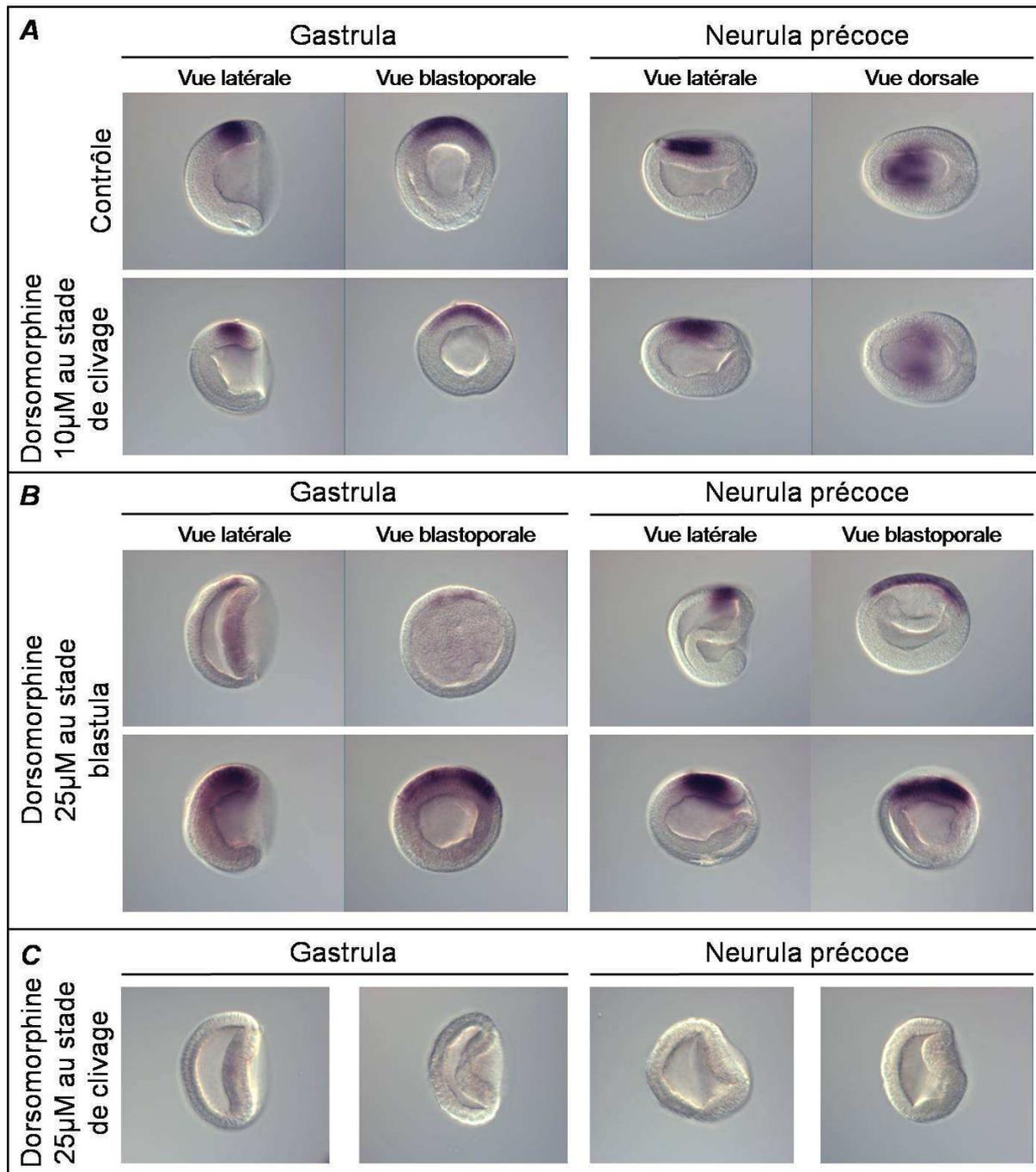


Figure 43 : Expression de *Neurogenin* dans des embryons traités à la dorsomorphine.

Analyse de l'expression de *Neurogenin* par hybridation *in situ* dans des embryons traités à différents stades de développement à la dorsomorphine. (A) : expression de *Neurogenin* aux stades gastrula et neurula précoce dans des embryons contrôle et des embryons traités à 10µM de dorsomorphine au stade de clivage. (B) : expression de *Neurogenin* aux stades gastrula et neurula précoce dans des embryons traités à 25µM de dorsomorphine au stade blastula. Deux phénotypes au stade gastrula et deux phénotypes au stade neurula précoce sont présentés. (C) : expression de *Neurogenin* aux stades gastrula et neurula précoce dans des embryons traités à 25µM de dorsomorphine au stade de clivage. Deux phénotypes au stade gastrula et deux phénotypes au stade neurula précoce sont présentés.

Afin de définir si l'inhibition du signal BMP par traitement à la dorsomorphine induisait un changement d'identité des territoires ectodermiques, l'expression de *Neurogenin* a été analysée dans les embryons traités. Un traitement à 10 μ M de dorsomorphine au stade de clivage n'induit pas de changement d'expression de *Neurogenin* (Fig. 43A). De la même manière les embryons traités à 25 μ M de dorsomorphine au stade blastula ne présentent pas de changement d'expression de *Neurogenin* (Fig. 43B). Ces observations indiquent que dans ces conditions expérimentales, l'inhibition du signal BMP n'induit pas de changement d'identité des cellules de l'ectoderme non neural.

Aucune expression de *Neurogenin* n'est observée dans les embryons traités à 25 μ M de dorsomorphine au stade de clivage (Fig. 43C). L'absence d'expression de *Neurogenin* dans les embryons traités précocement à une forte concentration de dorsomorphine peut être expliquée par une gastrulation fortement affectée. En effet, la gastrulation semble être bloquée pour une partie des embryons tandis que pour d'autres, un phénomène d'exogastrulation semble avoir commencé. Comme nous le verrons par la suite, l'absence d'expression de *Neurogenin* peut en fait être corrélée à l'absence de mise en place de l'organisateur (Voir partie III du chapitre Résultats).

II.1.c - Conclusion

Parmi les différentes méthodes testées afin d'inhiber la voie de signalisation BMP, seule la microinjection de *Noggin* et l'utilisation de la molécule dorsomorphine a permis d'observer des modifications du développement embryonnaire, modifications attendues suite à l'inhibition d'une voie de signalisation fortement impliquées au cours du développement embryonnaire précoce. Toutefois, les résultats obtenus suite à la surexpression de *Noggin* ne sont pas consistant avec une activité d'inhibition de la voie de signalisation BMP.

En ce qui concerne la dorsomorphine, malgré une pénétrance du traitement pouvant paraître aléatoire, un grand nombre d'expériences a permis d'observer une forte reproductibilité des phénotypes induits confirmant la validité des résultats obtenus avec la dorsomorphine. De plus, deux travaux dans lesquels la dorsomorphine a été utilisée afin d'inhiber la voie de signalisation BMP chez l'amphioxus ont été publiés au cours de ma thèse. Ces travaux montrent que la dorsomorphine inhibe la signalisation intracellulaire de la voie BMP (Kozmikova et al., 2013; Lu et al., 2012).

L'inhibition du signal BMP par traitement à la dorsomorphine induit deux phénotypes distincts. Soit l'expression du marqueur neural *Neurogenin* n'est pas modifiée, soit il n'est pas exprimé. Ceci suggère qu'une inhibition forte de BMP induit une altération de la mise en place du tissu neural tandis qu'une inhibition plus faible n'a pas d'effet notable sur l'induction neurale.

II.2 - ACTIVATION ECTOPIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION FGF : RESULTATS PRELIMINAIRES

Chez les vertébrés, la protéine bFGF (basic FGF) est utilisée afin d'augmenter globalement la signalisation FGF. En effet, cette protéine est considéré comme un « FGF universel » du fait d'une affinité importante pour différents récepteurs aux FGF chez les vertébrés (Ornitz et Leder, 1992; Ornitz et al., 1996; Zhang et al., 2006b). La protéine bFGF est également utilisée pour modifier la

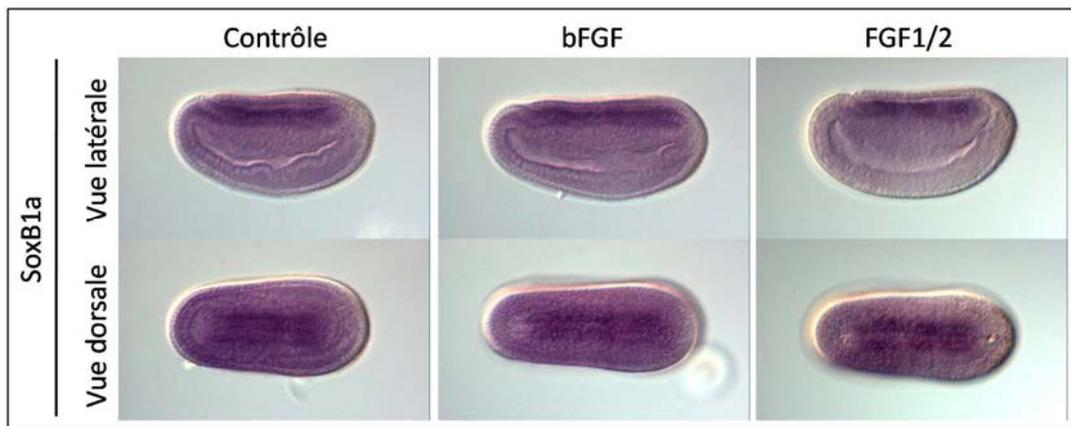


Figure 44 : Effet de l'augmentation du signal FGF sur la mise en place de la plaque neurale.

Analyse par hybridation *in situ* de l'expression du marqueur de la plaque neurale *SoxB1a* au stade neurula sur des embryons traités au bFGF (100ng/ml) ou au FGF1/2 (2µg/ml) au stade de clivage.

signalisation FGF chez des animaux non vertébrés comme chez les tuniciers (Hudson et al., 2003; Hudson et Lemaire, 2001) ou les échinodermes (Cancre et al., 1999).

J'ai donc utilisé cette protéine pour les premières expériences d'augmentation de signal FGF chez l'amphioxus. Cependant, au cours de ma thèse, la protéine FGF1/2 d'amphioxus a été produite en grande quantité au sein de l'équipe (Belgacem, rédaction du manuscrit en cours). Puisque le gène *FGF1/2* est l'orthologue du gène codant pour *bFGF* chez les vertébrés (Oulion et al., 2012), j'ai par la suite uniquement utilisé la protéine FGF1/2.

Chez l'ascidie *Ciona intestinalis*, un traitement d'explants de la partie animale de l'embryon avec 50ng/ml de bFGF induit dans 50% des cas l'expression du marqueur neural *Otx* tandis qu'un traitement à 100ng/ml induit l'expression d'*Otx* dans 100% des explants (Hudson et Lemaire, 2001). Pour cette raison, la concentration minimale de bFGF utilisée lors des traitements que j'ai effectuée a été fixée à 100ng/ml.

Les embryons d'amphioxus ont été traités au bFGF de 100 à 250ng/ml, et ceci à différents stades (stade 4/8 cellules, stade de clivage ou stade blastula). Quel que soit le stade de traitement et la concentration, le développement des embryons n'est pas affecté. L'expression de *SoxB1a* a été analysée chez les embryons traités au bFGF au stade de clivage et au stade blastula. Aucun changement d'expression n'a été observé (Fig. 44).

Comme précisé précédemment, une fois la protéine FGF1/2 produite au sein de l'équipe, je l'ai utilisée pour l'ensemble des traitements effectués dans le but d'augmenter la signalisation FGF. La concentration maximale utilisée pour les traitements est de 2µg/ml. Suite à un traitement à cette concentration au stade de clivage ou au stade blastula, aucune modification du développement n'a été observée. Comme pour les traitements au bFGF, aucun changement d'expression de *SoxB1a* n'a été observé chez les embryons traités au FGF1/2 (Fig. 44).

Conclusion

L'augmentation du signal FGF, que ce soit par traitement au bFGF ou au FGF1/2 d'amphioxus, n'induit aucun changement morphologique visuellement identifiable au cours du développement embryonnaire, et la mise en place de la plaque neurale ne semble pas être affectée. Dans ces conditions, il n'était pas possible de conclure à une absence d'effet du traitement ou à une absence de modification de la formation du tissu neural. Cependant, comme nous allons le voir dans le chapitre suivant, le traitement au FGF1/2 dans des conditions particulières ont permis d'identifier une potentielle action neuralisante du signal FGF.

II.3 - ACTIVATION ECTOPIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION FGF DANS DES EMBRYONS DEPLETES EN SIGNAL BMP

Chez les vertébrés, l'acquisition de la future identité par l'ectoderme correspond à un choix entre un destin neural et un destin épidermique. L'acquisition du destin neural chez le xénope est dépendante du signal FGF et de l'inhibition du signal BMP (Delaune et al., 2005). J'ai donc cherché à identifier si l'augmentation du signal FGF dans des embryons traités à la dorsomorphine induisait la différenciation de l'ectoderme à devenir épidermique en tissu neural chez l'amphioxus.

Comme nous l'avons vu précédemment, le traitement à la dorsomorphine affecte les mouvements de gastrulation, l'invagination du mésendoderme dans le blastocoele n'ayant pas lieu dans le cas des concentrations de dorsomorphine les plus fortes. De plus, *Neurogenin* n'est pas exprimé dans ces embryons (Fig. 43C). De manière intéressante, l'addition de protéine FGF aux embryons traités à une concentration non létale de dorsomorphine induit un phénomène d'exogastrulation pour une partie des embryons. Ce phénomène a été observé que ce soit avec la protéine FGF1/2 ou la protéine bFGF. Les phénotypes induits ont été comptabilisés au stade neurula suite à un traitement à 15µM de dorsomorphine et 500ng/ml de bFGF. Trois phénotypes ont été définis parmi le lot d'embryons étudié (n=1204). Le premier phénotype correspond aux embryons les moins affectés pour lesquels la gastrulation a eu lieu et présentant une morphologie de type neurula (62,5%), les embryons présentant un retard de développement ayant été comptabilisés. Le second phénotype correspond aux embryons pour lesquels la gastrulation est fortement affectée mais présentant une morphologie de type gastrula (20,6%). Le troisième phénotype correspond aux embryons exogastrulés (16,9%).

La voie de signalisation FGF est connue pour participer aux mouvements de gastrulation au cours du développement embryonnaire chez les vertébrés (Amaya et al., 1991; Ciruna et al., 1997; Griffin et al., 1995; Isaacs et al., 1994). Il est donc possible d'expliquer ce phénomène d'exogastrulation par la cumulation des effets induits par l'activation ectopique du signal FGF et l'inhibition du signal BMP.

Profitant de l'absence de contact entre l'ectoderme et le mésendoderme où sont exprimés *BMP2/4* et *BMP5-8*, et donc de l'impossibilité de signalisation verticale entre les deux tissus, j'ai analysé si dans ces conditions particulières le signal FGF pouvait induire du tissu neural. L'analyse de l'expression de *Neurogenin* chez les embryons exogastrulés a permis de confirmer que suite à l'inhibition du signal BMP, le signal FGF est capable d'induire la différenciation de l'ensemble de l'ectoderme en tissu neural (Fig. 45).

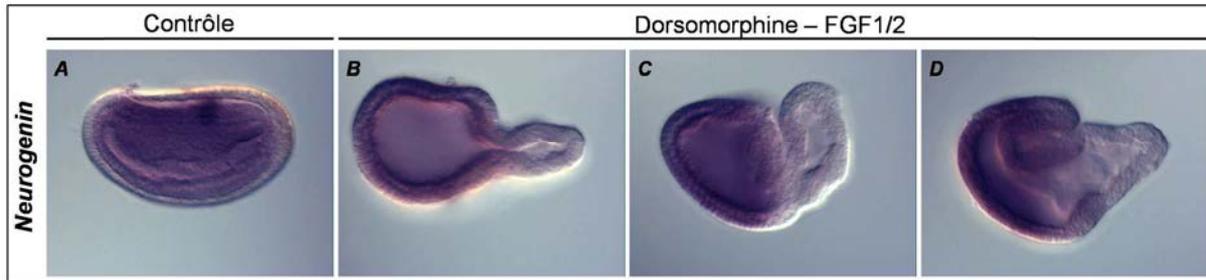


Figure 45 : Effet de l'augmentation du signal FGF sur le devenir de l'ectoderme suite à l'inhibition du signal BMP.

Analyse par hybridation *in situ* de l'expression du marqueur neural *Neurogenin* au stade neurula suite au traitement à 25 μ M dorsomorphine – 2 μ g/ml FGF1/2 au stade de clivage. (A) : embryon contrôle au stade neurula. (B-D) : exemples de trois embryons exogastrulés.

Outre l'interprétation du rôle du signal FGF permise par ce type d'expérience, ces observations ont permis de confirmer que la protéine FGF1/2 produite au sein de l'équipe est fonctionnelle et utilisable pour étudier le rôle de la voie de signalisation FGF chez l'amphioxus.

II.4 - CONCLUSION GENERALE

Suite à l'inhibition de la voie de signalisation BMP par traitement à la dorsomorphine, aucune expansion de la plaque neurale n'est observée. Au contraire, une inhibition complète du signal BMP est accompagnée d'une perte de l'induction neurale. Si l'on considère que comme chez les vertébrés l'induction neurale est sous le contrôle d'une structure organisatrice, il est possible que l'inhibition du signal BMP induise la perte ou la non formation de cette structure.

De manière intéressante, si l'activation ectopique du signal FGF n'induit aucun phénotype, que ce soit morphologique ou au niveau de la mise en place de la plaque neurale, le signal FGF induit la formation de tissu neural ectopique en absence de signal BMP. Cette observation permet d'envisager un rôle de la voie de signalisation FGF au cours de l'induction neurale, bien que son inhibition suggère qu'elle ne soit pas nécessaire au cours de ce mécanisme (Bertrand et al., 2011b).

A ce stade de l'étude, ces résultats apportaient plus d'éléments contradictoires que de réponses concernant le rôle des voies de signalisation BMP et FGF au cours l'induction neurale. Le chapitre suivant regroupe sous forme d'article scientifique la plus grande partie de mon travail. Mon travail s'est focalisées d'une part à définir le rôle du signal BMP au cours du développement précoce au travers de la compréhension des phénotypes présentés précédemment. D'autre part, je me suis intéressé au rôle d'une voie de signalisation possiblement impliquée au cours de l'induction neurale, à savoir la voie Activine/Nodal. J'ai également cherché à définir le rôle exact de la voie de signalisation FGF au cours de la formation du tissu neural. Enfin, en développant des expériences d'explantations et de greffes de tissu embryonnaire, j'ai cherché à définir si comme chez les vertébrés, une structure organisatrice est à l'origine de l'induction neurale au travers du contrôle de ces différentes voies de signalisation.

III - REGARD A PARTIR DES CEPHALOCHORDES SUR L'EVOLUTION DE L'INDUCTION NEURALE DANS LA LIGNEE DES CHORDES

Ce chapitre se divise en deux parties. La première partie correspond à la présentation de la plus grande partie de mes résultats de travail de thèse synthétisé sous la forme d'un article scientifique. La rédaction y est donc en anglais. La seconde partie correspond à une critique des résultats présentés et aux expériences complémentaires nécessaires à court terme et qui seront faites au cours de la saison de ponte prochaine.

Résumé de l'article

L'induction neurale est le processus par lequel des cellules pluripotentes s'engagent vers un destin neural. Ce mécanisme est contrôlé chez l'embryon des vertébrés par une région particulière appelée l'organisateur. Un modèle assez largement acceptée stipule que chez les vertébrés, l'inhibition du signal BMP et un signal instructif pouvant être FGF sont nécessaires dans les cellules ectodermiques pour induire l'acquisition du destin neural. D'autre part, chez les tuniciers, qui représentent le groupe frère des vertébrés, la voie de signalisation BMP n'est pas impliquée dans l'induction neurale qui est exclusivement sous le contrôle du signal de FGF. Cependant, les tuniciers ont perdu l'organisateur, ce qui peut expliquer cette divergence par rapport aux vertébrés, la question du contrôle de l'induction neurale chez l'ancêtre des chordés reste à aborder. Ici, nous montrons que le céphalochordé amphioxus, qui représente le troisième groupe des chordés, possède un organisateur capable de déclencher l'induction neurale et que ce processus est contrôlé par l'inhibition du signal BMP et l'activation de la voie de signalisation Activine/Nodal et/ou de la voie de signalisation FGF. En utilisant des méthodes d'embryologie dite classique, nous démontrons que la lèvre blastoporale dorsale de la gastrula de l'amphioxus a les mêmes propriétés que l'organisateur de vertébrés. Nous montrons également que le signal BMP est le signal déclenchant l'entrée dans le programme épidermique et que son inhibition est nécessaire mais non suffisante pour l'induction neurale. En outre, en utilisant des explants ectodermiques, nous avons observé que les signaux FGF ou Activine/Nodal sont capables d'induire l'entrée des cellules ectodermiques dans le programme neural et que ces voies agissent indépendamment l'une de l'autre. L'ensemble de nos données suggèrent que l'induction neurale chez l'ancêtre des chordés était contrôlée par une structure embryonnaire organisatrice au travers de l'inhibition du signal BMP et de l'activation d'une autre voie, probablement FGF et/ou Activine/Nodal. Bien que la voie Activine/Nodal agirait principalement comme un inhibiteur de l'induction neurale chez les vertébrés, nos résultats plaident en la faveur d'une examination approfondie de l'implication de cette voie au cours de la première étape de la formation du système nerveux. Notre approche évolutive ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension des événements moléculaires fins contrôlant le processus développemental complexe qu'est l'induction neurale.

Insights from cephalochordates on the evolution of neural induction in the chordate lineage

Yann Le Petillon^{1,2}, Stephanie Bertrand^{1,2,a}, Hector Escriva^{1,2,a}

1 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 7232, BIOM, Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/Mer, France

2 CNRS, UMR 7232, BIOM, Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/Mer, France

a To whom correspondence should be addressed at: Laboratoire Arago, Avenue du Fontaulé, 66650, Banyuls-sur-Mer, France. E-mail: stephanie.bertrand@obs-banyuls.fr and hescriva@obs-banyuls.fr, Phone: +33(0)468887390, Fax: +33(0)468887393

Abstract

Neural induction is the process through which pluripotent cells are committed to a neural fate. This mechanism is controlled in the vertebrate embryo by a peculiar region called the organizer. A quite widely accepted model states that in vertebrates both BMP signal inhibition and an instructive signal, that may be FGF, are required in ectodermal cells to induce neural fate acquisition. On the other hand, in tunicates, which represent the sister group of vertebrates, BMP signaling pathway is not implicated in neural induction which is exclusively under the control of the FGF signal. However, tunicates have lost the organizer which might explain this divergence compared to vertebrates, and the question of how neural induction was controlled in the ancestor of chordates remains to be addressed. Here we show that the cephalochordate amphioxus, which represents the third group of chordates, possesses an organizer able to trigger neural induction and that this process is controlled by BMP signal inhibition together with activation of Activin/Nodal and/or FGF signaling pathways. Using classical embryology methods, we demonstrate that the dorsal blastoporal lip of the amphioxus gastrula has the same properties as the vertebrate organizer. We also show that BMP is the signal triggering epidermal program entry and that its inhibition is necessary but not sufficient for neural induction. Moreover, using ectodermal explants, we observe that FGF or Nodal/Activin signals are able to induce the entry of ectodermal cells in the neural program and that these pathways act independently of each other. Altogether, our data suggest that neural induction in the ancestor of chordates was controlled by an organizer embryonic structure through BMP inhibition and activation of another pathway, probably FGF and/or Activin/Nodal. Although Activin/Nodal pathway is thought to act mainly as an inhibitor of neural induction in vertebrates, our results strongly plead for a deeper examination of the implication of this pathway in the first step of nervous system formation. Our evolutionary approach opens new avenues for a deeper comprehension of the fine molecular events controlling the complex developmental process of neural induction.

Introduction

The concept of neural induction was established 90 years ago by Hilde Mangold and Hans Spemann thanks to their famous graft experiments. They showed that the dorsal blastoporal lip of a salamander gastrula, when grafted to the ventral side of a host gastrula, is able to induce the formation of a Siamese twin embryo. Interestingly, they observed that the second central nervous system is derived from the host tissue previously fated to become epidermis and not from the graft. Based on this result, they suggested that the formation of neural tissue occurs under an informative signal produced by a peculiar cellular structure which they called organizer (Spemann and Mangold, 1924). Such a structure was then identified in other vertebrates (Hunt, 1929; Luther, 1935; Waddington, 1936), suggesting a conserved mechanism in this lineage.

Since then, the molecular mechanisms controlling neural induction and particularly the neural inductive signal have been deeply investigated in vertebrates. First, three genes able to induce neural tissue when overexpressed in ectodermal explants were identified: *Noggin* (Smith and Harland, 1992), *Chordin* (Sasai et al., 1994) and *Follistatin* (Hemmati-Brivanlou et al., 1994), all of them being expressed in the organizer. Next, it was shown that BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) is an epidermal inducer and a neural inhibitor (Wilson et al., 1995) and that Chordin (Piccolo et al., 1996), Noggin (Zimmerman et al., 1996) and Follistatin (Fainsod et al., 1997) act as antagonists of BMP4. These observations resulted in the proposition of the “default model” for neural induction (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1997). In this model, ectodermal cells become epidermal when exposed to BMP signals and neural when deprived of BMP signals. In the vertebrate embryos, BMP signals are detected in the entire blastula/gastrula embryo except in the dorsal part where the dorsal organizer produces BMP antagonists that act as neural inducers.

This model has been controversial for different reasons. Firstly, inhibition of BMP signaling is not sufficient for ectopic neural induction (Delaune *et al.*, 2005; Linker and Stern, 2004). Secondly, FGF signaling was shown to be a necessary neural inductive signal in both ectodermal explant experiments (Launay et al., 1996; Sasai et al., 1996; Wilson et al., 2000) and for induction of ectopic neural tissue (Delaune et al., 2005; Streit et al., 2000). However, it was also shown that BMP signaling can be inhibited by FGF through phosphorylation of the Smad1 linker domain by the MAPK pathway (Koshida et al., 2002). Accordingly, all the observations implying FGF signaling during neural induction could be indirect as a result of BMP inhibition, supporting in this case the default model. Nevertheless, it has been observed that in *Xenopus*, FGF induce neural tissue ectopically in absence of BMP signal (Delaune et al., 2005; Marchal et al., 2009), suggesting that the role of the FGF signal is not restricted to BMP inhibition.

The current synthetic view is that BMP inhibition, mainly through inhibitors secreted by the organizer, is necessary but not sufficient for neural induction and/or neural differentiation in vertebrates and that FGF signaling is one of the additional necessary instructive cues.

Studies on the molecular mechanisms of neural induction in non vertebrate chordates have only been undertaken in tunicates, the sister group of vertebrates. Thus, in ascidians, it has been shown that FGF signaling is involved in neural induction (Bertrand et al., 2003) whereas inhibition of BMP signaling does not seem to play a role in this process (Darras and Nishida, 2001a). However, tunicates have lost the organizer, probably as an adaptation to a dramatically reduced number of embryonic cells and a very rapid development, which might explain this divergent neural induction mechanism compared to vertebrates (Yu et al., 2007).

Amphioxus belongs to the cephalochordate lineage which is the sister group of tunicates and vertebrates (Bourlat et al., 2006; Delsuc et al., 2006), all three together forming the chordate phylum. Tung studies in the 50-60's led to the proposition that cephalochordates possess an organizer, homologous to the one of vertebrates, which is able to induce the formation of a secondary dorsal axis formed by somitic, notochordal and neural tissues when grafted in the blastocoel of a host embryo (Tung et al., 1962a). The existence of an organizer homologue structure in amphioxus is also supported by the expression in the dorsal blastoporal lip of the gastrula embryo of several genes orthologous to genes expressed in the organizer of vertebrates (Yu et al., 2007). Altogether, these data suggest that an organizer structure was present in the ancestor of chordates (Yu et al., 2007). However, in amphioxus the question remains on whether the organizer has the capacity to induce neural tissue formation, and through which molecular mechanisms. It has recently been shown that activation of the BMP signaling pathway induces a ventralisation of the amphioxus embryo associated with a loss of the neural plate (Onai et al., 2010; Yu et al., 2008a; Yu et al., 2007) whereas chemical inhibition of BMP signaling leads to an expansion of the neural plate territory (Kozmikova et al., 2013). On the other hand, inhibition of FGF signaling at any developmental stage does not block neural induction in amphioxus (Bertrand et al., 2011b) supporting that the FGF signaling is not required for neural induction in amphioxus. Altogether, these data suggest that some conserved and divergent mechanisms controlling neural induction between cephalochordates and vertebrates exist but these observations are sparse and not sufficient to fully understand how neural induction is controlled in amphioxus.

In order to understand the evolution of neural induction mechanism in the chordate phylum, we have investigated in details the function of BMP and FGF signaling pathways in the neural induction process in amphioxus. We also developed experiments based on ectodermal explants and show that BMP signal inhibition is necessary but not sufficient for neural induction and that FGF and/or Nodal/Activin signals are able to induce ectodermal cells towards a neural fate. We also show, using ectodermal explants and graft experiments, that amphioxus possesses a functional organizer which indeed has a neural inductive capacity.

Results

BMP inhibition induces a dorsalization of the mesendoderm, but is not sufficient for neural induction

In amphioxus, ectopic activation of the BMP signaling pathway leads to a complete ventralization of the embryo in which the whole ectoderm becomes epidermis (Yu et al., 2008a; Yu et al., 2007). In order to study the effect of BMP inhibition in amphioxus, and to see whether this inhibition is sufficient to induce a complete neuralization of the ectoderm, we used pharmacological treatments with dorsomorphin. This molecule is an inhibitor of BMP signaling which targets BMP receptors (Yu et al., 2008b) and which has been shown to effectively disrupt the BMP pathway in amphioxus (Kozmikova et al., 2013; Lu et al., 2012).

We have tested several concentrations of dorsomorphin using continuous treatments starting at the cleavage stage (32/64 cell stage), before neural induction is thought to occur, (i.e. before any neural marker gene is expressed). Phenotypes of treated embryos ranged from a morphology close to the wild-type to embryos whose development is blocked during gastrulation and followed by death. We decided to use a concentration (35µM) that allows the embryo to survive until the time at which control embryos reach the mid-neurula stage. In this experimental context, BMP pathway inhibition leads to a strong delay of development with embryos in which the mesendoderm is still invaginating without contacting the ectoderm at the time they should be at the mid-neurula stage.

In order to analyze the fate of the ectoderm in these embryos, we decided to use *K1* (*Keratin1*) as an epidermal marker (Karabinos et al., 2001). In wild-type embryos, *K1* is expressed in the presumptive epidermis at the gastrula stage and in the whole epidermis during neurulation (Fig. 1B, C, S1C-F). In dorsomorphin treated embryos, there is no *K1* expression in the ectoderm (Fig. 1D). We then used *SoxB1a* from amphioxus, the orthologue of vertebrates *Sox1*, *Sox2* and *Sox3*, as a pan-neural marker (Holland et al., 2000). We show that in treated embryos *SoxB1a* is expressed in the entire ectoderm as in early gastrula stage control embryos (Fig. 1E,H). Surprisingly we found that, contrary to what has previously been described, *SoxB1a* is still expressed in the whole ectoderm in mid-gastrula stage wild type embryos, with a stronger expression in the neuroectoderm (Fig. 1F). The co-expression at this stage with *K1* in the presumptive epidermis suggests that *SoxB1a* is a pan-ectodermal marker during gastrulation and that it cannot be used as a specific neural marker. We thus decided to use *Neurogenin* (Holland et al., 2000) as neural marker. First, we were surprised to observe a weak expression at the early gastrula stage in the anterior part of the presumptive neuroectoderm of wild type embryos (Fig. 1A), showing that neural tissue starts to be induced before the mid-gastrula stage. Then, in treated embryos, we showed that *Neurogenin* is not expressed in the ectoderm (Fig. 1L) suggesting that when BMP signaling is inhibited, the ectoderm of amphioxus stays in an undifferentiated state characterized by *SoxB1a* expression and absence of *K1* or *Neurogenin* expression.

We then asked whether dorsomorphin treatment induces a dorsalization of the amphioxus embryo. *Vg1* and *Nodal* are normally expressed in the dorsal blastoporal lip during gastrulation. In treated embryos, both genes are expressed in the dorsal and the ventral mesendoderm, except in the most rostral invaginated part of the tissue (Fig. 1P, T), whereas their ectodermal expression is completely lost. *Evx* and *Zic* are respectively expressed in the ventral and dorsal ectoderm in the wild-type gastrula stage embryos (Fig. 1U, V, Z). In dorsomorphin treated embryos, the expression of *Zic* is lost in the ectoderm but in the mesendoderm, as for *Vg1* and *Nodal*, it is expressed in both the dorsal and the ventral sides (Fig. 1X). On the contrary *Evx* expression is completely lost in treated embryos (Fig. 1B'). These data suggest that the mesendoderm is indeed dorsalized when BMP signal is inhibited, whereas the ectoderm shows no dorsoventral patterning.

Altogether, dorsomorphin treatments show i) that inhibition of BMP signaling pathway is not able to induce the neuralization of the ectoderm which keeps an indetermined state, and ii) that inhibition of BMP signaling is associated to a loss of dorsal and ventral signals in the ectoderm of the gastrula. This suggests that in addition to BMP inhibition, signals coming from the dorsal blastoporal lip are necessary for neural induction in amphioxus.

FGF signaling is not necessary for neural induction

In amphioxus, we have previously shown that inhibition of the FGF pathway or the MAPK pathway (respectively with the chemical inhibitors SU5402 and U0126) at the blastula stage does not block the formation of the neural plate (Bertrand et al., 2011b). On the other hand, blocking FGF signaling at the four-cell stage induces a strong gastrulation defect. However, even if the neural plate does not form in this case, few dispersed cells still express the neural marker *Neurogenin*, suggesting that these cells are still committed to a neural fate (Bertrand et al., 2011b).

In order to strengthen this result, we first analyzed the expression of another neural marker, *Hu/Elav* (Sato et al., 2001), in the four-cell stage treated embryos. Interestingly, *Hu/Elav* is expressed in a broad region of the embryo (Fig. 2I), suggesting that neural induction occurs. We decided to block FGF pathway later during development, to avoid the effect of the inhibition of gastrulation movements, but before the blastula stage. Inhibition of FGF signaling at the cleavage stage leads to a delayed but normal development (Fig. 2C, D, G, H). In the treated embryos, *Hu/Elav* and *Otx* expression patterns show that the neural plate is forming normally (Fig. 2C-D, G-H). However, we observe that *Hu/Elav* is expressed in the most anterior part of the neural plate at the late neurula stage (Fig. 2G, H) and that neural *Otx* expression is shortened compared to control embryos (Fig. 2C, D), suggesting that inhibition of FGF signaling might induce a modification of the anteroposterior patterning of the neural plate.

To ensure that what we observed was not the result of a residual FGF signal, we decided to treat the embryos at a higher concentration just before the beginning of gastrulation. This treatment induces a gastrulation defect with no invagination of the mesendoderm into the blastocoele and an arrest of development at the stage gastrulation normally occurs. In these embryos, *Neurogenin* is expressed in the dorsal part at the frontier between the ectoderm and the mesendoderm in a reduced region compared to wild type gastrulae (Fig. 2J-M). These results, together with previous observations, strongly suggest that FGF signaling is not involved in neural induction itself but that it might be involved in the anteroposterior patterning of the neural plate.

Interplay between Activin/Nodal and FGF pathway in neural induction and maintenance of neural fate

It has been shown that activating the Activin/Nodal signaling pathway through Activin treatment induces a dorsalization of the embryo accompanied by the neuralization of the whole ectoderm (Onai et al., 2010). We reproduced this experiment and observed that in treated embryos the anterior neural marker *Otx* is expressed in all the anterior ectoderm (Fig. 3C, D) as previously shown (Onai et al., 2010). We next looked at *Neurogenin* and *Hu/Elav* and showed that they are expressed in the entire ectoderm at early and mid-neurula stage, except in the most posterior part of the embryo (Fig. 3I, J, O, P). This absence of expression in the posterior part is consistent with what is observed in wild type embryos, where the posterior neural plate do not express these neural markers (Fig. 3G, H, M, N). The expression of *SoxB1a* in the posterior ectoderm of Activin treated embryos (Fig. S2J, K) as well as the previously described *Wnt3* expression in this region (Onai et al., 2010) show that the caudal ectoderm is also completely neuralized in these embryos. In order to see whether part of the ectoderm acquired an epidermal fate, we looked at the expression of *AP-2* which is a BMP target gene involved in the epidermal program and which is normally expressed in presumptive epidermis of amphioxus embryos (Meulemans and Bronner-Fraser, 2002; Qiao et al., 2012). In Activin treated embryos we observe a total absence of *AP-2* expression (fig 3U, V),

confirming that the entire ectoderm becomes neural. To understand the putative implication of FGF signaling in this neuralized context, we inhibited the FGF pathway in Activin treated embryos using SU5402 treatment at the early blastula stage. In these embryos, *Otx* is still expressed in the mesendoderm but its expression is lost in the anterior ectoderm (Fig. 3E, F). However, *Neurogenin* and *Hu/Elav* are expressed in the whole ectoderm at the early neurula stage (Fig. 3K, Q), but later on, at the mid-neurula stage, expression in the anterior part of the ectoderm is lost for both genes, which are still expressed in the medial part (Fig. 3L, R). Interestingly, this region seems to be complementary to the ectodermal region expressing *Otx* in Activin treated embryos. In addition, *AP-2*, which is not expressed in Activin treated embryos, starts to be expressed in the anterior ectoderm at the early neurula stage in a complementary fashion to *Neurogenin* and *Hu/Elav* (Fig. 3W). This indicates a change of fate in the anterior ectodermal region from neural to epidermal in the double-treated embryos.

These results suggest that FGF signaling might be involved in anterior neural patterning since *Otx* is never expressed in the neuralized embryos depleted of FGF signal, hypothesis also supported by the reduction of the neural *Otx* expressing region in FGF depleted embryos (Fig. 2C, D). Moreover, the change of anterior ectodermal fate from neural to epidermal strongly suggests that FGF signaling is also involved in the maintenance of the neural state in the anterior region of the embryo.

Characterization of the fate of ectodermal explants

The previous experiments as well as published data were all obtained using whole embryos. To get rid of the putative influence of mesendoderm on neural induction, we decided to prepare ectodermal explants in amphioxus. *K1* is not expressed in the ectoderm at the early gastrula stage. Based on this observation, explantation of ectodermal tissue was realized at the beginning of gastrulation (between 6 and 7 hpf at 19°C), when the vegetal hemisphere begins to flatten. As we have shown that *Neurogenin* is already expressed in the anterior part of the presumptive neuroectoderm at this stage (Fig. 1I), we dissected the most animal region of the ectoderm only composed of cells that are not engaged in the neural program. Ectodermal explants were cultivated in filtered sea water until 19 hpf, time at which whole embryos reach the mid-neurula stage (Fig. 4A). In these conditions, ectodermal explants form hollow balls consisting of a single cell layer for half of them, and consisting of an outer single cell layer with an inner tissue for the other half (Fig. 4A). This morphology is consistent with an observation made by Tung et al., on the development of amphioxus animal cells (*i.e.* the presumptive ectodermal cells) explanted at the eight-cell stage. They observed that the inner tissue consisted of invaginated cells which formed undifferentiated mesodermal tissue (Tung et al., 1962b). We therefore analyzed *Brachyury* expression. We show that in the case of explants having an inner tissue, *Brachyury* is expressed in these inner cells whereas it is never expressed in the external layer (7/13) (Fig. 4I, S3A). Moreover, we show that the pan-ectodermal marker *SoxB1a* is expressed in the whole external layer, suggesting that these cells keep an ectodermal fate (Fig. 4H). To better analyze the fate of the external layer cells after explantation, we investigated the expression of epidermal, neural and endomesodermal marker genes. We showed that the entire external layer of explants expresses the epidermal markers *K1* (11/13), *AP-2* (8/8) and *Dlx* (8/9) suggesting that these cells differentiate in epidermis. We also showed that *Neurogenin* (0/10), *Hu/Elav* (3/11) and *Otx* (1/8) are not expressed in the explants (Fig. 4C, E, G, K), confirming

the absence of neural induction, even in the presence of mesodermal inner cells in about 50% of the explants.

To test if this engagement in the epidermal fate was due to the presence of active BMP signal in the explants, as suggested by the presence of phosphorylated *Smad1/5/8* in the ectoderm of early gastrula embryos (Kozmikova et al., 2013), we treated them with dorsomorphin. As dorsomorphin is lethal for explants at doses normally used in whole embryos, we treated the ectodermal explants with a lower concentration (10 μ M, the highest dose that does not induce cell death). In this case, most of the explants express *K1* but in a very restricted territory (9/10) (Fig. 4L). Moreover, *Neurogenin* is not expressed (13/13) suggesting that inhibition of BMP signaling is not sufficient to induce neural tissue in the ectodermal explants as observed in whole embryos (Fig. 4M).

Activation of FGF or Activin/Nodal pathway induces neural fate in ectodermal explants

We then tested if activation of the Activin/Nodal and/or FGF signaling pathways might neuralize the ectodermal explants. In vertebrates, FGF and Activin treatments can induce mesodermal tissue in ectodermal explants and this mesodermal tissue can induce itself neural tissue in neighboring ectodermal cells (Isaacs, 1997a). We thus decided to first analyze the expression of *Brachyury* in explants in which Activin/Nodal and FGF pathways were ectopically activated. We show that *Brachyury* is only expressed in inner cells of Activin (7/13) or FGF1/2 (4/8) treated explants but never in ectodermal cells (Fig. S3B, C). Moreover, the proportion of explants expressing *Brachyury* is the same as in wild type explants, meaning that Activin or FGF1/2 treatment does not induce formation of ectopic mesodermal tissue under these experimental conditions. In both Activin and FGF1/2 treated explants *K1* is expressed in a broad region (10/11 and 4/4) whereas *Neurogenin* is expressed in a restricted territory (10/11 and 5/5) (Fig. 4N-Q). Interestingly, the treatment of ectodermal explants with both Activin and FGF1/2 leads to *Neurogenin* expression in almost the whole explant (5/5) (Fig. 4S), whereas *K1* is expressed in a restricted region (5/7) or not expressed at all (2/7) (Fig. 4R). Altogether, our data suggest that both FGF and Activin/Nodal pathways are able to induce neural fate acquisition in ectodermal explants, and that they might have complementary roles. In order to decipher the putative epistatic relationships between both signals, we undertook double treatments of ectodermal explants with Activin and SU5402 or with FGF1/2 and SB505124 (an inhibitor of Activin/Nodal signalling pathway receptors). In both cases *Neurogenin* is expressed in a restricted region of the explants ((6/6) for Activin-SU5402 and (3/5) for FGF1/2-SB505124) (fig 4T, U) suggesting that Activin/Nodal and FGF signaling are able to induce neural tissue in explants independently of each other.

The amphioxus possesses an organizer that can induce neural fate in ectodermal explants

To definitely show whether amphioxus possesses a structure homologous to the vertebrate organizer, we grafted the dorsal blastoporal lip of early gastrula stage embryos on the ventral side of the archenteron of host embryos at the same developmental stage (Fig. 5A). In some cases, we observe embryos with two distinct symmetrical anterior parts. Analysis of *Brachyury* gene expression and α -acetylated-tubulin immunostaining shows that these embryos have two axes with a notochord and a neural tube (Fig. 5D-F). These data highly suggest that the dorsal blastoporal lip of amphioxus

can effectively be considered as a functional vertebrate-like organizer able to establish a second neural axis when grafted to a host embryo.

However, from this experiment we still do not know if the ectopic neural tissue comes from the grafted dorsal blastoporal lip itself or if it is induced by the graft. To determine the neural inductive capacity of the organizer, we grafted the dorsal blastoporal lip on ectodermal explants. Because the most dorsal part of the blastoporal lip is clearly an ectodermal tissue at the early gastrula stage, we grafted the mesendodermal part of the lip to be sure not to graft any presumptive neural cells (Fig. 5G). As ectodermal explants tend to close forming a ball we grafted the mesendodermal part of the organizer on the external region of the explants. The grafted explants were cultivated until the time at which normal embryos reach the mid-neurula stage. In this case, we show that *Neurogenin* is broadly expressed in the external cells of the explants that are in contact with the grafted blastoporal lip (2/2) (Fig. 5I), suggesting that the organizer is able to induce the engagement in the neural program of the host cells. Next, we addressed if Activin/Nodal or FGF signaling could be involved in this inductive process. We treated the grafted explants with inhibitors of both signaling pathways. In grafted explants treated with SB505124, *Neurogenin* was expressed in the ectodermal layer and no expression was detected in the grafted organizer (1/2) (Fig. 5J). In SU5402 treated grafted explants, *Neurogenin* was expressed weakly in a very restricted part of the grafted ectoderm (1/1) (Fig. 5K).

To control if it was not the graft manipulation that induced neural tissue, we grafted the medial part of an early gastrula mesendoderm to ectodermal explants. No *Neurogenin* expression was detected (1/1) (Fig. 5H,L) confirming that neural induction was not due to the manipulation but to inductive signals from the grafted blastoporal lip.

Altogether these results suggested that the organizer is able to induce neural tissue in presumptive epidermal cells and that the inductive signal(s) might be FGF, Activin/Nodal or both.

Discussion

Identification of ectodermal, neural and epidermal marker genes

In order to study the fate of ectodermal cells, we first identified *K1* as an amenable marker of differentiating epidermis (Fig. 1A-C, S3), and *SoxB1a*, which had previously been reported as a pan-neural marker (Holland et al., 2000), to identify neural tissue. However, we observed that *SoxB1a* and *K1* are both expressed in epidermal ectoderm in wild type embryos at the gastrula stage as well as in whole ectodermal explants (Fig. 1B, F, 4D, H). This suggests that *SoxB1a* should be considered as a pan-ectodermal marker instead of a neural one. *SoxB1a* is the orthologue of vertebrate *Sox1*, *2* and *3* (Meulemans and Bronner-Fraser, 2007). Amphioxus *SoxB1a* function has been proposed to be homologous to vertebrate *Sox2* function during the establishment of the presumptive neural tissue since it was previously shown to be expressed only in the dorsal part of the ectoderm during gastrulation (Holland et al., 2000). We propose that amphioxus *SoxB1a* function, as well as *SoxB1* genes function in other metazoan species (Kenny et al., 2003; Le Gouar et al., 2004; Lowe et al., 2003; Shinzato et al., 2008), is more closely related to vertebrate *Sox3* than to vertebrate *Sox2* function (Kishi et al., 2000; Okuda et al., 2006; Penzel et al., 1997; Rex et al., 1997) and that it would be involved in the specification of an ectodermal fate rather than a neural fate during the early steps of development.

BMP signaling plays a different role in the dorsoventral patterning of ectoderm and mesendoderm

The BMP pathway is known to be a master signal during dorsoventral patterning in bilaterians (De Robertis, 2008). Moreover, it induces ectoderm differentiation in epidermis (Mizutani and Bier, 2008). As in vertebrates, it has been shown that ectopic activation of the BMP pathway in amphioxus before gastrulation induces the ventralization of the embryo which losses dorsal structures (Kozmikova et al., 2013; Yu et al., 2008a; Yu et al., 2007). Conversely, inhibition of the BMP pathway using dorsomorphin treatments induces an expansion of the expression of dorsal genes such as *SoxB1a* or *Brn1/2/4* at the mid-neurula stage (Kozmikova et al., 2013). In addition to these observations, we have found that inactivation of the BMP pathway through an earlier and stronger dorsomorphin treatment induces the dorsalization of the mesendoderm but although we expected a dorsalization of the ectoderm as in vertebrates (Yu et al., 2008b), neither ventral ectodermal marker such as *Evx*, nor dorsal markers as *Nodal*, *Vg1* or *Zic* are expressed in the ectoderm of these dorsomorphin treated embryos. Altogether, these results suggest that a strong inhibition of BMP signaling is not sufficient for a complete dorsalization of the embryo. Since a high BMP signal ventralizes the embryo whereas absence of BMP induces loss of both ventral and dorsal fate in the ectoderm, we propose that a low BMP signal is needed for a correct dorsal patterning in the amphioxus ectodermal layer. This hypothesis is reinforced by the fact that phosphorylated Smad1/5/8 is detected in the whole ectoderm of wild-type embryos (Kozmikova et al., 2013). Indeed, this previous work clearly shows that during normal development a low activation of the BMP signaling cascade (i.e. phosphorylated Smad1/5/8) occurs in the whole ectoderm. This activation might be required for a proper dorsoventral patterning during early development. As it has been shown that activation of the Activin/Nodal pathway is able to completely dorsalize the amphioxus embryo (Onai et al., 2010), and that *Nodal* expression is lost in the ectoderm of dorsomorphin treated embryos, it is tempting to suggest that a low BMP signal is needed to activate the Nodal pathway which in turn switches on the dorsal program in the ectoderm. Interestingly, it has been shown in sea urchin that *BMP2/4* expression is induced by *Nodal* in the ventral side of the embryo. *BMP2/4* protein acts as a morphogen and diffuses to the dorsal side of the embryo where it activates the expression of dorsal ectodermal genes (Lapraz et al., 2009). In amphioxus, in addition to an inverted role of BMP and Nodal pathways in D/V axis specification, as previously shown (Onai et al., 2010), our data suggest that in the contrary to what is observed in echinoderms BMP would be required during early development to activate *Nodal* expression which would consecutively activate expression of BMP signaling pathway inhibitors such as *Chordin* in the dorsal ectoderm. Moreover, our data show a complete dorsalization of the mesendoderm in dorsomorphin treated embryos (Fig. 1P, T), suggesting that in amphioxus patterning of the D/V axis is controlled differently in the ectoderm and in the mesendoderm. However, another interpretation of the data obtained in the dorsomorphin treated embryos would be that the ectoderm is completely anteriorized. Indeed, the dorsal markers that we used to analyze the phenotype of dorsomorphin treated embryos are normally expressed in the posterior dorsal ectoderm. However, this hypothesis is not likely because *K1* expression is also lost in embryos depleted of BMP signal whereas *SoxB1a* expression is maintained in the whole ectoderm, suggesting that the ectoderm is rather totally unpatterned.

BMP signal is necessary for epidermal fate specification but its inhibition is not sufficient for neural induction

When the BMP pathway is ectopically activated (i.e. by using zBMP4 treatment (Yu et al., 2008a)), the whole ectoderm of amphioxus forms epidermis. This suggests that activation of the BMP signaling is sufficient to launch the epidermal program. In amphioxus, during gastrulation, *BMP2/4* and *BMP5/8* are expressed in all the mesendoderm but no expression is detected in the ectoderm (Yu et al., 2007). Since expression of epidermal markers such as *K1* (Fig.1B), *Dral* (Schubert et al., 1998) or *AP-2* (Meulemans and Bronner-Fraser, 2002) only starts when the invaginated mesendoderm contacts the ectoderm during gastrulation, we suspected that a BMP signal emanating from the mesendoderm could induce the epidermal fate on the ectodermal layer. We therefore decided to develop ectodermal explants, to get rid of the influence of mesendoderm signals on the ectoderm. However, although no gene expression of BMP ligands is observed in the amphioxus ectoderm, phosphorylated Smad1/5/8 is detected in ectodermal cells (Kozmikova et al., 2013). This may explain why cultured ectodermal explants naturally differentiate into epidermis, even if explantation is performed at the 8-cell stage (data not shown). Taken altogether, these data suggest that i) a natural low level of BMP downstream signal in the ectoderm (i.e. phosphorylated Smad1/5/8) would be sufficient for epidermal induction, probably through autoactivation, but in the absence of an extra BMP signaling the exact developmental moment in which epidermis is induced cannot be controlled. And ii) the contact between the ectoderm and the mesendoderm in the whole embryo during gastrulation can be interpreted as an event which establish the exact moment for the epidermal induction. Interestingly, *K1* is not expressed, or only in few cells, in ectodermal explants at the stage at which *K1* is expressed in the non-neural ectoderm of control embryos (gastrula, 9 hpf) (data not shown). This result reinforces the idea that a threshold of BMP signal must be reached to start the epidermal program and that in the whole embryo the threshold is almost instantaneously attained when the mesendoderm touches the ectoderm, whereas in ectodermal explants the threshold is reached later, through a positive feedback loop of the BMP signaling pathway.

If we down-regulate the BMP signaling pathway using dorsomorphin treatments we observe that the ectoderm of amphioxus embryos does not express the epidermal marker *K1*, suggesting that BMP signal is not only sufficient, but also necessary for epidermal induction. However, in ectodermal explants, although we lose most of *K1* expression after dorsomorphin treatments, we still observe some *K1* positive cells. This might be explained by the fact that, because of the sensitivity of ectodermal explants, we had to use a lower concentration in the treatments than the one used in whole embryos. However, this result still supports the fact that BMP signaling is necessary for epidermis differentiation and that in the ectodermal explants there is an active BMP downstream signal which is sufficient for epidermal induction.

Thus, in both ectodermal explants and whole embryos, we observed that BMP inhibition blocks the differentiation of the ectoderm into epidermis. Moreover, in both cases, *SoxB1a* is expressed in all the ectoderm and no neural markers are expressed, implying that in BMP depleted embryos the ectoderm remains in an undifferentiated state. This result strongly suggests that BMP signal inhibition is not sufficient for neural induction indicating that the default model cannot be applied in amphioxus and that instructive signal(s) is(are) required for neural induction of ectodermal cells as in vertebrates (Delaune et al., 2005).

FGF signaling is involved in the patterning of the neural plate

In vertebrates, at least in *Xenopus*, it has been shown that in addition to the inhibition of BMP signaling an FGF instructive activity is necessary for neural induction. In amphioxus, *FGF8/17/18* is expressed at the gastrula stage in the dorsal mesendoderm underlying the forming neural plate. Moreover, *FGF9/16/20* is expressed in a complementary way in the neural plate (Bertrand et al., 2011b). These expression patterns suggest an involvement of FGF signaling during neural tissue formation. However, inhibiting FGF pathway before gastrulation does not block the formation of neural tissue or neural plate (Fig. 1) (Bertrand et al., 2011b) suggesting that FGF signal is not necessary for neural induction in amphioxus. Nevertheless, the inhibition of the FGF signal in the whole embryo affects the patterning of the most anterior part of the neural plate. Indeed, the expression of *Otx* and *Hu/Elav* after SU5402 treatment indicates that the anterior neural tissue is posteriorized when the FGF signal is inhibited (Fig. 2C-D, G-H).

Previous studies showed that ectopic activation of the Activin/Nodal pathway induces a complete neuralization of the whole ectoderm (Onai et al., 2009). In these neuralized embryos the anterior neural gene *Otx* and the posterior neural gene *Wnt3* are complementarily expressed through the anteroposterior axis as in wild type embryos (Onai et al., 2010; Schubert et al., 2001). These results show that anteroposterior patterning of the neural plate is not affected when Activin/Nodal signal is activated. Interestingly, FGF signal depletion in these neuralized embryos leads to the loss of *Otx* neural expression. Moreover, it induces the loss of neural identity in the most anterior part of the neuralized embryos in favor of an epidermal fate. Altogether these results indicate that the FGF signal is necessary for the maintenance of the neural fate in the anterior neuroectoderm as well as for *Otx* neural expression, although it is not possible here to dissociate both functions.

Interestingly, even if *FGF8/17/18* is expressed in the dorsal mesendoderm during amphioxus gastrulation, this expression pattern is very dynamic and it drastically changes at the early/mid-neurula stage. At this later stage, *FGF8/17/18* is not anymore expressed in the dorsal mesendoderm and its expression is localized in the anterior part of the neural plate that will form the cerebral vesicle (Bertrand et al., 2011b). This expression is regionally and temporarily consistent with our observation of a loss of anterior neural fate following FGF inhibition in neuralized embryos, suggesting that the role of the FGF signal in the anterior neural plate might be relayed by *FGF8/17/18*.

Under an evolutionary point of view, these data show that there are some conserved and divergent features concerning the implication of the FGF signal in the development of the nervous system among the three chordate lineages. In vertebrates, the multiplicity of ligands and the existence of four receptors make the study of FGF signal quite complex. However, it has been shown that it is implicated in the neural induction process (Delaune et al., 2005), in the posteriorization of newly formed neural domains (Cox and Hemmati-Brivanlou, 1995), and in the anteroposterior patterning of the brain (Rhinn et al., 2006). In the tunicate *Ciona intestinalis*, it has been shown that neural induction is directly controlled by *FGF9/16/20* and that the FGF signal activates the expression of the early neural marker *Otx* (Bertrand et al., 2003). Moreover, it has also recently been shown that FGF/MAPK signal is necessary for the patterning of the central nervous system (CNS) and that disruption of this pathway leads to a loss of anterior CNS in *Ciona intestinalis* (Wagner and Levine, 2012). Altogether, it seems that the control of *Otx* expression and of the patterning of the CNS are

conserved roles of the FGF signal among cephalochordates and tunicates and that it might be ancestral in the chordate lineage.

Both Activin/Nodal and FGF signals have neural inductive capacities

In amphioxus, Activin/Nodal signaling has been proposed to be involved in dorsoventral patterning acting in opposition to the ventralizing BMP signal during early development. Moreover, gain and loss of function of Activin/Nodal signal lead to the expansion or loss of neural territory respectively (Onai et al., 2010). However, in these previous studies it was not possible to dissociate the role of this pathway in the dorsoventral patterning from its hypothetical function as an instructive neural inducer. Moreover, we showed in this work by using a pharmacological inhibitor of FGFR, that FGF signaling is involved in the formation of the anterior neural tissue. Furthermore, to better understand the role of this pathway, we also studied the effect of gain of function by treating amphioxus embryos with the homologous recombinant protein FGF1/2. Ectopic activation of FGF signaling in the whole embryo does not result in any developmental defect and the neural plate formation is not affected (data not shown). Thus, as for the Activin/Nodal signaling pathway, data obtained using treatments of whole embryos does not allow us to define the neural inductive capacities of the FGF signal.

Again, to get rid of the influence of the mesoderm on the ectoderm differentiation and patterning, we used ectodermal explants to test the inductive potential of both FGF and Activin/Nodal signals. We showed using recombinant protein treatments that in this context both pathways are able to trigger the entry of ectodermal cells into the neural program (Fig. 4Q). FGF and Activin/Nodal signaling are known to be mesoderm inducers in vertebrates (Isaacs, 1997a; Shen, 2007) but in our experiments, no mesoderm tissue was induced by one or the other signal in the explants. Indeed, we observed the same proportion of explants with an internal layer of cells expressing *Brachyury* in the treated and wild type explants. Moreover we have shown that even in the presence of inner mesodermal cells in wild type explants no neural markers are expressed. These observations argue that neuralization by ectopic activation of Activin/Nodal or FGF signal is not due to the presence of mesodermal tissue in ectodermal explants. A striking result, mainly in the case of Activin/Nodal ectopic activation, was to observe induction of neural tissue only in a restricted part of the explants and not the whole explant, since in Activin/Nodal treated embryos the whole ectoderm is neuralized. Interestingly, ectopic activation of both Activin/Nodal and FGF signaling leads to a broader expression of neural markers (Fig. 4S). Moreover, we observed that each signaling pathway induces neural tissue in explants independently of each other, suggesting an additive role of these signals.

From our results concerning the FGF pathway we can propose several interpretations of these data. First, as FGF is implicated in the formation of anterior neural territory, we can propose that, in the explants, cells fated to form anterior or posterior structures are not sensible to the same inducers. In this case the FGF treatment would induce neural fate in cells that have an anterior character whereas Activin/Nodal would induce the neural program in posterior fated cells. Moreover, we have shown that FGF signaling is involved in the maintenance of anterior neural tissue. Thus, another hypothesis explaining our data would be that Activin/Nodal ectopic activation induces neural fate in the whole explant but the maintenance of the neural character in absence of FGF signal is effective only in a restricted region. This hypothesis is consistent with the fact that when we undertake explantation of ectoderm expressing Neurogenin after Activin treatment, this expression is lost over time in part of

the explant even when Activin/Nodal signal is continuously activated (Fig. S4D). In vertebrates, it has been proposed that induction of neural tissue in explants after FGF treatment could be due to the inhibition of BMP signaling through phosphorylation of the linker region of Smad1 (Pera et al., 2003). Moreover, BMP and Activin/Nodal signaling pathways share the same Co-Smad (Smad4) which is unique in amphioxus. It is therefore also possible that Activin/Nodal ectopic activation in our experiments induces the recruitment of an important part of available Smad4, leading to inhibition of BMP downstream signaling pathway. Thus, it is possible that the treatment of explants with FGF1/2 or Activin induces an indirect inhibition of the BMP downstream signaling cascade. Nevertheless, since BMP inhibition in whole embryos as in ectodermal explants does not induce neural tissue formation, this suggests that if BMP inhibition in treated explant experiments is involved in neural induction, it is not the only mechanism.

These observations argue that the FGF and Activin/Nodal signaling support neural inductive instructions and that each signal is sufficient to induce neural tissue, independently of each other. Moreover, it seems that they have complementary inductive neural activities during neural induction in ectodermal explants.

Only few data are available in vertebrates concerning a putative function of Activin/Nodal signaling during neural induction, and these data are contradictory. In one hand, inhibition of both BMP and Activin/Nodal signaling is proposed to be sufficient to induce neural tissue (Chang and Harland, 2007) whereas on the other hand, neural cell fate induced by ectopic activation of FGF in BMP depleted cells is lost when Nodal signaling is inhibited in the same time (Linker et al., 2009). Based on these results in *Xenopus*, it is not possible yet to put in an evolutionary context our observations concerning the involvement of Activin/Nodal signaling in neural induction mechanism.

An organizer in amphioxus

Although it has long been suggested that the dorsal blastoporal lip of amphioxus would be homologous to the vertebrate organizer, both from graft experiments as well as conservation of specific genes expression, it has never been demonstrated that this region of the gastrula is able to trigger neural induction in a host embryo (Yu et al., 2007). Moreover, the results from graft experiments only showed the capacity of the dorsal blastoporal lip to form a partial secondary axis and no pictures of these data were never published (Tung et al., 1962a). Here we show for the first time since the experiments of Tung in the 50-60's that grafting the dorsal blastoporal lip of amphioxus on a host gastrula induces the formation of a secondary anterior axis and that both axes consist of at least a notochord and a neural tube (Fig. 5D-F). Moreover, we show that the dorsal blastoporal lip of amphioxus, when grafted to ectodermal explants fated to become epidermis, is able to induce neural fate (Fig. 5I). Thus, for the first time we definitively demonstrate here that the amphioxus dorsal blastoporal lip is functionally homologous to the vertebrate's organizer.

Nodal (Fig. 1Q-R), *FGF8/17/18* and *FGF9/16/20* (Bertrand et al., 2011b) are both expressed in the amphioxus dorsal blastoporal lip during gastrulation, and Activin/Nodal as well as FGF signaling pathways are able to induce the expression of neural markers in ectodermal explants. This suggests that both pathways could be the signals from the organizer responsible for induction of the formation of the neuroectoderm. We also showed that Activin/Nodal and FGF signaling induce neural tissue in explants independently of each other (Fig. 4S-U). Interestingly, the same observation is made when the dorsal blastoporal lip is grafted onto the explants (Fig. 5J-K), supporting the idea that

each signal is sufficient but not necessary for neural induction. We therefore wondered if inhibiting both pathways would block neural induction triggered by the organizer grafted onto explants. Unfortunately, double treatments with inhibitors of FGF and Activin/Nodal pathways is deleterious for explants (data not shown), preventing us from excluding another pathway as a possible neural inducer during normal development. Nevertheless all the data obtained in this work strongly suggest that during amphioxus development both FGF and Activin/Nodal signals are acting together to induce and maintain the neural fate in the dorsal ectoderm.

Conclusion

Our data show for the first time that the dorsal blastoporal lip in amphioxus is functionally homologous to the vertebrate organizer. This reinforces the idea that this particular structure is a synapomorphy of chordates which was lost in the tunicate lineage. We also show that BMP signaling is involved in epidermis induction and that its inhibition is necessary but not sufficient to induce neural fate in amphioxus, something that is similar to data obtained in vertebrates. Thus, the default model for neural induction does not completely reflect how this process is controlled during embryogenesis in chordates. Furthermore, our observations allow us to propose a mechanism through which the first steps of neural plate formation is controlled in amphioxus. Thereby, we propose that ectoderm fate during gastrulation is controlled by BMP which induces epidermis. In the dorsal part of the embryo, Activin/Nodal pathway would act both through BMP signal inhibition (maybe through the induction of *Chordin* expression) but also as a direct neural inducing signal. Concerning FGF signaling, it can be involved in the process as a neural minor inductor but its function would be mainly in the maintenance and the regionalization of the neuroectoderm.

Activin/Nodal signaling is considered to be involved in mesoderm induction but not in neural induction in vertebrates. Moreover, two recent studies suggest that inhibition of Activin/Nodal signaling is necessary for the induction of ectopic neural tissue (Chang and Harland, 2007; Linker et al., 2009). Since Activin/Nodal pathway is likely to be the neural inducing signal in amphioxus, this suggests that the implication of this pathway in the neural induction process is specific to the cephalochordate lineage, or that it was lost in vertebrates. However, our data strongly plead for a renewed analysis of the detailed role of Activin/Nodal in vertebrate neural induction.

Concerning the FGF signaling, our work indicates that its function in neural tissue maintenance and patterning would be conserved among chordates. However, in tunicates as in vertebrates, FGF signal is required for neural induction whereas in amphioxus its implication as neural inductor could be minor. The divergence with tunicates might be explained by the absence of an organizer in this lineage whereas the divergence with vertebrates might be the result of the complexification of this pathway in vertebrates associated to its recruitment for the control of the neural induction process.

Figures

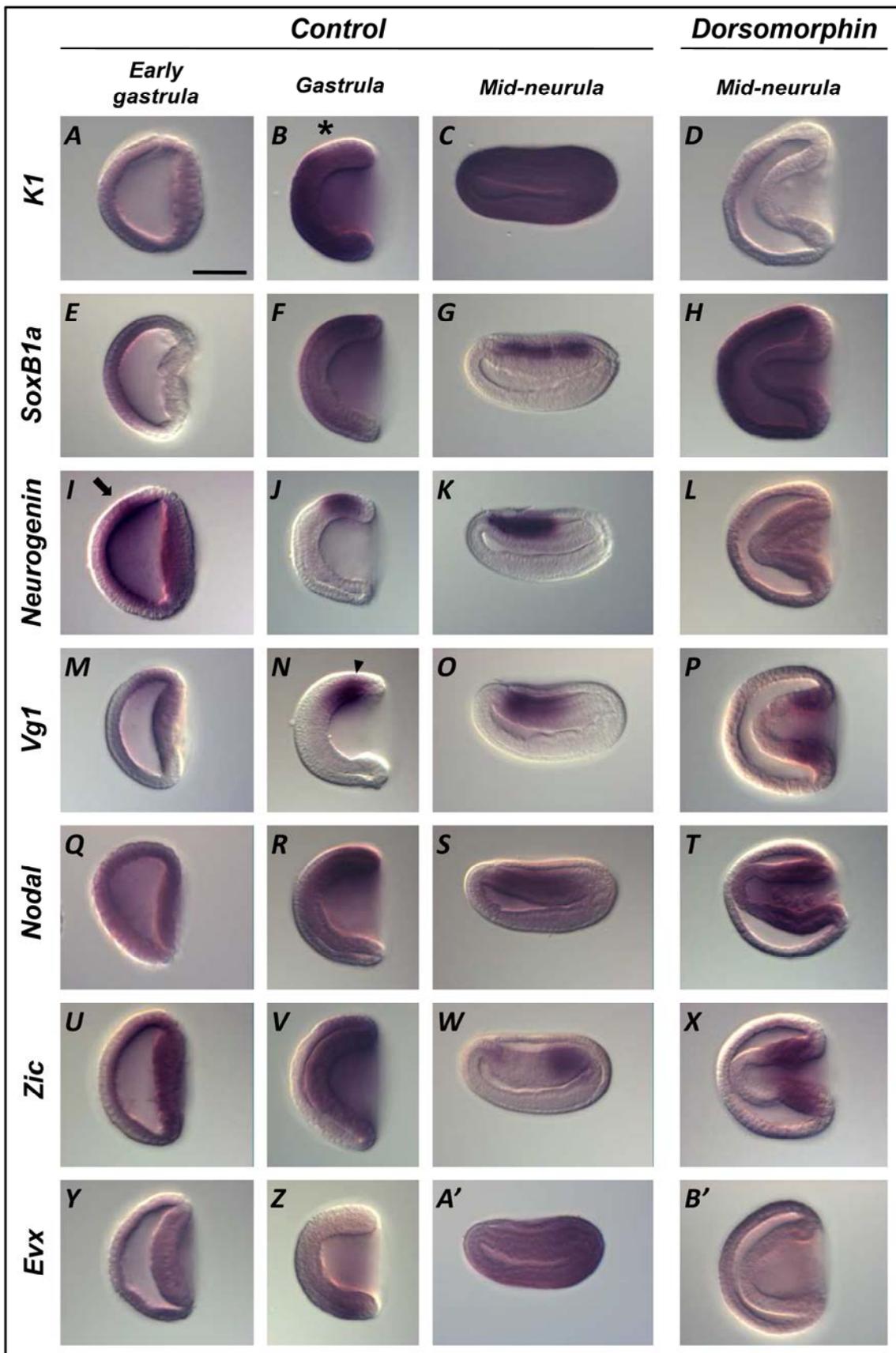


Figure 1: BMP inhibition *in vivo* does not induce neural fate but leads to a dorsalization of the embryo.

Expression analysis by *in situ* hybridization of *K1* (A-D), *SoxB1a* (E-H), *Neurogenin* (I-L), *Vg1* (M-P), *Nodal* (Q-T), *Zic* (U-X) and *Evx* (Y-Z and A'-B') in control (early gastrula, gastrula and mid-neurula stages) and treated embryos. Embryos were treated at the blastula stage with 35 μ M dorsomorphin and fixed at the mid-neurula stage (19 hpf at 19°C). Asterisk in (B) represents the absence of *K1* expression in the dorsal ectoderm at the gastrula stage. Arrow in (I) indicates *Neurogenin* expression in the anterior part of the dorsal ectoderm at the early gastrula stage. Arrowhead in (N) indicates the weak expression of *Vg1* in the dorsal ectoderm at the gastrula stage. Scale bar: 50 μ m.

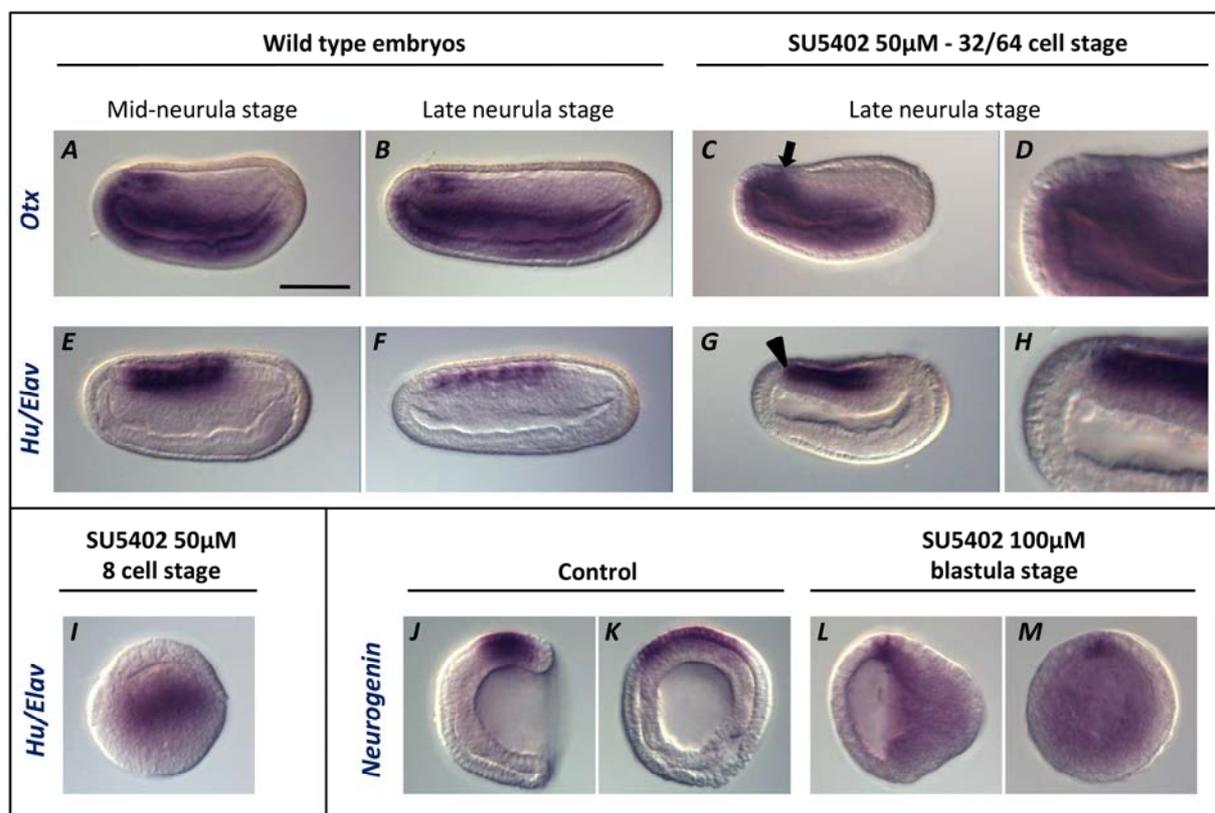


Figure 2: FGF inhibition *in vivo* does not block neural induction.

Expression analysis by *in situ* hybridization of the neural markers *Otx* (A-D), *Hu/Elav* (E-I) and *Neurogenin* (J-K) in control (A, B, E, F, J and K) and SU5402 treated embryos (C, D, G, H, I, L and M). Embryos were treated with 50 μ M SU5402 at the cleavage stage (C, D, G and H) or at the 8 cell stage (I) or with 100 μ M SU5402 at the blastula stage (L, M). All embryos are dorsal to the top and anterior to the left except embryos in (K) and (M) which are respectively blastoporal views of embryos in (J) and (L). Arrow in (C) indicates the restricted expression of *Otx* in the anterior neural plate. Arrowhead in G indicates the expression of *Hu/Elav* in the most anterior part of the neural plate. (D and H): focus on the anterior part of embryos respectively in C and D. Scale bar: 50 μ m.

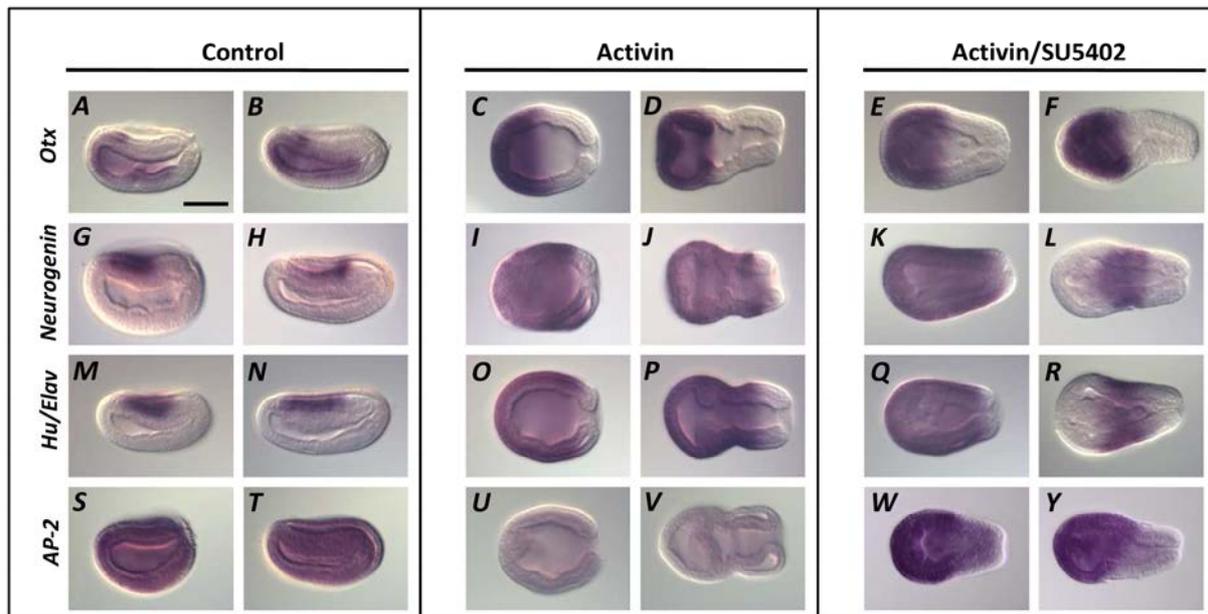


Figure 3: FGF signaling maintains anterior neural fate in neuralized Activin treated embryos.

Expression analysis by *in situ* hybridization of the neural markers *Otx* (A-F), *Neurogenin* (G-L), *Hu/Elav* (M-R) and the epidermal marker *AP-2* (S-Y) in control embryos (A, B, G, H, M, N, S and T), in Activin treated embryos (C, D, I, J, O, P, U, and V) and in Activin/SU5402 treated embryos (E, F, K, L, Q, R, W and Y). Embryos were treated at the cleavage stage with 50ng/ml Activin and/or 50 μ M SU5402. Scale bar: 50 μ m.

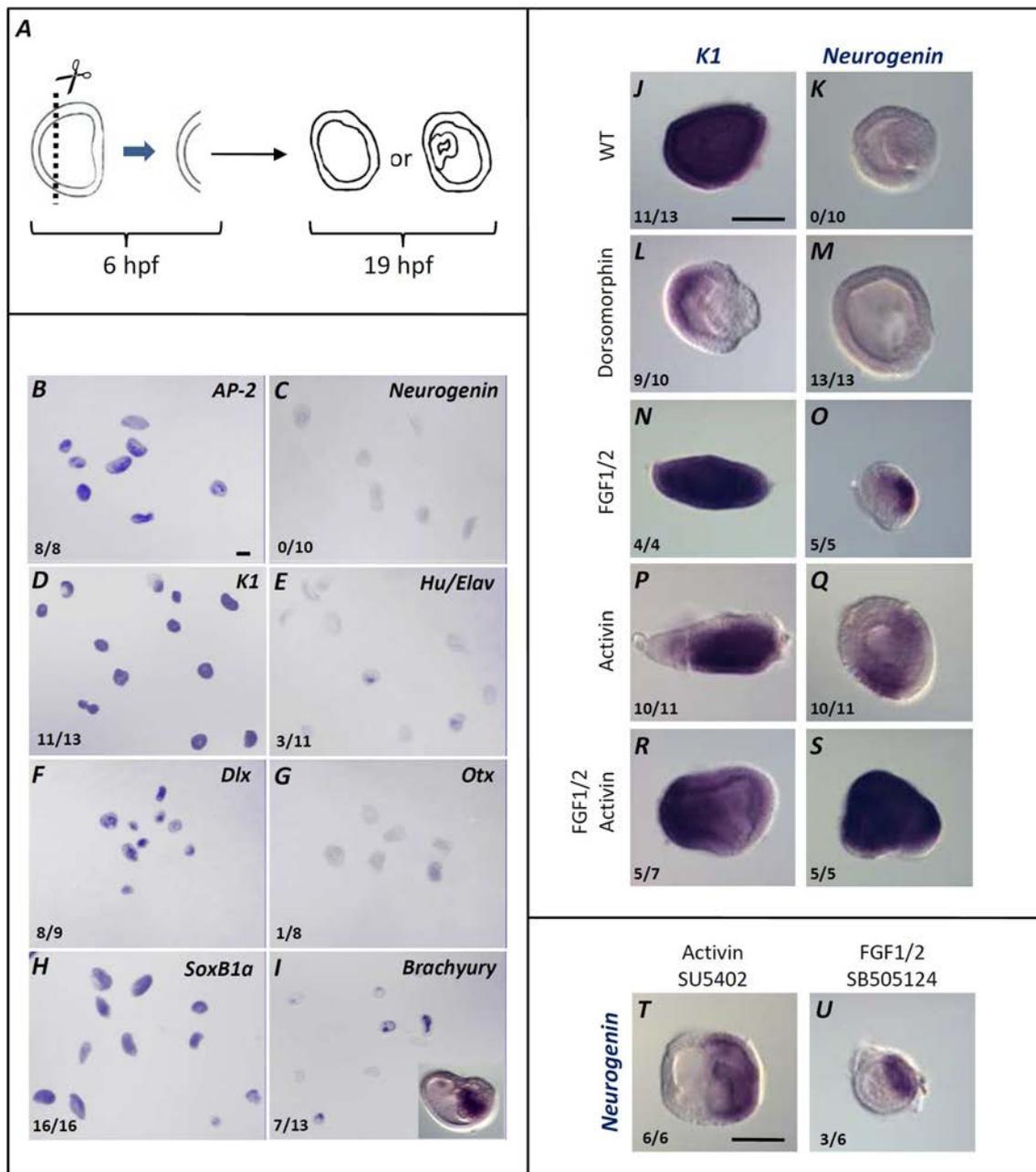


Figure 4: Activin/Nodal and FGF signaling induce neural tissue in ectodermal explants.

Schematic representation of the explantation procedure and the time of development of the explants (A). Once explanted the ectodermal cells after 13 hours may develop into two different morphologies (hollow balls or balls with a piece of internal tissue) with a 1/1 ratio. Expression analysis by *in situ* hybridization of the epidermal markers AP-2 (B), K1 (D), Dlx (F), the pan-ectodermal marker SoxB1a (H), the neural markers Neurogenin (C), Hu/Elav (E), the neuro-endodermal marker Otx (G) and the mesodermal marker Brachyury (I) in untreated explants. Expression analysis by *in situ* hybridization of K1 and Neurogenin in individual untreated explants (J-K), and explants treated after the explantation with 10 μ M dorsomorphin (L-M), with 2 μ g/ml FGF1/2 (N-O), with 50ng/ml Activin (P-Q), or with both Activin and FGF1/2 with the previous indicated concentrations (R-S). Expression analysis by *in situ* hybridization of Neurogenin in individual explants treated with 50ng/ml Activin and 50 μ M SU5402 (T) or with 2 μ g/ml FGF1/2 and 50 μ M SB505124 (U). Scale bar: 50 μ m.

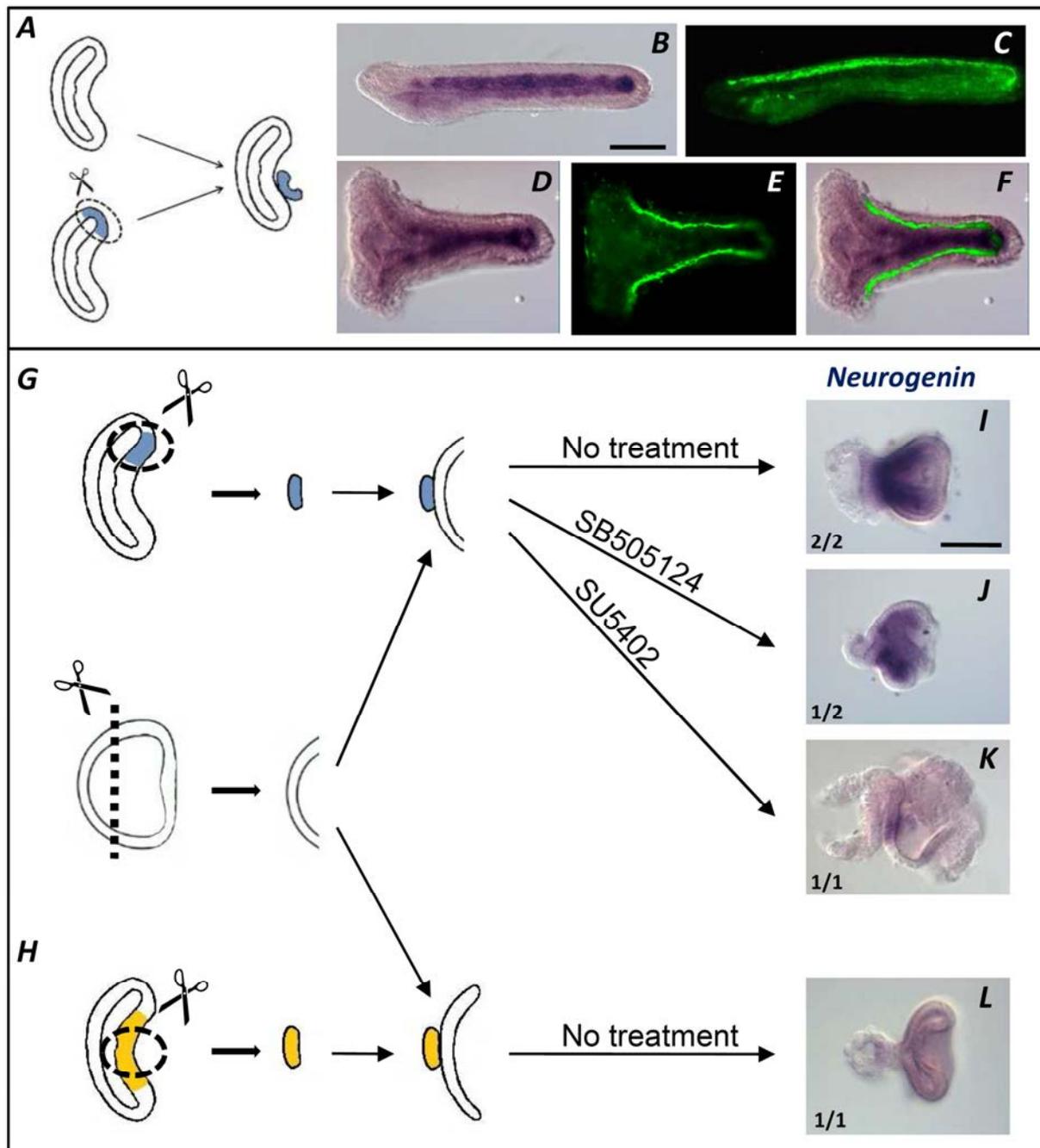


Figure 5: The dorsal blastoporal lip induces a secondary axis and neural tissue formation.

Schematic representation of the graft procedure of the dorsal blastoporal lip in the ventral part of the archenteron at the early gastrula stage (A). Expression analysis by *in situ* hybridization of the notochordal marker *Brachyury* in control (B) and grafted embryo (D). Immunostaining of acetylated tubulin labeling axons of the neural tube in control (C) and grafted embryo (E). (F) superposition of (D) and (E). Schematic representation of the graft procedure of the dorsal blastoporal lip (G) or the medial mesendoderm (H) on an ectodermal explant. (I-K) Expression analysis by *in situ* hybridization of *Neurogenin* after 13 hours of development of grafted explants following the procedure presented in (G). Untreated grafted explant (I). Grafted explant treated with 50 μM SB505124 (J). Grafted explant treated with 50 μM SU5402 (K). Expression analysis by *in situ* hybridization of *Neurogenin* after 13 hours of development of untreated grafted explant following the procedure presented in (H), (L). Scale bar: 50 μm.

Supplementary

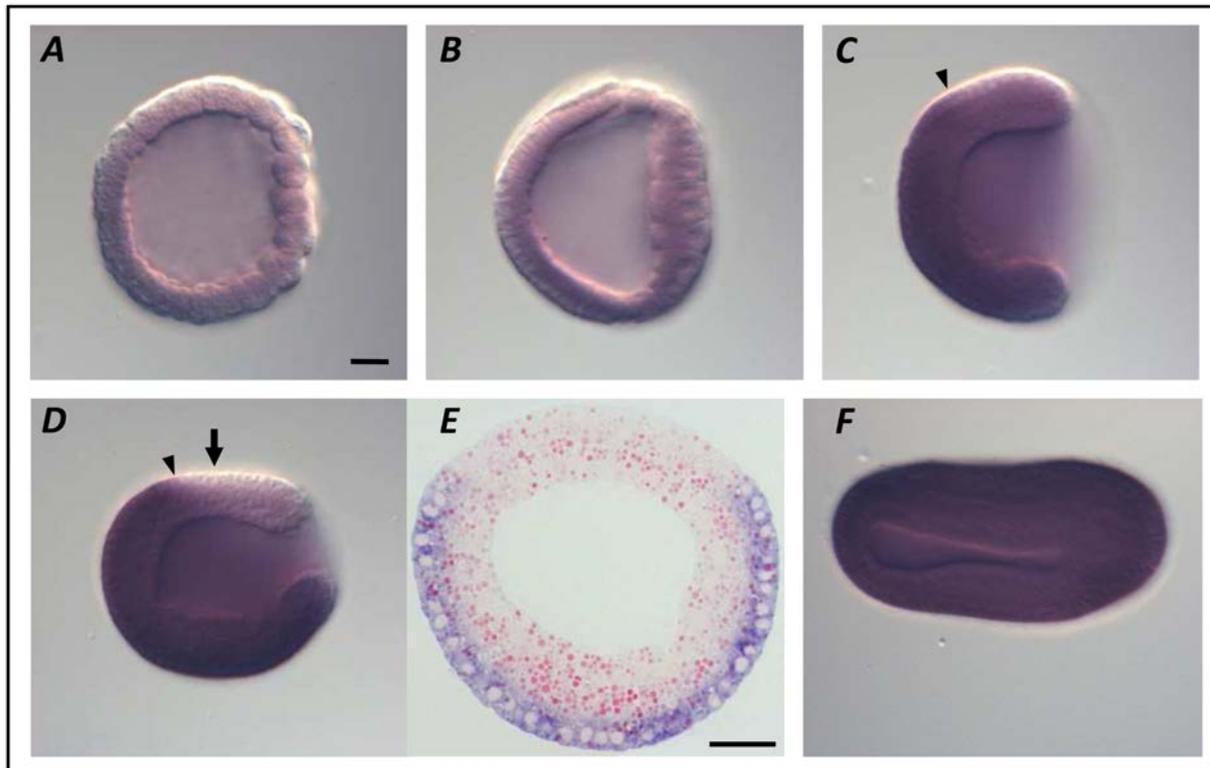


Figure S1: Expression pattern of the epidermal gene *K1*.

Expression analysis of *K1* by *in situ* hybridization at blastula stage (A), early gastrula stage (B), gastrula stage (C), late gastrula (D-E) and mid-neurula stage (F). Arrowhead in (C) and (D) indicate the dorsal limit of expression of *K1* in the ectoderm. (E): cross section of (D) at the level of the arrow. *K1* is expressed only in the ectoderm. All the pictures are lateral view, except (E) which is blastoporal view. Scale bar: 20 μ m.

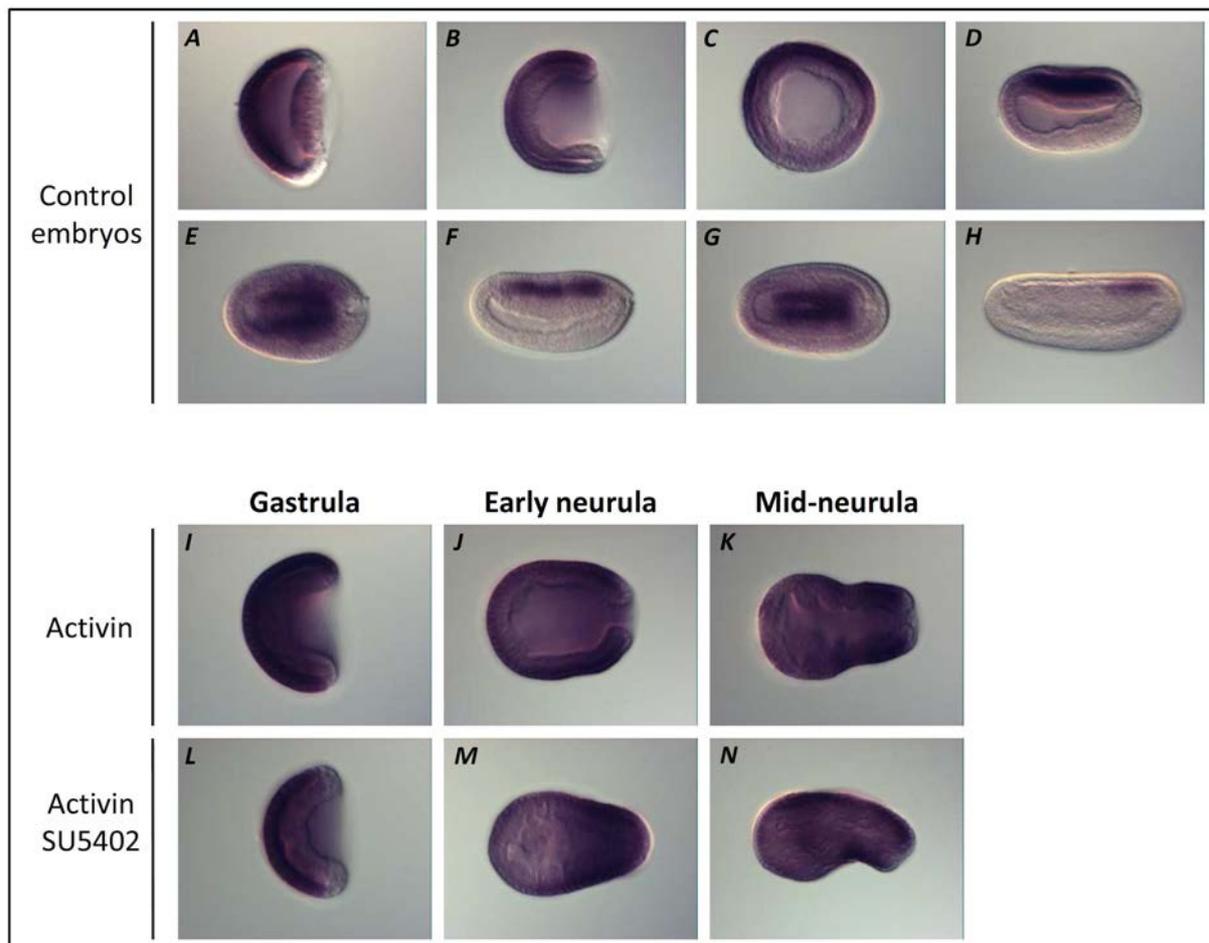


Figure S2: Expression pattern of *SoxB1a* in wild type embryos and Activin treated or Activin/SU5402 treated embryos.

Expression analysis of *SoxB1a* by *in situ* hybridization. (A-H): Expression of *SoxB1a* in wild type embryos. (A): early gastrula stage. (B-C): gastrula stage in lateral view (B) or in blastoporal view (C). (D-E): early neurula stage in lateral view (D) or in dorsal view (E). (F-G): mid-neurula stage in lateral view (F) or in dorsal view (G). (H): neurula stage in lateral view. Expression of *SoxB1a* in Activin treated embryos (I-K) and in Activin/SU5402 treated embryos (L-N). Embryos were treated during blastulation with 50ng/ml Activin and 50 μ M SU5402. (I and L): gastrula stage. (J and M): early neurula stage. (K and N): mid-neurula stage.

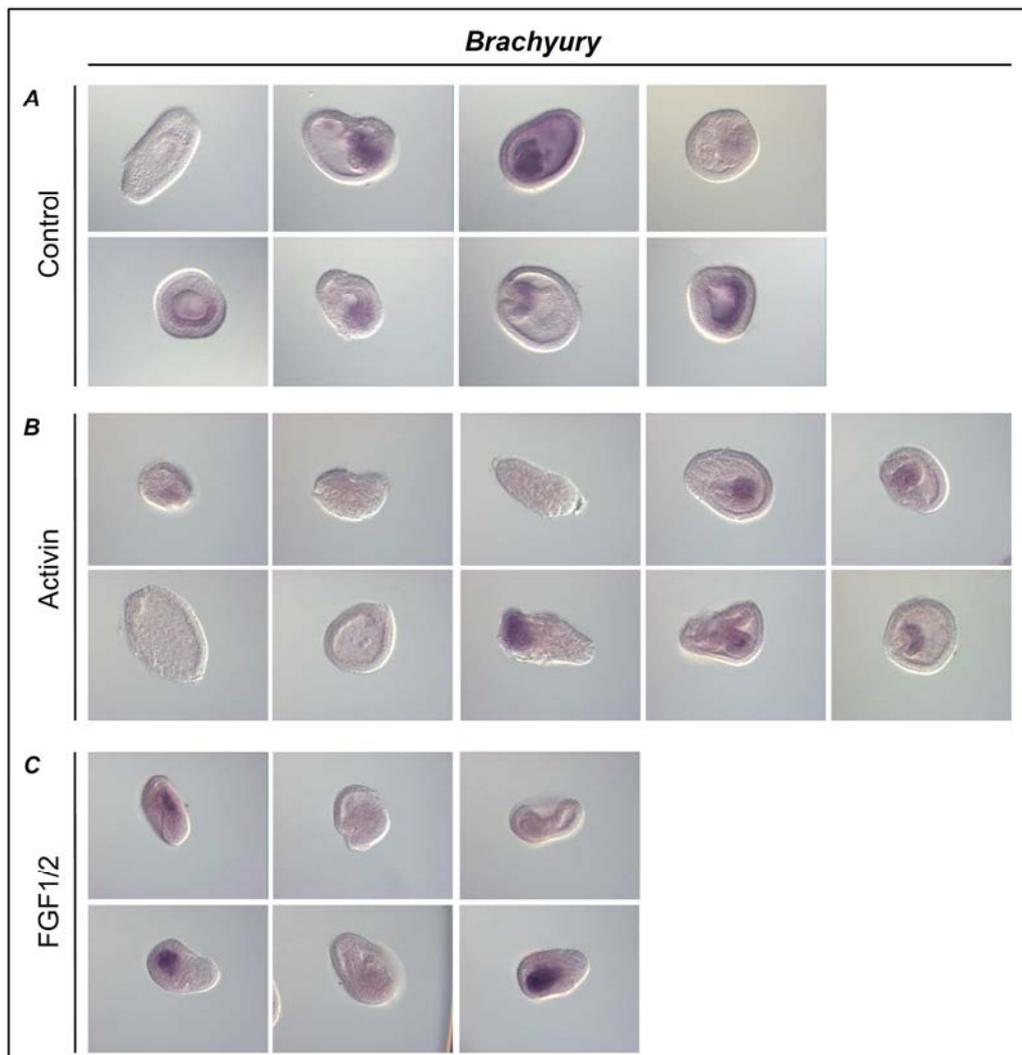


Figure S3: Expression of the mesodermal marker *Brachyury* in wild type and treated ectodermal explants.

Expression analysis of *Brachyury* by *in situ* hybridization in wild type ectodermal explants (A), in 50ng/ml Activin treated ectodermal explants (B) and in 2 μ g/ml FGF1/2 treated ectodermal explants (C). Explants were treated from explantation (at early gastrula stage) to fixation at a stage when control embryos reach mid-neurula stage.

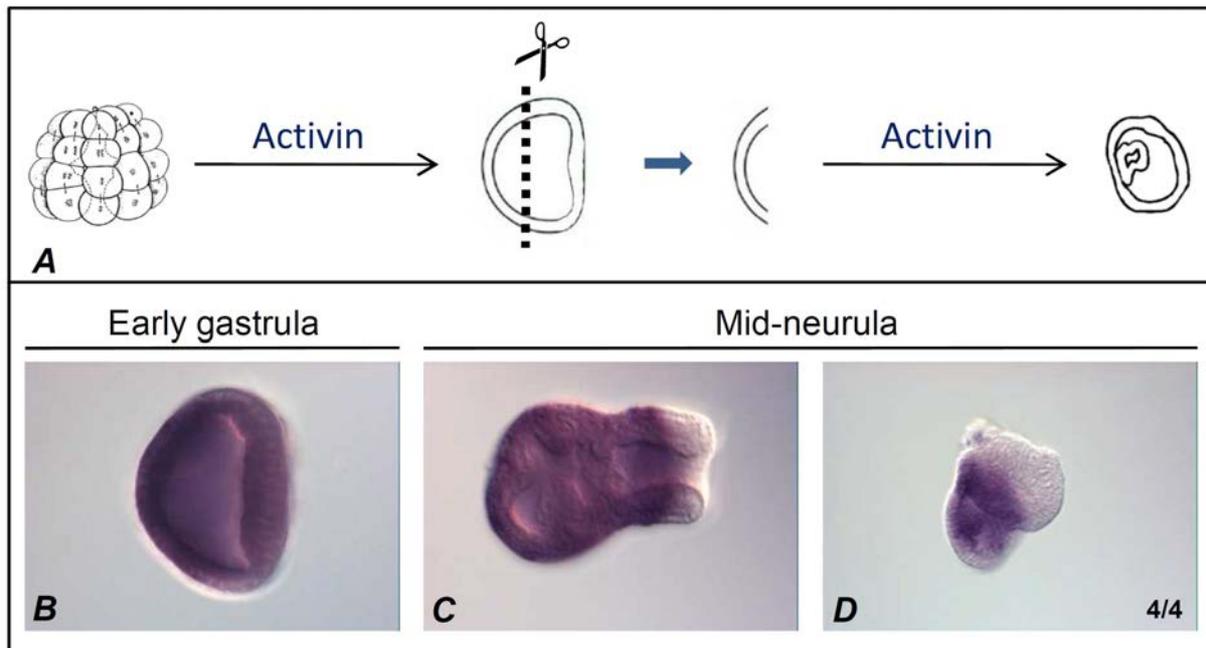


Figure S4: Expression analysis in whole embryos and ectodermal explants of *Neurogenin* after Activin/Nodal continuous treatment starting at the cleavage stage.

(A): experimental procedure. (B): embryos fixed at the early gastrula stage. *Neurogenin* is expressed in all the ectoderm before explantation. (C): embryos fixed at the mid-neurula stage. (D): ectodermal explants fixed at the same time as embryos in (C) showing a limited expression of *Neurogenin*. Embryos were treated with 50ng/ml Activin.

References

- Bertrand, S., Camasses, A., Somorjai, I., Belgacem, M. R., Chabrol, O., Escande, M. L., Pontarotti, P. and Escriva, H.** (2011). Amphioxus FGF signaling predicts the acquisition of vertebrate morphological traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9160-5.
- Bertrand, V., Hudson, C., Caillol, D., Popovici, C. and Lemaire, P.** (2003). Neural tissue in ascidian embryos is induced by FGF9/16/20, acting via a combination of maternal GATA and Ets transcription factors. *Cell* **115**, 615-27.
- Bourlat, S. J., Juliusdottir, T., Lowe, C. J., Freeman, R., Aronowicz, J., Kirschner, M., Lander, E. S., Thorndyke, M., Nakano, H., Kohn, A. B. et al.** (2006). Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida. *Nature* **444**, 85-8.
- Chang, C. and Harland, R. M.** (2007). Neural induction requires continued suppression of both Smad1 and Smad2 signals during gastrulation. *Development* **134**, 3861-72.
- Cox, W. G. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1995). Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development* **121**, 4349-58.
- Darras, S. and Nishida, H.** (2001). The BMP signaling pathway is required together with the FGF pathway for notochord induction in the ascidian embryo. *Development* **128**, 2629-38.
- De Robertis, E. M.** (2008). Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell*, 185-195.
- Delaune, E., Lemaire, P. and Kodjabachian, L.** (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development* **132**, 299-310.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D. and Philippe, H.** (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* **439**, 965-8.
- Fainsod, A., Deissler, K., Yelin, R., Marom, K., Epstein, M., Pillemer, G., Steinbeisser, H. and Blum, M.** (1997). The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech Dev* **63**, 39-50.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G. and Melton, D. A.** (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* **77**, 283-95.
- Hemmati-Brivanlou, A. and Melton, D.** (1997). Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise. *Cell* **88**, 13-7.
- Holland, L. Z., Schubert, M., Holland, N. D. and Neuman, T.** (2000). Evolutionary conservation of the presumptive neural plate markers *AmphiSox1/2/3* and *AmphiNeurogenin* in the invertebrate chordate amphioxus. *Dev Biol* **226**, 18-33.
- Hunt, T. E.** (1929). Hensen's node as an organizer in the formation of the chick embryo. *Anat. Rec.* **22**.
- Isaacs, H. V.** (1997). New perspectives on the role of the fibroblast growth factor family in amphibian development. *Cell Mol Life Sci* **53**, 350-61.
- Karabinos, A., Wang, J., Wenzel, D., Panopoulou, G., Lehrach, H. and Weber, K.** (2001). Developmentally controlled expression patterns of intermediate filament proteins in the cephalochordate *Branchiostoma*. *Mech Dev* **101**, 283-8.
- Kenny, A. P., Oleksyn, D. W., Newman, L. A., Angerer, R. C. and Angerer, L. M.** (2003). Tight regulation of *SpSoxB* factors is required for patterning and morphogenesis in sea urchin embryos. *Dev Biol* **261**, 412-25.
- Kishi, M., Mizuseki, K., Sasai, N., Yamazaki, H., Shiota, K., Nakanishi, S. and Sasai, Y.** (2000). Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* **127**, 791-800.
- Koshida, S., Shinya, M., Nikaido, M., Ueno, N., Schulte-Merker, S., Kuroiwa, A. and Takeda, H.** (2002). Inhibition of BMP activity by the FGF signal promotes posterior neural development in zebrafish. *Dev Biol* **244**, 9-20.
- Kozmikova, I., Candiani, S., Fabian, P., Gurska, D. and Kozmik, Z.** (2013). Essential role of Bmp signaling and its positive feedback loop in the early cell fate evolution of chordates. *Dev Biol* **382**, 538-54.

- Lapraz, F., Besnardeau, L. and Lepage, T.** (2009). Patterning of the dorsal-ventral axis in echinoderms: insights into the evolution of the BMP-chordin signaling network. *PLoS Biol* **7**, e1000248.
- Launay, C., Fromentoux, V., Shi, D. L. and Boucaut, J. C.** (1996). A truncated FGF receptor blocks neural induction by endogenous *Xenopus* inducers. *Development* **122**, 869-80.
- Le Gouar, M., Guillou, A. and Vervoort, M.** (2004). Expression of a SoxB and a Wnt2/13 gene during the development of the mollusc *Patella vulgata*. *Dev Genes Evol* **214**, 250-6.
- Linker, C., De Almeida, I., Papanayotou, C., Stower, M., Sabado, V., Ghorani, E., Streit, A., Mayor, R. and Stern, C. D.** (2009). Cell communication with the neural plate is required for induction of neural markers by BMP inhibition: evidence for homeogenetic induction and implications for *Xenopus* animal cap and chick explant assays. *Dev Biol* **327**, 478-86.
- Linker, C. and Stern, C. D.** (2004). Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development* **131**, 5671-81.
- Lowe, C. J., Wu, M., Salic, A., Evans, L., Lander, E., Stange-Thomann, N., Gruber, C. E., Gerhart, J. and Kirschner, M.** (2003). Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell* **113**, 853-65.
- Lu, T. M., Luo, Y. J. and Yu, J. K.** (2012). BMP and Delta/Notch signaling control the development of amphioxus epidermal sensory neurons: insights into the evolution of the peripheral sensory system. *Development* **139**, 2020-30.
- Luther, W. H.** (1935). Entwicklungsphysiologische Untersuchungen am Forellenkeim: die Rolle des Organisationszentrums bei der Entstehung der Embryonalanlage *Biol Zentralbl*, 114-137.
- Marchal, L., Luxardi, G., Thome, V. and Kodjabachian, L.** (2009). BMP inhibition initiates neural induction via FGF signaling and *Zic* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17437-42.
- Meulemans, D. and Bronner-Fraser, M.** (2002). Amphioxus and lamprey AP-2 genes: implications for neural crest evolution and migration patterns. *Development* **129**, 4953-62.
- Meulemans, D. and Bronner-Fraser, M.** (2007). The amphioxus SoxB family: implications for the evolution of vertebrate placodes. *Int J Biol Sci* **3**, 356-64.
- Mizutani, C. M. and Bier, E.** (2008). *EvoD/Vo*: the origins of BMP signalling in the neuroectoderm. *Nat Rev Genet* **9**, 663-77.
- Okuda, Y., Yoda, H., Uchikawa, M., Furutani-Seiki, M., Takeda, H., Kondoh, H. and Kamachi, Y.** (2006). Comparative genomic and expression analysis of group B1 *sox* genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution. *Dev Dyn* **235**, 811-25.
- Onai, T., Lin, H. C., Schubert, M., Koop, D., Osborne, P. W., Alvarez, S., Alvarez, R., Holland, N. D. and Holland, L. Z.** (2009). Retinoic acid and Wnt/beta-catenin have complementary roles in anterior/posterior patterning embryos of the basal chordate amphioxus. *Dev Biol* **332**, 223-33.
- Onai, T., Yu, J. K., Blitz, I. L., Cho, K. W. and Holland, L. Z.** (2010). Opposing Nodal/Vg1 and BMP signals mediate axial patterning in embryos of the basal chordate amphioxus. *Dev Biol* **344**, 377-89.
- Penzel, R., Oswald, R., Chen, Y., Tacke, L. and Grunz, H.** (1997). Characterization and early embryonic expression of a neural specific transcription factor *xSOX3* in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* **41**, 667-77.
- Pera, E. M., Ikeda, A., Eivers, E. and De Robertis, E. M.** (2003). Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev* **17**, 3023-8.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M.** (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**, 589-98.
- Qiao, Y., Zhu, Y., Sheng, N., Chen, J., Tao, R., Zhu, Q., Zhang, T., Qian, C. and Jing, N.** (2012). AP2gamma regulates neural and epidermal development downstream of the BMP pathway at early stages of ectodermal patterning. *Cell Res* **22**, 1546-61.
- Rex, M., Orme, A., Uwanogho, D., Tointon, K., Wigmore, P. M., Sharpe, P. T. and Scotting, P. J.** (1997). Dynamic expression of chicken *Sox2* and *Sox3* genes in ectoderm induced to form neural tissue. *Dev Dyn* **209**, 323-32.

- Rhinn, M., Picker, A. and Brand, M.** (2006). Global and local mechanisms of forebrain and midbrain patterning. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 5-12.
- Sasai, Y., Lu, B., Piccolo, S. and De Robertis, E. M.** (1996). Endoderm induction by the organizer-secreted factors chordin and noggin in *Xenopus* animal caps. *Embo J* **15**, 4547-55.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K. and De Robertis, E. M.** (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* **79**, 779-90.
- Satoh, G., Wang, Y., Zhang, P. and Satoh, N.** (2001). Early development of amphioxus nervous system with special reference to segmental cell organization and putative sensory cell precursors: a study based on the expression of pan-neuronal marker gene *Hu/elav*. *J Exp Zool* **291**, 354-64.
- Schubert, M., Holland, L. Z., Stokes, M. D. and Holland, N. D.** (2001). Three amphioxus Wnt genes (*AmphiWnt3*, *AmphiWnt5*, and *AmphiWnt6*) associated with the tail bud: the evolution of somitogenesis in chordates. *Dev Biol* **240**, 262-73.
- Schubert, M., Holland, N. D. and Holland, L. Z.** (1998). Amphioxus *AmphiDRAL* encoding a LIM-domain protein: expression in the epidermis but not in the presumptive neuroectoderm. *Mech Dev* **76**, 203-5.
- Shen, M. M.** (2007). Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* **134**, 1023-34.
- Shinzato, C., Iguchi, A., Hayward, D. C., Technau, U., Ball, E. E. and Miller, D. J.** (2008). Sox genes in the coral *Acropora millepora*: divergent expression patterns reflect differences in developmental mechanisms within the Anthozoa. *BMC Evol Biol* **8**, 311.
- Smith, W. C. and Harland, R. M.** (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* **70**, 829-40.
- Spemann, H. and Mangold, H.** (1924). Induction of embryonic primordial by implantation of organizers from a different species. *Roux's Arch. Entw. Mech.*, 599–638 (reprinted and translated in *Int. J. Dev. Biol.* (2001) **45**, 13–31).
- Streit, A., Berliner, A. J., Papanayotou, C., Sirulnik, A. and Stern, C. D.** (2000). Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* **406**, 74-8.
- Tung, T. C., Wu, S. C. and Tung, Y. Y.** (1962a). Experimental studies on the neural induction in amphioxus. *Scientia Sinica* **11**, 805-820.
- Tung, T. C., Wu, S. C. and Tung, Y. Y.** (1962b). The presumptive areas of the egg of amphioxus. *Scientia Sinica* **7**, 81-92.
- Waddington, C. H.** (1936). Organizers in Mammalian Development. *Nature*, 125.
- Wagner, E. and Levine, M.** (2012). FGF signaling establishes the anterior border of the *Ciona* neural tube. *Development* **139**, 2351-9.
- Wilson, P. A. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by *Bmp-4*. *Nature* **376**, 331-3.
- Wilson, S. I., Graziano, E., Harland, R., Jessell, T. M. and Edlund, T.** (2000). An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr Biol* **10**, 421-9.
- Yu, J. K., Meulemans, D., McKeown, S. J. and Bronner-Fraser, M.** (2008a). Insights from the amphioxus genome on the origin of vertebrate neural crest. *Genome Res* **18**, 1127-32.
- Yu, J. K., Satou, Y., Holland, N. D., Shin, I. T., Kohara, Y., Satoh, N., Bronner-Fraser, M. and Holland, L. Z.** (2007). Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer. *Nature* **445**, 613-7.
- Yu, P. B., Hong, C. C., Sachidanandan, C., Babitt, J. L., Deng, D. Y., Hoyng, S. A., Lin, H. Y., Bloch, K. D. and Peterson, R. T.** (2008b). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol* **4**, 33-41.
- Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M. and Harland, R. M.** (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**, 599-606.

IV - ANALYSE ET CRITIQUE DES DONNEES PRESENTEES DANS L'ARTICLE ET PRESPECTIVES EXPERIMENTALES

Inhibition de la voie de signalisation BMP

L'inhibition de la voie de signalisation BMP par traitement à la dorsomorphine induit une perte de spécification de l'ectoderme, que ce soit en tissu neural ou en tissu épidermique. Puisque différentes observations suggèrent que le signal FGF est impliqué dans l'induction neurale, j'ai cherché à identifier l'effet d'une activation ectopique de ce signal dans les embryons traités à une concentration forte de dorsomorphine (35µM). Cependant, à cette concentration, le co-traitement FGF1/2 - dorsomorphine est délétère pour les embryons qui ne parviennent plus à se développer et restent bloqués en début de gastrulation. Chez ces embryons, aucune expression de *Neurogenin* n'a été identifiée. Il n'a donc pas été possible de conclure quant à l'effet d'une activation ectopique du signal FGF dans des embryons déplétés du signal BMP.

Dans l'ensemble des expériences présentées dans l'article, la voie de signalisation BMP a été inhibée à l'aide de la dorsomorphine. Cependant, l'utilisation d'un inhibiteur chimique peut entraîner des effets non spécifiques. Dans le but de confirmer les résultats obtenus avec la dorsomorphine, j'ai essayé d'inhiber le signal BMP par surexpression de *Noggin*. L'ectoderme des embryons microinjectés avec l'ARNm de *Noggin* a été explanté et cultivé. Dans ces explants, aucune expression de *Neurogenin* n'a été identifiée, contrairement à *K1* qui est exprimé dans l'ensemble des cellules. Cette observation n'a pas permis de conclure à une inhibition efficace de la voie de signalisation BMP et de confirmer les résultats obtenus avec la dorsomorphine. Cependant les résultats obtenus par microinjection de l'ARNm de *Noggin* dans l'embryon complet suggèrent que chez l'amphioxus *Noggin* serait plutôt un antagoniste d'autres TGF-β (possiblement de Nodal)

Afin d'inhiber le signal BMP il est envisagé de surexprimer différentes constructions ou gènes agissant à différents niveaux de la voie de signalisation. Tout d'abord, il est possible de surexprimer *Chordin*, un antagoniste extracellulaire de la voie BMP. Il est également envisagé de surexprimer un dominant négatif du récepteur aux BMP Alk3/6 tronqué dans sa partie intracellulaire. L'inhibition de la signalisation intracellulaire est également possible au travers de la surexpression de deux formes de dominants négatifs de Smad1/5/8 : d'une part le Smad1/5/8 somitabun (l'orthologue de Smad5 somitabun (Hild et al., 1999)), une version mutée de Smad1/5/8 ne permettant pas la transduction du signal intracellulaire de BMP, soit une version de Smad1/5/8 tronqué d'une partie de son domaine MH2 (Christiaen et al. 2010). De manière plus indirecte, il est également possible de surexprimer le Smad inhibiteur (iSmad) Smad6/7. Toutefois, cet iSmad est commun aux voies de signalisation Activine/Nodal et BMP. L'interprétation des résultats obtenus ainsi que les possibilités d'étude du rôle de la voie Nodal en seront compliqués.

Inhibition de la voie de signalisation BMP dans des explants ectodermiques.

L'activation ectopique des voies de signalisation Activine/Nodal ou FGF dans des explants ectodermiques induit la formation de tissu neural. Cependant, seule une partie des explants est neuralisée. Ceci pouvant être du à l'inhibition de l'induction de tissu neural par la signalisation BMP dans une partie des explants, j'ai cherché à définir si le territoire neural induit par les voies Activine/Nodal ou FGF est plus étendue en absence de signal BMP. Malheureusement, l'addition de protéine Activine ou FGF1/2 au traitement dorsomorphe induit une altération du développement des explants. Dans ces conditions, rares sont les embryons exprimant *Neurogenin*, et ceci que ce soit suite à un co-traitement à la suite de l'explantation ou à un co-traitement au stade blastula poursuivi après l'explantation de l'ectoderme. De plus, chez les quelques embryons exprimant *Neurogenin*, l'expression reste localisée.

Il semble donc nécessaire de s'intéresser à d'autres moyens d'inhiber la voie de signalisation BMP dans les explants ectodermiques afin de définir si le signal BMP participe à la limitation de l'induction neurale. Les différents moyens cités dans le paragraphe précédent sont envisagés. Il n'en reste pas moins que ces moyens d'inhibition reposent sur la microinjection de constructions. Le nombre d'expériences réalisables est donc fortement limité.

Inhibition du signal FGF dans des embryons neuralisés par activation ectopique du signal Activine/Nodal

L'activation ectopique du signal Activin/Nodal induit une neuralisation de l'ensemble de l'ectoderme. L'inhibition du signal FGF dans ces embryons neuralisés induit la perte d'identité neurale de l'ectoderme antérieur au profit d'une identité épidermique. Dans cette expérience, le marqueur épidermique utilisé est *AP-2*. Comme on peut le voir chez les embryons contrôles, le marquage par hybridation *in situ* d'*AP-2* n'est pas de bonne qualité. Outre le fait qu'aucune amélioration de la qualité du marquage n'ai pue être obtenue, *AP-2* n'est pas un marqueur d'épiderme différencié. Pour cette raison, j'ai cloné le marqueur *K1* et l'ai utilisé pour l'ensemble des expériences ultérieures nécessitant l'utilisation d'un marqueur épidermique. Cependant, il semble nécessaire de confirmer avec *K1* le changement de devenir de l'ectoderme antérieur observé avec l'expression d'*AP-2* au cours de cette expérience.

Il est à noter qu'en deçà de la concentration utilisée dans les différentes expériences présentées (50ng/ml), la pénétrance du traitement diminue, entraînant une dorsalisation partielle de l'embryon. De la même manière, un traitement effectué après le stade de clivage présente une pénétrance plus faible. La dorsalisation complète de l'embryon et la neuralisation de l'ectoderme qui y est liée nécessite donc un traitement plus précoce et à une concentration bien plus élevée que ce qui avait précédemment été publié (Onai et al., 2010). Dans ces conditions, et puisque l'inhibition du signal FGF avant le stade blastula entraîne un retard de gastrulation, il est nécessaire de co-traiter les embryons au cours de la blastulation comme je l'ai fait, et de s'assurer d'une pénétrance suffisante du traitement Activine en analysant l'expression de différents marqueurs sur un grand nombre d'embryons. Il est également envisageable de traiter les embryons à l'Activine avant le stade blastula et d'ajouter l'inhibiteur du signal FGF uniquement à partir du stade blastula, ceci dans le but d'obtenir une pénétrance complète du phénotype.

Signalisation Activin/Nodal versus signalisation Nodal

Dans l'ensemble de mes travaux, j'ai considéré que le traitement à la protéine Activine induisait une activation ectopique de la signalisation Activine/Nodal, comme précédemment suggéré (Onai et al., 2010). L'ensemble de mes résultats suggèrent que cette voie de signalisation est impliquée au cours de l'induction neurale. De plus, *Activine* n'est pas exprimé au cours du développement précoce chez l'amphioxus contrairement à *Nodal* qui lui possède un patron d'expression consistant avec une activité d'induction du tissu neural. Bien qu'il soit possible que le traitement Activine induise également la signalisation Nodal, il semble nécessaire de chercher à étudier l'effet d'une surexpression de *Nodal* afin d'identifier si les phénotypes induits sont identiques à ceux induits par le traitement Activin. Ceci concerne la neuralisation de l'ectoderme des embryons entiers ou l'induction de tissu neural dans des explants.

Expériences d'explantation de tissu ectodermique, de lèvres blastoporales et de greffes

Une des limites de ce type d'expérience est le nombre faible d'explantations réalisables, en particulier celles des lèvres blastoporales. Si l'explantation d'une partie de l'ectoderme peut se faire par microdissection sans enlever le chorion, ceci n'est pas le cas pour l'excision des lèvres blastoporales ou du tissu ectodermique voués à être greffé. Cette difficulté expérimentale est la principale explication du nombre faible d'embryons présentés pour chacune des différentes expériences. A ceci s'ajoute une difficulté de visualisation des embryons au cours de l'hybridation *in situ*. En effet, outre leur petite taille, les explants sont monocouches les rendant quasi invisibles lors des différents bains de formamide. Il est donc malheureusement très difficile de conserver tous les embryons si difficilement obtenus. Il n'en reste pas moins qu'une des priorités sera de réitérer ces expériences afin d'obtenir un nombre suffisant d'embryons validant les observations obtenues jusqu'à maintenant.

Grefe de la lèvre blastoporale dorsale sur un embryon hôte

La lèvre blastoporale dorsale chez l'amphioxus a été proposée comme une structure possédant une fonction organisatrice comme chez les vertébrés (Tung et al., 1962a; Yu et al., 2007). Afin de confirmer cette hypothèse, j'ai greffé la lèvre blastoporale dorsale sur un embryon hôte au niveau de l'endomésoderme ventral dans l'archentéron en formation.

Dans l'article, je présente un embryon obtenu suite à ce type de greffe et possédant deux axes antérieurs chacun doté d'une notochorde et d'un tube neural. Ceci suggère que la lèvre blastoporale dorsale chez l'amphioxus possède comme chez les vertébrés une fonction organisatrice au cours de la formation des structures dorsales de l'embryon au cours de la gastrulation. Cependant, il n'est pas possible de définir si la formation du second tube neural et de la seconde notochorde est induite par la lèvre blastoporale greffée ou s'ils sont formés par les cellules du greffon. Afin de répondre à cette question, il est envisagé de suivre le devenir des cellules de la lèvre blastoporale suite à sa greffe sur un embryon hôte grâce à un marquage préalable de ces cellules.

Bien que l'embryon présenté soit le seul embryon obtenu possédant ce phénotype extrême avec deux axes clairement formés, il est envisagé de reproduire ce résultat. En effet, lors de la greffe, le

greffon est déposé dans l'archentéron, sa position n'est donc pas maîtrisée. Cependant, la répétition de ce type d'expérience laisse entrevoir la possibilité technique de greffer la lèvre blastoporale dorsale au plus près de la lèvre blastoporal ventrale. Ceci permettra aux signaux émanant du greffon d'atteindre l'ectoderme ventral, et non uniquement l'endomésendoderme.

Les embryons greffés ne possédant pas de second axe de développement apportent toutefois un certain nombre d'informations concernant le devenir du greffon. Grâce au marquage des cellules du greffon (par microinjection préalable de Texas Red dextran dans la cellule œuf non fécondée), il est possible de suivre le devenir des cellules le constituant. Suite à la greffe dans l'archentéron de l'embryon hôte, le greffon se développe dans le futur tube digestif en formation. En fonction des embryons, il est possible d'observer que son développement se fait soit uniquement dans la partie antérieure du tube digestif, soit le long du tube digestif en suivant l'élongation postérieure de l'embryon (Fig. 46K).

Dans les deux cas de figure, aucune expression de *Brachyury* n'est observée (Fig. 46F, G), suggérant que le greffon ne forme pas de notochorde que ce soit en se différenciant lui-même ou par induction dans les tissus environnants. *Hu/Elav* est exprimé de manière ectopique dans le tube digestif (Fig. 46H, I, J), suggérant que le greffon se différencie en tissu neural. *Netrin* est chez les embryons sauvages au stade pré-buccal un marqueur du tube neural et de la partie dorsale de la notochorde. Dans les embryons greffés, en absence d'expression de *Brachyury* dans le tube digestif, il est possible de considérer que l'expression de *Netrin* correspond uniquement à une expression neurale (Fig. 46C, D, E). Cette observation confirme la différenciation du greffon en tissu neural observée avec le marqueur *Hu/Elav*. De manière intéressante, aucun co-marquage Texas Red dextran et tubuline- α acétylée n'est identifié (Fig. 46K, L), suggérant que les cellules du greffons deviennent neurales mais ne se différencient pas en tissu neural capable de projeter des axones.

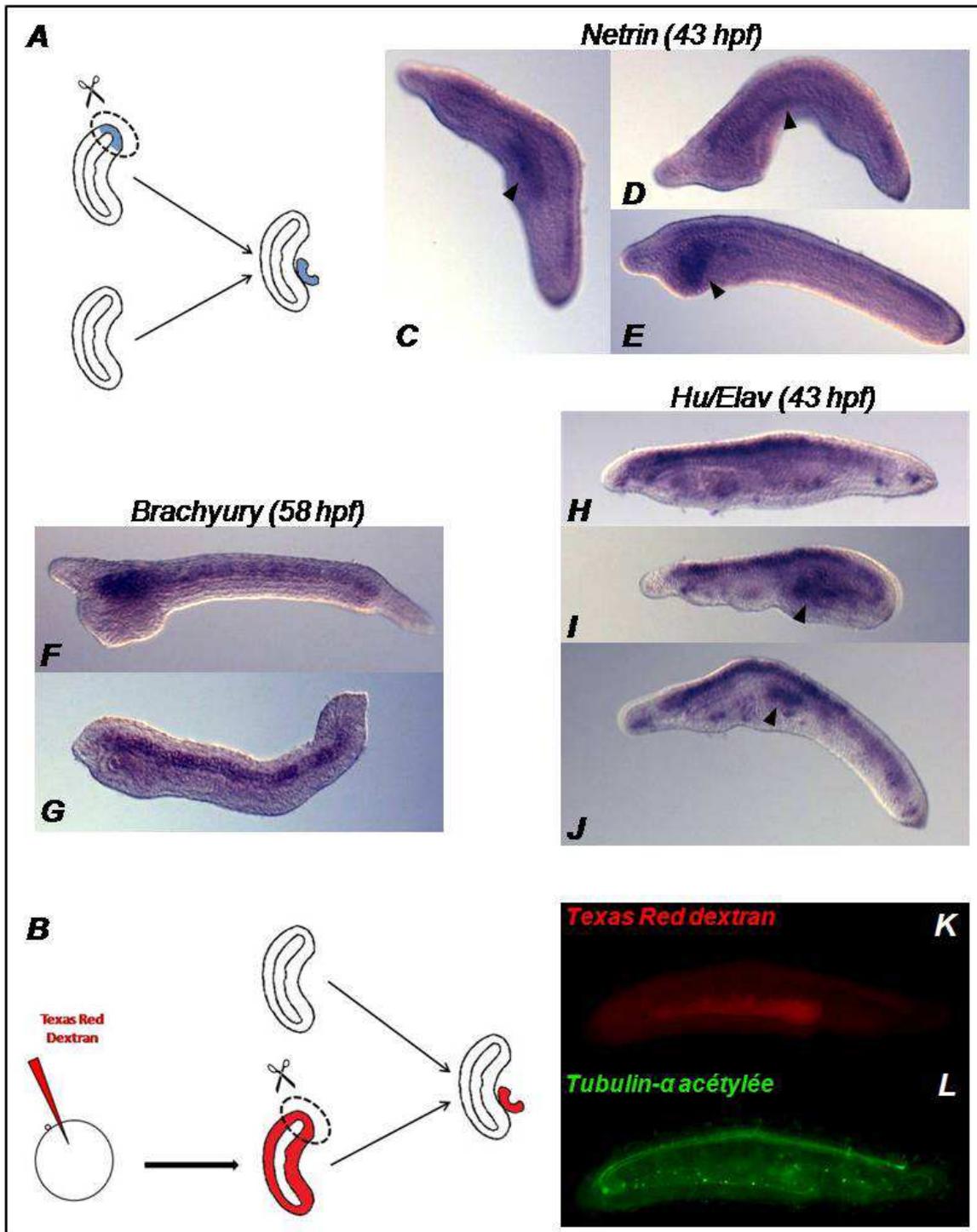


Figure 46 : Etude du devenir de la lèvre blastoporale dorsale suite à sa greffe dans l'embryon hôte.

Analyse par hybridation *in situ* et immunohistochimie de l'expression de différents gènes et d'une protéine dans la lèvre blastoporale greffée dans l'archentéron d'un embryon hôte. (A) : procédure expérimentale de la greffe. La zone grisée correspond à la lèvre blastoporale dorsale. (B) : procédure expérimentale de la greffe de la lèvre blastoporale dorsale d'un embryon préalablement microinjecté avec du Texas Red dextran. (C-E) : expression de *Netrin* dans trois embryons greffés. Les têtes de flèches indiquent l'expression ectopique de *Netrin*. (F-G) : expression de *Brachyury* dans deux embryons greffés. (H-J) : expression de *Hu/Elav* dans trois embryons greffés. Les têtes de flèches indiquent l'expression ectopique de *Hu/Elav*. (K-I) : localisation des cellules de la lèvre blastoporales greffée (K) et marquage de la tubulin- α acétylée (L) dans un embryon fixé à 43 hpf. Tous les embryons sont orientés la partie antérieure vers la gauche, à l'exception de l'embryon en (K-I) orienté vers la droite.

V - DONNEES ADDITIONNELLES SUR L'INDUCTION NEURALE CHEZ L'AMPHIOXUS

V.1 - ASPECT TEMPOREL DE L'INDUCTION NEURALE CHEZ L'AMPHIOXUS

L'analyse temporelle de l'expression de marqueurs neuraux et épidermiques ainsi que des expériences de gain et de perte de fonction de différentes voies de signalisation pouvant être impliquées permet d'estimer le stade d'initiation de l'induction neurale et de la différenciation de l'ectoderme en épiderme. Cependant, bien que la différenciation de l'ectoderme corresponde à un choix binaire entre un destin neural et épidermique, il est envisageable que ces deux phénomènes ne soient pas concomitants. Il est donc nécessaire de les considérer de manière indépendante.

Comme nous l'avons vu, *SoxB1a* est un marqueur pan-ectodermique et non uniquement neural. Son expression ne peut donc pas être informative. Parmi les différents marqueurs neuraux exprimés précocement, il est possible d'analyser l'expression de *Neurogenin*. L'étude de son expression avait montré que *Neurogenin* est exprimé à partir du stade gastrula dans l'ectoderme dorsale. Cependant, j'ai identifié au cours de mes travaux une expression plus précoce. En effet, *Neurogenin* est exprimé dès le stade gastrula précoce dans la partie antérieure de l'ectoderme neural présomptif. Ceci suggère que l'initiation de l'induction neurale a lieu plus précocement au cours de la gastrulation. Cette observation est consistante avec l'expression de *Zic* dans l'ectoderme dorsal dès le stade gastrula précoce (Gostling et Shimeld, 2003). En effet, *Zic1* et *Zic3*, les orthologues du gène *Zic* chez les vertébrés, sont des gènes participant précocement à l'acquisition du destin neural (Marchal et al., 2009). Si l'on considère que l'inhibition du signal BMP est nécessaire au cours de l'induction neurale chez l'amphioxus, l'expression de *Chordin* dans l'ectoderme dorsal au stade gastrula précoce appuie cette observation.

Au cours de ses expériences, Tung et son équipe ont mis en évidence que suite à l'explantation de la lèvre blastoporale dorsale au stade gastrula précoce, l'embryon excisé se développe normalement. Si l'on accepte que la lèvre blastoporale dorsale chez l'amphioxus possède une fonction organisatrice des structures dorsales au cours de la gastrulation, et plus particulièrement d'induction du tissu neural, cette observation suggère que les signaux nécessaires à l'induction neurale ont déjà été reçus par l'ectoderme neural présomptif à ce stade de développement. Dans ces conditions, l'induction neurale aurait donc lieu avant le stade gastrula précoce. Cette observation est consistante avec l'expression d'un certain nombre de gènes dans l'ectoderme dorsal à ce stade du développement et impliqués chez les vertébrés au cours de l'induction neurale. Toutefois, il est également envisageable que lors de l'ablation de la lèvre blastoporale dorsale, une partie du tissu organisateur n'est pas été excisé et soit suffisante pour supporter les fonctions de l'organisateur complet.

Afin de définir si l'induction neurale est effective au stade gastrula précoce, j'ai cherché à identifier à partir de ce stade l'effet sur la mise en place du tissu neural d'un gain de fonction de la voie de signalisation BMP et l'effet d'une perte de fonction de la voie de signalisation Activine/Nodal.

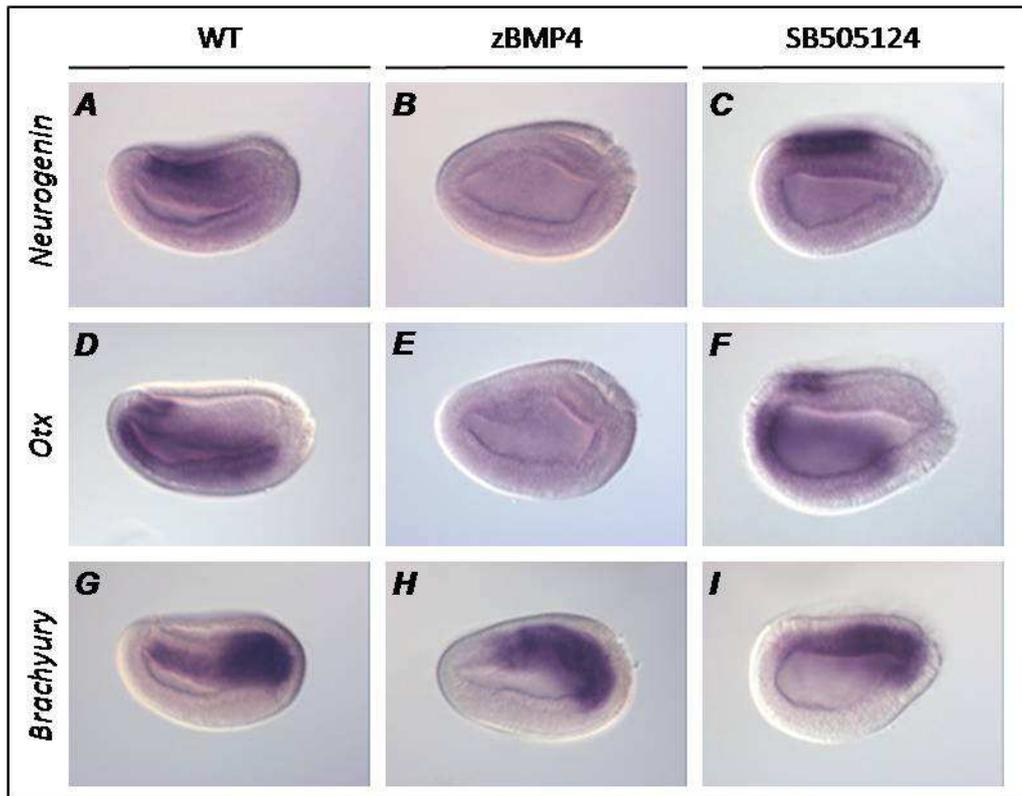


Figure 47 : Etude de la mise en place de la plaque neurale suite à l'activation ectopique de la signalisation BMP ou à l'inhibition de la signalisation Activine/Nodal.

Analyse par hybridation *in situ* de l'expression du marqueur de la plaque neurale *Neurogenin* (A-C), du marqueur de la plaque neurale antérieure *Otx* (D-F) et du marqueur de la notochorde *Brachyury* (G-I) chez des embryons contrôles (A, D et G) et des embryons traités au stade gastrula précoce au zBMP4 (250ng/ml) (B, E et H) ou au SB505124 (50 μ M) (C, F et I). Tous les embryons sont au stade neurula.

Lorsque le signal BMP est augmenté, il n'y a pas d'expression de *Neurogenin* ou d'*Otx* (Fig. 47B, E). Cette observation suggère que les embryons ne possèdent pas de tissu neural. Afin de vérifier si cette perte de tissu neural est due à une ventralisation de l'embryon, j'ai cherché à identifier la présence de structures dorsales. L'expression du marqueur de la notochorde *Brachyury* chez ces embryons montre qu'il y a mise en place de structures dorsales (Fig. 47H), confirmant que le traitement au zBMP4 à ce stade n'induit pas de ventralisation comme c'est le cas au stade blastula. La perte de tissu neural suite à l'activation ectopique de la voie BMP suggère que son inhibition est nécessaire au maintien du tissu neural.

Puisque l'ensemble des expériences portant sur l'activation ectopique de la voie de signalisation Activine/Nodal supportent l'hypothèse que Nodal est l'acteur pro-neural principal au cours de l'induction neurale, j'ai cherché à identifier si l'induction neurale est effective au stade gastrula précoce en inhibant cette voie de signalisation. De manière intéressante, les marqueurs neuraux *Otx* et *Neurogenin* sont tous deux exprimés au stade neurula dans les embryons traités au SB505124 (Fig. 47C, F). Cette observation semble confirmer que l'induction neurale est effective au stade gastrula précoce, et que le signal Activin/Nodal n'est pas nécessaire au maintien du tissu neural induit.

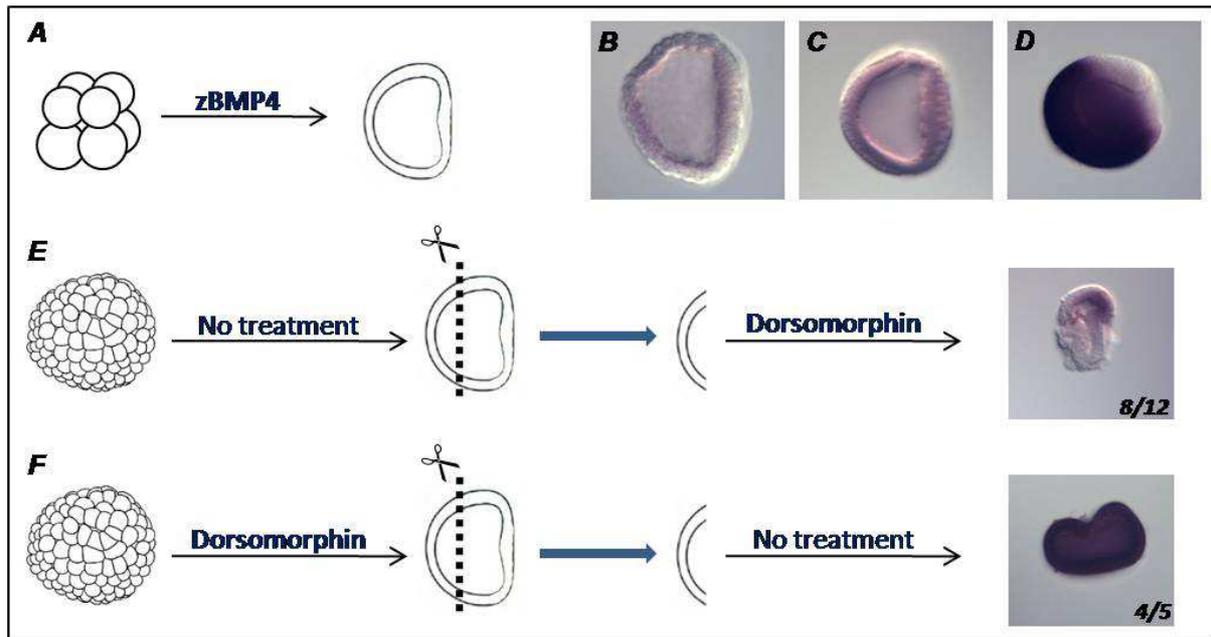


Figure 48 : Voie de signalisation BMP et induction de l'épiderme.

Analyse par hybridation *in situ* de l'expression du marqueur épidermique *K1* suite à une activation ectopique de la voie de signalisation BMP au stade 8 cellules par traitement au zBMP4 (250ng/ml) (A) dans des embryons fixés au stade gastrula précoce (B). (C-D) : expression de *K1* dans des embryons non traités, fixés au stade gastrula précoce (C) et gastrula tardive (D). (E-F) : Analyse de l'expression de *K1* dans des explants ectodermiques suite à une inhibition du signal BMP par traitement dorsomorphine (10 μ M) après l'explantation (E) ou avant l'explantation (F).

V.2 - ASPECT TEMPOREL DE L'INDUCTION DE L'ÉPIDERME CHEZ L'AMPHIOXUS

Afin de définir le moment de la différenciation de l'ectoderme en épiderme au cours du développement de l'amphioxus, il est possible d'analyser l'expression des marqueurs *AP-2*, *Dral* ou *Dlx* qui sont des gènes pro-épidermiques chez les vertébrés. En ce qui concerne *AP-2* et *Dral*, aucune expression n'est identifiable avant le stade gastrula. Cependant, *Dlx* est exprimé à partir du stade gastrula précoce dans l'ensemble de l'ectoderme, puis son expression est perdue dans la partie dorsale de l'ectoderme à devenir neural confirmant son implication dans la mise en place de l'ectoderme à devenir épidermique. J'ai également cherché à identifier un marqueur de tissu épidermique différencié. Le marqueur *K1* (*Keratin1*) s'est révélé être un bon candidat. Comme pour *AP-2* et *Dral*, *K1* n'est exprimé qu'à partir du stade gastrula. Son expression est restreinte à l'ectoderme et est complémentaire à celle des marqueurs neuraux.

Ces observations indiquent que si l'ectoderme est engagé vers la voie épidermique au stade gastrula précoce, la mise en place d'un tissu épidermique différencié n'a pas lieu avant le stade gastrula. Le signal BMP est considéré comme le signal inducteur de la différenciation de l'ectoderme en épiderme. Un traitement au zBMP4 des embryons au stade 8 cellules n'induit pas d'expression de *K1*

dans l'ectoderme au stade gastrula précoce (Fig. 48B). Si le signal BMP est chez l'amphioxus le signal inducteur d'épiderme, cette observation indique que l'ectoderme ne peut s'engager vers un destin épidermique avant le stade gastrula précoce.

La perte de fonction du signal BMP dans des explants ectodermiques permet également de déterminer le moment du développement à partir duquel l'ectoderme s'engage vers un destin épidermique. En effet, l'analyse de l'expression de *K1* permet d'observer que les explants ectodermiques se différencient en épiderme. Lorsque le signal BMP est bloqué par un traitement à la dorsomorphine suite à l'explantation au stade gastrula précoce, *K1* est exprimé uniquement dans une région restreinte (Fig. 48E), suggérant que le destin épidermique par défaut est presque totalement perdu par les explants. Cependant, lorsque le signal BMP est inhibé uniquement avant l'explantation, les explants se différencient en épiderme (Fig. 48F). Ceci suggère que la voie de signalisation BMP est la voie inductrice de différenciation en tissu épidermique. Puisque *K1* ne s'exprime pas avant le stade gastrula *in vivo*, ceci supporte que l'initiation de la différenciation en épiderme n'a pas lieu avant le stade gastrula précoce, ou que le signal BMP est nécessaire au maintien de l'identité épidermique.

L'ensemble de ces résultats indiquent que l'induction neurale a lieu au cours de la gastrulation, la mise en place de tissu neural étant identifiable dès le stade gastrula précoce. Cependant, il semble que l'inhibition du signal BMP soit nécessaire jusqu'au stade gastrula, stade auquel une activation ectopique du signal BMP n'induit plus d'absence de formation de la plaque neurale (Lu et al., 2012). L'induction de la formation de l'épiderme semble également avoir lieu au cours de la gastrulation. L'ensemble des observations suggère que la différenciation en épiderme n'a pas lieu avant le stade gastrula. Toutefois, que ce soit pour l'induction neurale ou épidermique, l'ensemble des données en notre possession ne permet pas de définir plus exactement à quel moment sont initiés ces deux mécanismes.

V.3 - ETUDE DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES A DEVENIR ECTODERMIQUES AU STADE HUIT CELLULES

Au cours de la dernière saison de ponte effectuée pendant ma thèse (saison 2013), j'ai mis au point une technique permettant de déchorionner un nombre important d'embryons. La possibilité d'exciser certaines cellules de l'embryon au cours des premiers stades de développement m'a permis d'envisager une approche différente afin d'étudier les voies de signalisation pouvant être impliquées dans le choix du devenir de l'ectoderme. En effet, il fut montré que les quatre cellules animales au stade huit cellules participent uniquement à la formation de structures issues du feuillet ectodermique, suggérant qu'elles possèdent un devenir ectodermique (Fig. 49A) (Tung et al., 1962b). De plus, il fut décrit que l'embryon issu du développement de ces cellules lorsqu'elles sont explantées au stade huit cellules correspond à une balle de cellules ectodermiques, quelques cellules invaginés ayant des caractéristiques de cellules mésodermiques non différenciées (Tung et al., 1958). En m'appuyant sur ces observations, j'ai pu identifier que les cellules de l'embryon se développant à partir des quatre cellules animales excisées au stade huit cellules expriment *K1* tandis que *Neurogenin* n'est pas exprimé (Fig. 49B) (le faible marquage observé semblant être du bruit de fond). Ceci montre que le tissu est entièrement différencié en épiderme. Lorsque les quatre cellules animales sont traitées à l'Activine, *Neurogenin* est exprimé dans la quasi-totalité des cellules des embryons formés (Fig. 49C), suggérant que l'activation ectopique de la voie de signalisation Activine/Nodal neuralise la majeure partie de l'embryon issue de cette explantation.

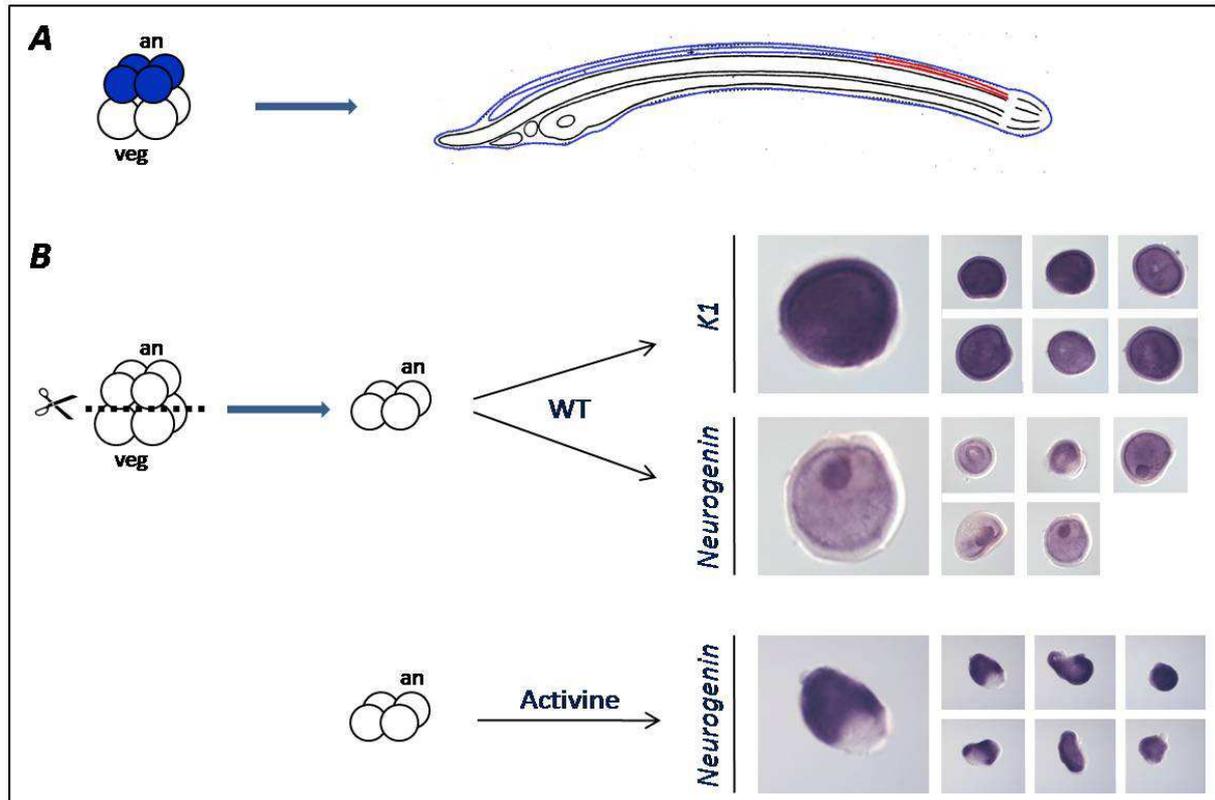


Figure 49 : Etude du devenir des cellules animales au stade 8 cellules.

(A) : suivie du devenir au stade larvaire des cellules animales au stade 8 cellules par marquage au bleu de nil. Les tissus en bleu au stade larvaire correspondent aux tissus descendant des 4 cellules animales au stade 8 cellules. Les tissus en rouge au stade larvaire correspondent aux tissus issus de l'ectoderme mais ne descendant pas des 4 cellules animales. D'après (Tung et al., 1962b). (B) : Analyse de l'expression par hybridation *in situ* de *K1* et *Neurogenin* chez les embryons formés à partir des 4 cellules animales excisées au stade 8 cellules, et de *Neurogenin* chez les embryons formés à partir des 4 cellules animales excisées au stade 8 cellules et traitées à l'Activine (50ng/ml). Les embryons ont été fixés à 19 hpf.

A travers ce type d'expérience, il sera dans un premier temps possible de chercher à confirmer les résultats que j'ai obtenu sur des explants ectodermiques excisés au stade gastrula précoce. Sous couvert de la confirmation par lignage du devenir uniquement ectodermiques de ces cellules animales au cours du développement embryonnaire, ce type de manipulation pourrait s'avérer un outil intéressant pour étudier les voies de signalisation pouvant être impliquées au cours du choix du devenir des cellules ectodermiques.

V.4 - DISCUSSION DES DONNEES ADDITIONNELLES

Les différentes observations portant sur la formation du tissu neural chez l'amphioxus suggéraient que l'ectoderme dorsal recevait les signaux nécessaires à sa différenciation à partir du stade gastrula précoce. Cependant, nos résultats montrent que du tissu neural est déjà mis en place au stade gastrula précoce, suggérant une initiation de l'induction neurale plus précoce. De plus, si les

marqueurs épidermiques ne sont pas exprimés avant le stade gastrula, l'étude de l'activité de la voie de signalisation BMP suggère que l'engagement vers un destin épidermique a lieu avant ce stade. Cependant, s'il est possible de définir le stade de développement embryonnaire à partir duquel l'ectoderme est différencié en épiderme ou en tissu neural, il n'est pas possible de définir exactement le moment auquel cet ectoderme s'engage vers un destin particulier. De plus, si la technique d'explantation telle que je l'ai mise au point permet d'étudier le comportement de l'ectoderme en absence de signaux du mésendoderme ou de l'organisateur, il apparaît qu'elle est effectuée à un stade auquel il n'est pas possible de définir si l'ectoderme est déjà engagé vers un destin neural ou épidermique. Si ceci est le cas, il est possible de considérer que l'interprétation des résultats obtenus à partir de la technique d'explantation au stade gastrula précoce présente des biais.

Dans ces conditions, l'étude des cellules à devenir ectodermique explantées précocement au cours du développement embryonnaire pourrait se révéler être un outil de choix afin d'étudier l'implication de différentes voies de signalisation au cours de la définition de leur identité. En effet, l'accès aux cellules ectodermiques dès les premiers stades du développement permet d'envisager l'étude plus précise de l'aspect temporel de sa différenciation. Ainsi, il apparaît techniquement possible de déterminer précisément le moment auquel les cellules ectodermiques possèdent la capacité de répondre à différents signaux pouvant influencer sur l'acquisition de leur destin, que ce soit des signaux provenant de greffons ou suite à la modulation des voies de signalisation par traitement à différents intervalles de temps.

MODELE DE L'INDUCTION NEURALE CHEZ L'AMPHIOXUS

L'ensemble des données expérimentales obtenues au cours de mes travaux de thèse et mis en regard des données existantes sur l'induction neurales chez l'amphioxus permet d'établir un modèle de ce mécanisme pour la ligné des céphalochordés. Ce modèle propose qu'au cours de la gastrulation, une activité faible de la voie de signalisation BMP dans l'ectoderme le rend compétent à un devenir épidermique. Cependant, cette différenciation des cellules de l'ectoderme en épiderme semble être soumise à une activité seuil de la voie de signalisation BMP, une forte activité de la voie étant permise par une signalisation verticale du mésendoderme vers l'ectoderme au travers des ligands BMP (probablement de BMP2/4) au moment du contact entre les deux feuilletts au cours de la gastrulation.

Le signal BMP étant un inhibiteur de la différenciation de l'ectoderme en tissu neural, un inhibiteur du signal BMP, à savoir *Chordin*, est exprimé dans la partie dorsale de l'embryon au niveau de la lèvre blastoporale dorsale (i.e. l'organisateur) et bloque la différenciation de l'ectoderme en tissu épidermique. Cependant, l'acquisition d'une identité neurale par l'ectoderme est soumise à une

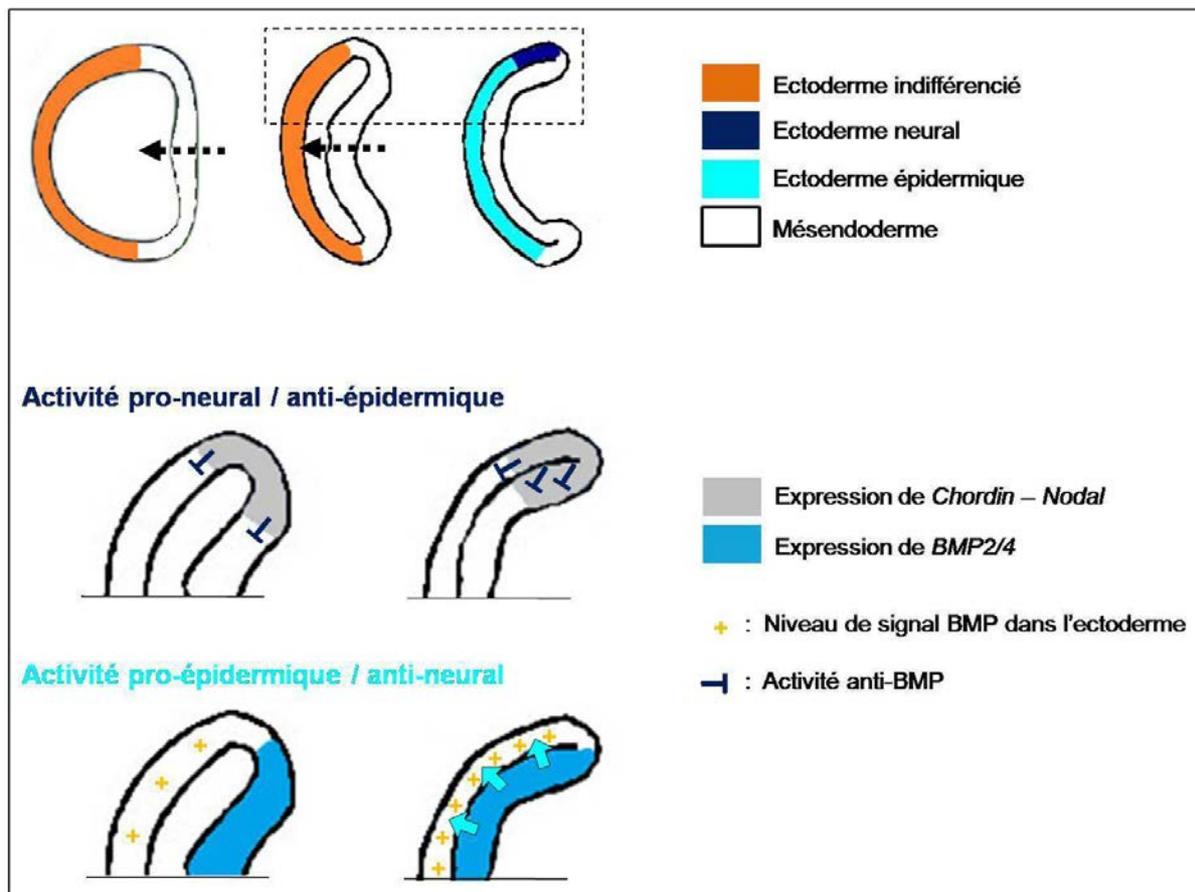


Figure 50 : Modèle du mécanisme d'induction neurale chez l'amphioxus.

Ce modèle schématise les activités pro-neural et pro-épidermique dans l'ectoderme au cours de la gastrulation ainsi que l'opposition de ces activités au niveau de l'ectoderme dorsal.

induction. Au vue de son patron d'expression et des données expérimentales portant sur la voie de signalisation Activine/Nodal, il semble que Nodal soit le signal inducteur de la différenciation de l'ectoderme en tissu neural.

Finalement, le signal FGF, présent au niveau du mésendoderme dorsal (FGF8/17/18) ainsi que de l'ectoderme dorsal (FGF9/16/20) serait implique dans le maintien du devenir neural de la partie antérieure du tissu neural induit lors de l'élongation de l'embryon.

PERSPECTIVES

Ce travail de thèse nous a permis de définir les grandes lignes du mécanisme de l'induction neurale chez l'amphioxus. Cependant, si les résultats obtenus permettent de poser les fondations de la compréhension de ce mécanisme chez l'amphioxus et *a fortiori* de son évolution chez les chordés, ils ne représentent qu'un travail préliminaire qui mérite d'être approfondi.

Un des enjeux des recherches à venir sera de clairement définir les acteurs des différentes voies de signalisation participant à l'induction neurale et le rôle de chacun de ces acteurs. Les voies BMP et FGF sont les principales voies de signalisation impliquées dans l'induction neurale chez les vertébrés. Toutefois, d'autres voies de signalisation participent à ce processus de mise en place du tissu neural, que ce soit au travers du contrôle du patterning de l'embryon, ou comme acteur de la différenciation des cellules de l'ectoderme. Il sera donc également important de définir le rôle de ces voies de signalisation au cours de l'induction neurale chez l'amphioxus, afin de pouvoir retracer l'histoire évolutive de ce mécanisme chez les chordés.

A ce jour, une des lignes directrices des recherches portant sur l'induction neurale est la recherche d'un modèle commun à tous les vertébrés. Cependant, il n'est pas défini à ce jour si les différences observées chez les différents modèles utilisés sont la conséquence des limites techniques de chacun ou si ce sont des différences réelles de processus biologiques.

Il est envisageable de considérer que certains aspects de ce mécanisme aient pu évoluer de manière indépendante dans différentes lignées de vertébrés. Dans ce contexte, la compréhension du mécanisme de l'induction neurale chez l'amphioxus sera nécessaire afin de proposer une histoire évolutive plus précise de ce processus développemental chez les vertébrés, en posant les fondements du probable mécanisme de l'induction neurale chez l'ancêtre des chordés.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse portant sur l'étude fonctionnelle du mécanisme de l'induction neurale chez l'amphioxus nous a conduits à suivre à la fois une approche d'embryologie classique et une approche fonctionnelle afin d'étudier le rôle de différentes voies de signalisation, et plus particulièrement des voies BMP, FGF et Activine/Nodal.

Au cours de cette étude, nous avons confirmé fonctionnellement que l'amphioxus possède comme les vertébrés une structure organisatrice (i.e. un organisateur) impliquée dans la formation des structures dorsales de l'embryon. La position de la lignée des céphalochordés au sein du groupe des chordés suggère que l'organisateur est un caractère ancestral, caractère qui aurait été perdu par le groupe des tuniciers. Cette observation permet donc de fortement appuyer l'hypothèse de l'existence d'un organisateur chez l'ancêtre commun des chordés. De plus, puisque aucune structure organisatrice homologue n'a été identifiée chez des animaux non chordés, il apparaît que l'organisateur est une caractéristique spécifique du groupe des chordés.

L'étude du rôle de la voie de signalisation BMP au cours du développement précoce chez l'amphioxus a permis de confirmer d'une part son implication dans le patterning dorsoventral, et d'autre part d'identifier son implication au cours de la différenciation de l'ectoderme en tissu épidermique. De plus, nous avons montré la nécessité de son inhibition au cours de l'induction neurale. Toutefois, et contrairement à l'hypothèse émise par le modèle per défaut, l'inhibition du signal BMP n'est pas suffisante pour induire la formation de tissu neural. L'ensemble de ces observations appuie une conservation de ces différentes fonctions de la voie de signalisation BMP chez les chordés, à l'exception des tuniciers chez qui les mécanismes de patterning dorsoventral ou de mise en place du tissu neural ont divergé.

La recherche des voies de signalisation impliquées dans l'induction neurale chez l'amphioxus nous a permis d'identifier deux fonctions différentes de la voie de signalisation FGF au cours de la neurogenèse, à savoir une fonction de maintien et une fonction de régionalisation de l'identité neural induite. Il n'est cependant pas possible d'exclure que le signal FGF participe également à l'induction neurale à proprement parlé. Nous avons également montré que la voie de signalisation Activine/Nodal participe à l'induction neurale. Cependant, en absence de données suffisantes chez les vertébrés, il n'est pas possible de définir si la fonction de la voie Activine/Nodal au cours de l'induction neurale est partagée avec d'autres vertébrés. L'identification de l'implication de cette voie au cours de l'induction neurale chez l'amphioxus appuie donc la nécessité de mieux définir chez les vertébrés son rôle au cours des premières étapes de la formation du système nerveux.

Prises dans leur ensemble, ces données observées au cours du développement embryonnaire de l'amphioxus nous ont également permis de définir plus précisément les stades auxquels ont lieu

d'une part l'induction neurale, et d'autre part l'engagement de l'ectoderme vers un destin épidermique. Ainsi, l'induction neurale est initiée très précocement au cours de la gastrulation. Le devenir épidermique semble également être initié au cours de la gastrulation, la différenciation définitive des cellules de l'ectoderme en épiderme ayant lieu au stade gastrula.

Pour conclure, bien que ce travail de thèse participe à une meilleure compréhension de l'évolution du mécanisme de l'induction neurale chez les chordés, il ne représente que l'ébauche du travail bien plus conséquent que nécessite la compréhension d'un mécanisme développemental aussi complexe.

ANNEXES

Annexe n°1 :

Identification and expression analysis of BMP signaling inhibitors genes of the DAN family in amphioxus

Le Petillon, Y., Oulion, S., Escande, M. L., Escriva, H. and Bertrand, S. (2013). *Gene Expr Patterns*.

Annexes n°2 :

Sequencing and Analysis of the Mediterranean Amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) Transcriptome

Oulion, S., Bertrand, S., Belgacem, M. R., **Le Petillon, Y.** and Escriva, H. (2012). *PLoS One*.



Contents lists available at ScienceDirect

Gene Expression Patterns

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gep

Identification and expression analysis of BMP signaling inhibitors genes of the DAN family in amphioxus



Yann Le Petillon^{a,b}, Silvan Oulion^{a,b,1}, Marie-Line Escande^{a,b}, Hector Escriva^{a,b}, Stephanie Bertrand^{a,b,*}

^aUPMC Univ Paris 06, UMR 7232, BIOM, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/Mer, France

^bCNRS, UMR 7232, BIOM, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/Mer, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 June 2013

Received in revised form 1 July 2013

Accepted 10 July 2013

Available online 17 July 2013

Keywords:

DAN family

BMP

Cerberus

Amphioxus

Evo-devo

ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are members of the Transforming Growth Factor- β (TGF- β) family implicated in many developmental processes in metazoans such as embryo axes specification. Their wide variety of actions is in part controlled by inhibitors that impede the interaction of BMPs with their specific receptors. Here, we focused our attention on the Differential screening-selected gene Aberrative in Neuroblastoma (DAN) family of inhibitors. Although they are well-characterized in vertebrates, few data are available for this family in other metazoan species. In order to understand the evolution of potential developmental roles of these inhibitors in chordates, we identified the members of this family in the cephalochordate amphioxus, and characterized their expression patterns during embryonic development. Our data suggest that the function of Cerberus/Dand5 subfamily genes is conserved among chordates, whereas Gremlin1/2 and NBL1 subfamily genes seem to have acquired divergent expression patterns in each chordate lineage. On the other hand, the expression of *Gremlin* in the amphioxus neural plate border during early neurulation strengthens the hypothesis of a conserved neural plate border gene network in chordates.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

BMPs are secreted proteins belonging to the TGF- β superfamily. These molecules were first identified for their ability to induce bone differentiation (Urist, 1965). Nevertheless, many studies have also shown that the BMP signaling pathway has a huge range of non osteogenic functions during embryonic development as well as in the control of adult physiology (reviewed in (Wu and Hill, 2009)).

Indeed, during vertebrate embryogenesis, BMPs play a major role in patterning the dorso-ventral and left/right axes as well as in organogenesis through the control of many cellular processes (reviewed in (Wu and Hill, 2009)).

Abbreviations: BMP, bone morphogenetic protein; CTGF, connective tissue growth factor; DAN, differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma; NBL1, neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1; TGF- β , transforming growth factor- β .

* Corresponding author. Address: Observatoire Océanologique, Avenue du Fontaulé, 66650 Banyuls/Mer, France. Tel.: +33 (4) 68887390; fax: +33 (4) 68887395.

E-mail addresses: lepetillon@obs-banyuls.fr (Y. Le Petillon), silvan.oulion@univ-montp2.fr (S. Oulion), escande@obs-banyuls.fr (M.-L. Escande), hescriva@obs-banyuls.fr (H. Escriva), bertrand@obs-banyuls.fr (S. Bertrand).

¹ Present address: Département Forme, Institut des Sciences de l'Évolution, UMR 5554, CNRS/Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France.

1567-133X/\$ - see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ggp.2013.07.005>

This range of functions implies fine spatiotemporal regulations of the action of BMPs that is partly achieved by a battery of extracellular inhibitors that might bind to BMPs and prevent their interaction with their specific receptors. Studies in vertebrates have led to the characterization of an important number of such inhibitors like Noggin, Chordin, Follistatin, Connective Tissue Growth Factor (CTGF) and proteins of the DAN family (reviewed in (Yanagita, 2005)).

Here, we have focused our attention on the DAN gene family which includes three groups of proteins belonging to the cystine knot superfamily: Cerberus, Gremlin and NBL1. These proteins can be distinguishable from other cystine knot proteins by the sharing of seven conserved residues in their cysteine rich domain (Pearce et al., 1999). Recent whole genome sequencing of many species, including animals and closely related organisms, allowed tracing back the emergence of the TGF- β pathway, including the DAN family proteins, to the origin of metazoans (Huminiecki et al., 2009). Despite the identification of DAN family members in non-vertebrate species belonging to different metazoan phyla such as placozoans, cnidarians, arthropods, annelids or mollusks, few data on the function of these proteins are available outside vertebrates.

In order to better understand the evolution of the functions of this gene family in the chordate phylum, we have identified the

amphioxus DAN family members and characterized their expression pattern during embryonic development. The amphioxus belongs to the sub-phylum Cephalochordata, which with urochordates and vertebrates forms the chordate phylum. The genomic, morphological and developmental characteristics of amphioxus are proposed to have diverged only slightly from those of the chordate ancestor (Bertrand and Escriva, 2011), making this animal an amenable model to investigate the evolution of developmental mechanisms in the chordate lineage.

Our study shows that amphioxus has three members of the DAN family: *Cerberus*, *Gremlin* and *NBL1*, and that they share a conserved expression pattern with their vertebrate orthologues, suggesting that some of their functions during embryonic development might be ancestral in the chordate phylum. However, vertebrates' DAN family members also show expression in some specific territories not shared with amphioxus, suggesting that new functions were acquired during vertebrate evolution.

1. Results and discussion

1.1. Amphioxus has three members of the DAN family

Using BLAST approach, we identified three members of the DAN family in the genome of the amphioxus *Branchiostoma floridae*. We used phylogenetic tree reconstruction to assess the evolutionary relationships between these genes and the DAN family members of other deuterostomes. Because of the weak conservation of their sequences outside the cystine knot region, we only used this domain for the phylogenetic analysis.

The tree constructed using Bayesian inference (Fig. 1) shows that *Cerberus* and *NBL1* are orthologues of the deuterostome *Cerberus/Dand5*, and *NBL1* subfamilies, respectively. The analysis further indicates that amphioxus *Gremlin* groups with the deuterostome *Gremlin1/2* subfamily. However, the position of the amphioxus *Gremlin* within this group remains unclear probably because of a low phylogenetic signal due to the short size of the sequences used. Analysis of neighboring genes in amphioxus shows that *Gremlin* is placed next to a gene that is pro-orthologous to both *Formin1* and *Formin2* from vertebrates (Fig. S1). In human, *Formin1* and *Formin2* are both next to *Gremlin1* and *Gremlin2*, respectively, suggesting that the proto *Gremlin-Formin* locus is the pro-orthologue of vertebrates *Formin1-Gremlin1* and *Formin2-Gremlin2* loci, and that therefore the amphioxus *Gremlin* is orthologous to both *Gremlin1* and *Gremlin2* from vertebrates.

1.2. *Cerberus* expression pattern

Cerberus expression in amphioxus is first detected at the gastrula stage in the anterior/dorsal mesendoderm in a restricted region corresponding to the future notochord and somites, as previously described (Fig. 2A, B) (Onai et al., 2010). At the late gastrula stage, it is expressed in the anterior dorsal paraxial mesendoderm (Fig. 2C, D). This expression decreases on the left side of the embryo and becomes asymmetric at the early neurula stage, paralleling the asymmetry of Nodal, Pitx and Lefty expression (Fig. 2E, F) (Boorman and Shimeld, 2002; Somorjai et al., 2008; Yu et al., 2007). At the mid-late neurula stage, *Cerberus* is no longer expressed in the mesoderm and its expression is restricted to the ventral part of the closing neural plate (Fig. 2G–I). In later stage embryos, we were not able to detect any expression of *Cerberus* by *in situ* hybridization.

In vertebrates, there are two paralogous genes of the *Cerberus* group named *Cerberus* and *Dand5*, although many synonymous names are also used (see Table S1). However, teleosts only have a *Dand5* gene whereas the chick genome contains a single *Cerberus*

gene named *Caronte*. *Cerberus*, the head inducing factor, was discovered in a search of highly expressed genes in the Spemann's organizer of *Xenopus*, and during amphibian gastrulation it is expressed in the anterior endomesoderm (Bouwmeester et al., 1996). In mouse, *Cerberus* is expressed in the anterior visceral endoderm and in the anterior definitive endoderm in a domain that underlies the future fore-, mid-, and hindbrain (Belo et al., 1997) whereas in chick its expression is detected in the hypoblast and the anterior endoderm at the gastrula stage (Rodríguez Esteban et al., 1999). Hence, *Cerberus* expression in the anterior mesendoderm of the gastrulating embryo seems to be a conserved feature in chordates and is probably associated to the role of *Cerberus* as an inhibitor of the Nodal/Activin signalling pathway that participates in antero-posterior and dorso-ventral specification of the embryo (Onai et al., 2010).

Interestingly, no *Dand5* expression is observed in early vertebrate embryos, except in *Xenopus* where it is detected in the animal pole (Bell et al., 2003). Moreover, in zebrafish, no expression of the *Cerberus* subfamily is detected during gastrulation (Hashimoto et al., 2004), suggesting a diversification of the early function of these genes in the different vertebrate lineages.

At later stages, *Cerberus* and *Dand5* have distinct expression patterns in vertebrates. In mouse, *Cerberus* is expressed after gastrulation in the two posterior forming somites and in the most rostral part of the presomitic mesoderm whereas *Dand5* is expressed asymmetrically in the node, with a higher level on the right side (Belo et al., 1997). In *Xenopus*, *Cerberus* expression is no longer observed after gastrulation whereas its paralogue *Dand5* shows a dynamic asymmetric expression in the posterior paraxial mesoderm (Bell et al., 2003). In chick, *Cerberus* is expressed in a restricted region of the left paraxial mesoderm near the Hensen's node (Yokouchi et al., 1999). In zebrafish, the unique *Dand5* gene is expressed around the Kupffer's vesicle, the organ controlling left-right axis determination (Hashimoto et al., 2004). Altogether, these expression patterns and the associated functional data, suggest that *Dand5* (in the case of mouse, *Xenopus* and zebrafish), or *Cerberus* (in chick) are implicated in the control of left-right asymmetry through inhibition on one side of the embryo of the Nodal/Activin pathway (Belo et al., 2009). The expression we observe in amphioxus is also consistent with such a role.

1.3. *Gremlin* expression pattern

In amphioxus, *Gremlin* is first expressed at the gastrula stage at a low level in a small restricted region of the ventral mesendoderm (Fig. 3A). In early neurula, *Gremlin* remains expressed in the ventral endoderm and is also expressed dorsally in some cells at the border of the neural plate (Fig. 3B–D). This expression is still observed at later neurula stages in the border of the closing neural tube (Fig. 3E, F). In mid-late neurula stage embryos, *Gremlin* is expressed in the endoderm at the level of the midline, in the lateral neural tube with a segmented pattern, and in part of the first left somite which has been described as the Hatschek's nephridium anlagen (Langeland et al., 2006) (Fig. 3G–J). At late neurula stage, expression fades in the midline of the endoderm whereas *Gremlin* is still expressed in part of the first left somite (Fig. 4A, C–F) and in the neural tube where expression is stronger in the anterior and posterior parts of the cerebral vesicle (Fig. 4A, B). At this stage, *Gremlin* expression is also detected in a region that will give rise to the Hatschek's pit (Fig. 4A–C). In larvae, the expression in the neural tube gets restricted to some cells of the cerebral vesicle that are anterior to the frontal eye (Fig. 4G). *Gremlin* expression is also detected at this stage in the Hatschek's pit (Fig. 4H) and in some cells of the endostyle (Fig. 4I, J).

In vertebrates, there are two *Gremlin* paralogues, named *Gremlin1* and *Gremlin2*, although in teleosts more genes can be found,

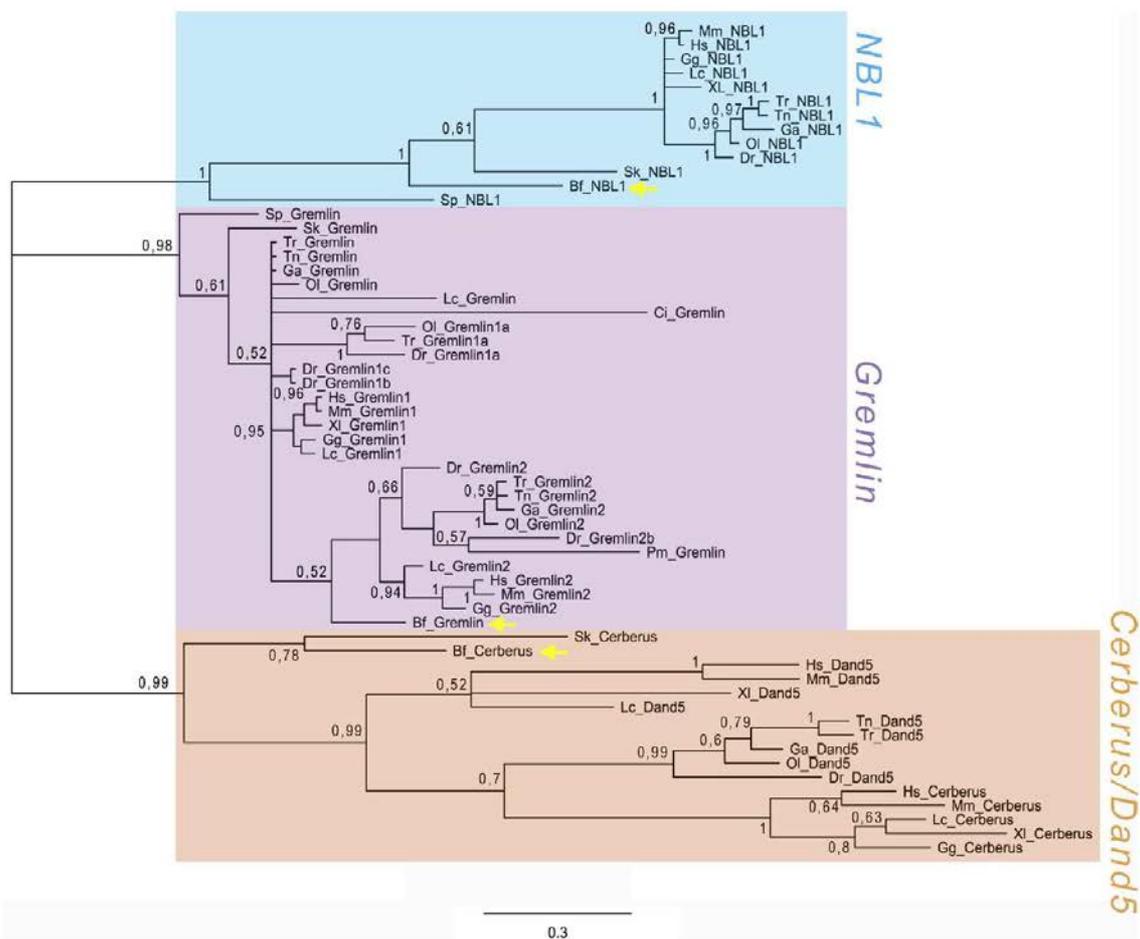


Fig. 1. Evolutionary relationships of DAN family members among deuterostomes. Unrooted Bayesian inference tree of the deuterostome DAN family based on the amino acid sequences of the cystine-knot region. Amphioxus possesses one member of each subfamily (i.e. NBL1, Gremlin1/2 and Cerberus/Dand5, indicated by yellow arrows). Each subfamily is highlighted with a specific color. Scale bar represents 0.3 amino acid substitution per site. Abbreviations: Bf, *Branchiostoma floridae*; Dr, *Danio rerio*; Ga, *Gasterosteus aculeatus*; Gg, *Gallus gallus*; Hs, *Homo sapiens*; Lc, *Latimeria chalumnae*; Mm, *Mus musculus*; Ol, *Oryzias latipes*; Pm, *Petromyzon marinus*; Sk, *Saccoglossus kowalevskii*; Sp, *Strongylocentrotus purpuratus*; Tn, *Tetraodon nigroviridis*; Tr, *Takifugu rubripes*; Xi, *Xenopus laevis*.

probably because of the additional whole genome duplication that occurred in their evolutionary lineage (Fig. 1). In contrast to what we observed for the Cerberus subfamily, expression of the *Gremlin1* and *Gremlin2* orthologues seems to be quite divergent between the different vertebrate lineages for which data are available. Indeed, *Gremlin1* is expressed in the brain and limb bud of mouse and chick embryos, in the forming somites of mouse and in the optic nerve of zebrafish, *Gremlin1a* is maternally expressed and shows a restricted zygotic expression during epiboly. Then, during somitogenesis stages, expression is detected in the pronephritic ducts, the somites, the neural rod and the notochord. Later on, *Gremlin1a* is expressed in the pectoral fin buds (Nicoli et al., 2005). Its paralogue *Gremlin1b* is only expressed later during development in the somites, in the pectoral fin buds and in the pharyngeal arches (Thisse and Thisse, 2004). In *Xenopus*, a different pattern is observed with *Gremlin1* being expressed in the neural crest cell processes and in the pronephritic ducts (Hsu et al., 1998). Concerning *Gremlin2*, expression data are only available for mouse and zebrafish. Again, we can no-

tice important differences since in mouse, *Gremlin2* is expressed only late during development in the forming lung, the dermis, epidermis, and brain (Diez-Roux et al., 2011) whereas in zebrafish expression is detected in the retina, the migratory neural crest cells of the pharyngeal arches, the somites and the swim bladder (Muller et al., 2006).

From what we observe in amphioxus, it seems that only two expression territories can be proposed as ancestral in the chordate lineage: the neural plate borders and the Hatschek's nephridium, which is thought to be the homologue of the vertebrate pronephros (Langeland et al., 2006). The cephalochordate amphioxus lacks neural crest cells but it shares with vertebrates conserved gene expression of neural plate border induction and specifier signals (Yu et al., 2008). Conservation of *Gremlin* expression in the neural plate border strengthens the hypothesis of an ancestral neural border gene network in chordates. The expression of *Gremlin* in amphioxus endoderm, Hatschek's pit and endostyle, which are putative homologues of the adenohypophysis and the thyroid gland, respectively (Holland and Holland, 2001) (Ogasawara,

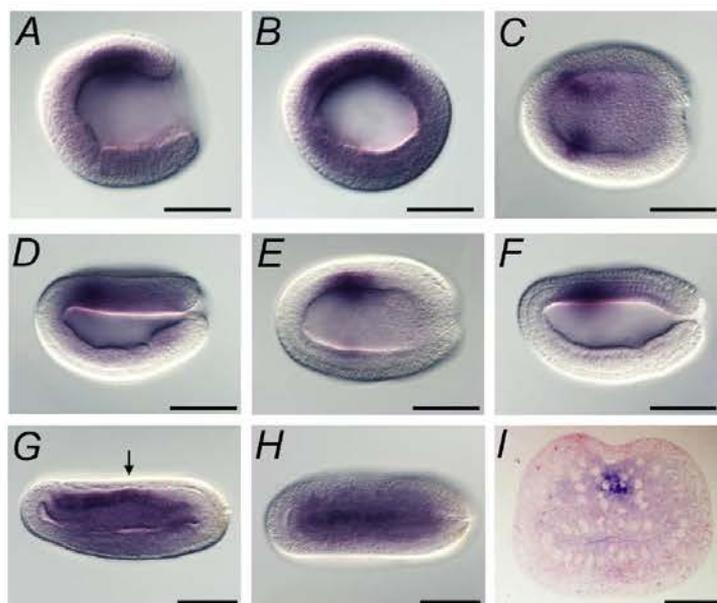


Fig. 2. *Cerberus* expression pattern in amphioxus embryos. Lateral (A) and blastoporal (B) views of a gastrula stage embryo. Dorsal (C) and lateral (D) views of a late gastrula stage embryo. Dorsal (E) and lateral (F) views of an early neurula stage embryo. Lateral (G) and dorsal (H) views of a mid-late neurula stage embryo. Anterior is to the left for lateral and dorsal views, and dorsal to the top for lateral and blastoporal views. (I) Transverse section through a mid-late neurula at the level indicated by an arrow in (G). Scale bars = 50 μm and 20 μm in (I).

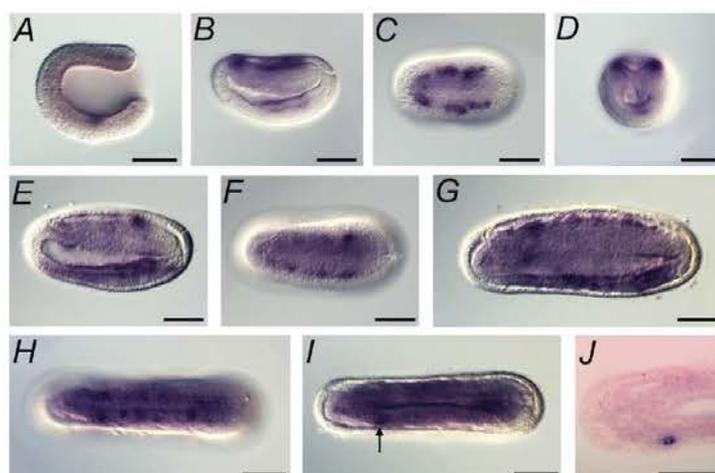


Fig. 3. *Gremlin* expression pattern in early amphioxus embryos. Lateral view of a gastrula stage embryo (A). Lateral (B), dorsal (C) and blastoporal (D) views of an early neurula stage embryo. Lateral (E) and dorsal (F) views of a mid-neurula stage embryo. Lateral (G) and dorsal (H and I) views of a mid-late neurula stage embryo. Arrow in (I) indicates the labeling in the first left somite. (J) Longitudinal section of a mid-late neurula embryo at the level of the labeling in the first left somite. Anterior is to the left for all embryos and dorsal to the top for lateral and blastoporal views. Scale bars = 50 μm .

2000), might either be specific to amphioxus, or was lost in vertebrates. On the other hand, we notice that *Gremlin1* and *Gremlin2* are expressed during embryogenesis in structures that are specific to vertebrates such as limbs or pectoral fin buds, lung and swim bladder, suggesting a recruitment of these two genes for new functions during evolution. Another noticeable difference between amphioxus and vertebrates is the absence of *Gremlin* expression in the amphioxus somites. Again, this divergent expression can be due to a secondary loss in amphioxus or to a specific acquisition in vertebrates. The last proposition seems more likely since *Grem-*

lin1 and *Gremlin2* are expressed in a specific region of the vertebrates somites (i.e. the dermomyotome for mouse *Gremlin1*), suggesting a role in the regionalization of the somites that is a process specific to vertebrates.

1.4. *NBL1* expression pattern

In amphioxus, *NBL1* expression could only be detected by *in situ* hybridization in the somites and in the club-shaped gland at the larval stage (Fig. 5A–C). In vertebrates, only one gene is found in

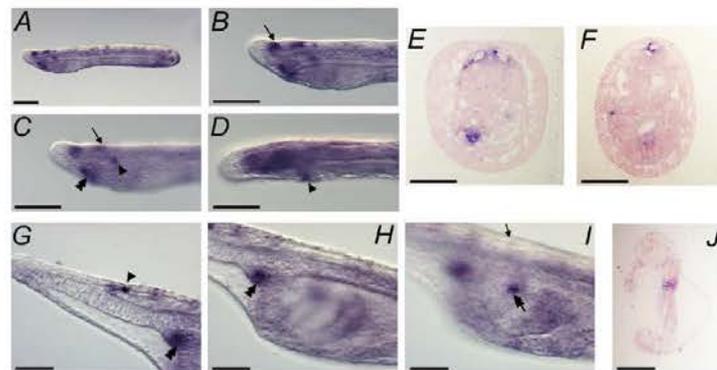


Fig. 4. *Gremlin* expression pattern in late amphioxus embryos. Lateral view of a late neurula stage embryo (A). Lateral (B and C) and dorsal (D) enlargement views of the anterior part of the embryo shown in (A), focused on the first left somite (arrowhead in C and D), on the Hatschek's pit (double arrowhead) and on the labeled anterior neural tube. (E) and (F), cross sections through a late neurula stage embryo at the level of the arrow in (B) and (C), respectively. Anterior part of a larval stage embryo focused on the frontal eye (G), the Hatschek's pit (H), and the endostyle (I). The frontal eye is indicated by an arrowhead (G), the Hatschek's pit is marked by a double arrowhead (G and H) and the labeled cells in the endostyle are indicated by a double arrow (I). (J) Transverse section through a larva at the level indicated by an arrow in (I). Anterior is to the left for all the whole-mounts and dorsal to the top for lateral and blastoporal views. Cross sections are viewed from the posterior end of animal. Scale bars = 50 μ m in panels A–D and scale bars = 25 μ m in panels E–J.

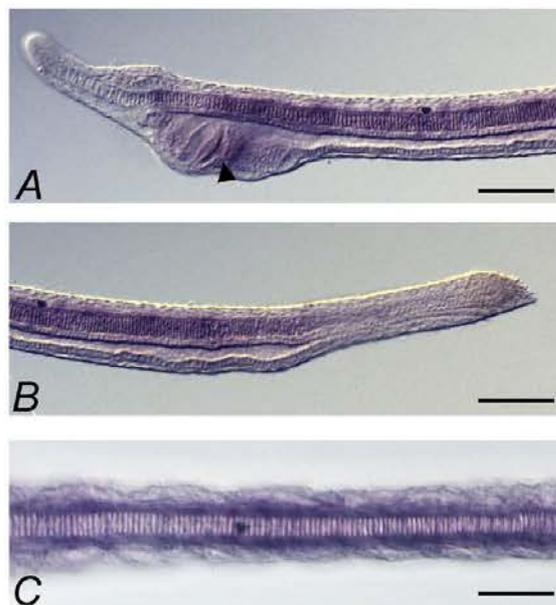


Fig. 5. *NBL1* expression pattern in amphioxus embryos. Lateral view of the anterior (A) and posterior (B) parts of a larva after *in situ* hybridization, and dorsal view (C) at the level of the pigment spot in the trunk. Anterior is to the left and dorsal to the top in lateral views. Scale bars = 50 μ m.

the *NBL1* subfamily and, again, the expression pattern is quite diverse between different species. In mouse and chick, *NBL1* is expressed in the paraxial mesenchyme of the head, in the forming somites and in the limb buds. The expression is later restricted to the dorsal part of the somites: the dermomyotome (Ogita et al., 2001; Pearce et al., 1999). In mouse, *NBL1* expression is also detected in the limb bud, the branchial arches and the olfactory pit (Pearce et al., 1999) whereas in chick *NBL1* is expressed in the otic vesicle, the optic cup and the mesonephritic duct (Gerlach-Bank et al., 2002; Ogita et al., 2001). In *Xenopus*, *NBL1* is expressed in neural crest cell derivatives (Eimon and Harland, 2001). In zebra-

fish, *NBL1* starts to be expressed late during development in the brain and the branchial arches (Thisse and Thisse, 2004). Altogether these data suggest that *NBL1* function might be important only at late developmental stages in amphioxus and vertebrates and might be at least partly specific to each lineage.

2. Materials and methods

2.1. Characterization of amphioxus *DAN* family members

Sequences of known members of the *DAN* family were used to search the genome assembly of *B. floridae* on the JGI website (<http://genome.jgi-psf.org/Brafl1/Brafl1.home.html>). Positive matches were aligned to putative deuterostome orthologues with ClustalW2 (Larkin et al., 2007) with default parameters. The alignment was then manually corrected in Seaview (Gouy et al., 2010). The alignment is available in fasta format as Supplementary Material (File S1). Only the well conserved cysteine rich domain was used for phylogenetic analyses (108 sites). Bayesian Inference (BI) tree was inferred using MrBayes 3.1.2 (Ronquist et al., 2003), with the JTT + I + G model as recommended by ProtTest (Abascal et al., 2005) under the Akaike information criterion, using the CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). Two independent runs were performed, each with 4 chains. A burn-in of 25% was used and a 50 percent majority rule tree was calculated for the remaining trees.

2.2. Cloning of *B. lanceolatum* partial *cdNA*

Predicted sequences of *Cerberus*, *NBL1* and *Gremlin* from *B. floridae* (with respective accession number 237167, 67451 and 220377 at the JGI) were used to design degenerated primers for RT-PCR amplification from *B. lanceolatum* total RNA. A mix of total mRNA from *B. lanceolatum* embryos at different developmental stages was used as a template for retro-transcription. Amplification was performed using the GoTaq system (Promega) and a touch-down PCR program with annealing temperature from 65 to 40 °C (Escriva et al., 1999). Amplified fragments were cloned using the pGEM-T Easy system (Promega) and sub-cloned in pBluescript II KS+ for probe synthesis. Accession numbers are JX945166, JX945167 and JX945168 for *Cerberus*, *NBL1* and *Gremlin* partial *cdNA* of *B. lanceolatum*, respectively.

2.3. Whole mount *in situ* hybridization

Probes were synthesized using the DIG labeling system (Roche) with the appropriate enzymes after plasmid linearization. Ripe animals of *B. lanceolatum* were collected in Argelès-sur-Mer (France), and gametes were obtained by heat stimulation (Fuentes et al., 2004, 2007). Fixation and whole mount *in situ* hybridization were performed as described in (Somorjai et al., 2008), except the chromogenic reaction which was performed using BM Purple, and the proteinase K digestion which was omitted. 1–1.5 µm sections were performed after embedding in Epon resin and further colored using Ponceau Red.

3. Conclusion

We have identified in amphioxus one orthologue of each deuterostome DAN subfamily (i.e. Cerberus/Dand5, Gremlin1/2 and NBL1). Expression patterns of these genes during embryonic development suggest that the implication of *Cerberus/Dand5* in the antero-posterior axis specification and in the determination of the left-right asymmetry is ancestral in chordates. Moreover, after the vertebrate specific gene duplication, a subfunctionalization of each paralogous gene seems to have occurred. In contrast to Cerberus/Dand5, the expression of Gremlin1/2 and NBL1 subfamily genes is poorly conserved both between amphioxus and vertebrates and among the different vertebrate species. It seems also that genes from these groups were recruited in vertebrates for new functions as suggested by their expression in embryonic structures/processes that are specific acquisitions of this lineage.

Acknowledgements

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche Grants ANR-2010-BLAN-1716 01 and ANR-2010-BLAN-1234 02 to HE.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.gexp.2013.07.005>.

References

- Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D., 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104–2105.
- Bardot, B., Lecoin, L., Huillard, E., Calothy, G., Marx, M., 2001. Expression pattern of the *drm/gremlin* gene during chicken embryonic development. *Mech. Dev.* 101, 263–265.
- Bell, E., Munoz-Sanjuan, I., Altmann, C.R., Vonica, A., Brivanlou, A.H., 2003. Cell fate specification and competence by Coco, a maternal BMP, TGFbeta and Wnt inhibitor. *Development* 130, 1381–1389.
- Belo, J.A., Bouwmeester, T., Leyns, L., Kertesz, N., Gallo, M., Follettie, M., De Robertis, E.M., 1997. Cerberus-like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mech. Dev.* 68, 45–57.
- Belo, J.A., Silva, A.C., Borges, A.C., Filipe, M., Bento, M., Goncalves, L., Vitorino, M., Salgueiro, A.M., Teixeira, V., Tavares, A.T., Marques, S., 2009. Generating asymmetries in the early vertebrate embryo: the role of the Cerberus-like family. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 1399–1407.
- Bertrand, S., Escriva, H., 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: amphioxus. *Development* 138, 4819–4830.
- Boorman, C.J., Shimeld, S.M., 2002. Pitx homeobox genes in Ciona and amphioxus show left-right asymmetry is a conserved chordate character and define the ascidian adenocephaly. *Evol. Dev.* 4, 354–365.
- Bouwmeester, T., Kim, S., Sasaki, Y., Lu, B., De Robertis, E.M., 1996. Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 382, 595–601.
- Diez-Roux, G., Banfi, S., Sultan, M., Geffers, L., Anand, S., Rozado, D., Magen, A., Canidio, E., Pagani, M., Peluso, I., Lin-Marq, N., Koch, M., Bilio, M., Cantello, I., Verde, R., De Masi, C., Bianchi, S.A., Cicchini, J., Perroud, E., Mehmeti, S., Dagand, E., Schrimmer, S., Numberger, A., Schmidt, K., Metz, K., Zwingmann, C., Brieske, N., Springer, C., Hernandez, A.M., Herzog, S., Grabbe, F., Sieverding, C., Fischer, B., Schrader, K.,

- Brockmeyer, M., Dettmer, S., Helbig, C., Alunni, V., Battaini, M.A., Mura, C., Henrichsen, C.N., Garcia-Lopez, R., Echevarria, D., Puelles, E., Garcia-Calero, E., Kruse, S., Uhr, M., Kauck, C., Feng, G., Milyaev, N., Ong, C.K., Kumar, L., Lam, M., Semple, C.A., Gyenesi, A., Mundlos, S., Radelof, U., Lehrach, H., Sarmientos, P., Reymond, A., Davidson, D.R., Dolle, P., Antonarakis, S.E., Yaspo, M.L., Martinez, S., Baldock, R.A., Eichele, G., Ballabio, A., 2011. A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biol.* 9, e1000582.
- Eimon, P.M., Harland, R.M., 2001. Xenopus Dan, a member of the Dan gene family of BMP antagonists, is expressed in derivatives of the cranial and trunk neural crest. *Mech. Dev.* 107, 187–189.
- Escriva, H., Robinson, M., Laudet, V., 1999. Evolutionary biology of the nuclear receptor superfamily. In: Picard, D. (Ed.), *Nuclear Receptors: A practical Approach*. Oxford University Press, pp. 1–28.
- Fuentes, M., Schubert, M., Dalfo, D., Candiani, S., Benito, E., Gardenyes, J., Godoy, L., Moret, F., Illas, M., Patten, I., Permany, J., Oliveri, D., Boeuf, G., Falcon, J., Pestarino, M., Fernandez, J.G., Albalat, R., Laudet, V., Vernier, P., Escriva, H., 2004. Preliminary observations on the spawning conditions of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) in captivity. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 302, 384–391.
- Fuentes, M., Benito, E., Bertrand, S., Paris, M., Mignardot, A., Godoy, L., Jimenez-Delgado, S., Oliveri, D., Candiani, S., Hirsinger, E., D'Aniello, S., Pascual-Anaya, J., Maeso, I., Pestarino, M., Vernier, P., Nicolas, J.F., Schubert, M., Laudet, V., Genevieve, A.M., Albalat, R., Garcia Fernandez, J., Holland, N.D., Escriva, H., 2007. Insights into spawning behavior and development of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 308, 484–493.
- Gerlach-Bank, L.M., Ellis, A.D., Noonan, B., Barald, K.F., 2002. Cloning and expression analysis of the chick DAN gene, an antagonist of the BMP family of growth factors. *Dev. Dyn.* 224, 109–115.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224.
- Hashimoto, H., Rebagliati, M., Ahmad, N., Muraoka, O., Kurokawa, T., Hibi, M., Suzuki, T., 2004. The Cerberus/Dan-family protein Charon is a negative regulator of Nodal signaling during left-right patterning in zebrafish. *Development* 131, 1741–1753.
- Holland, L.Z., Holland, N.D., 2001. Evolution of neural crest and placodes: amphioxus as a model for the ancestral vertebrate? *J. Anat.* 199, 85–98.
- Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M., Harland, R.M., 1998. The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol. Cell* 1, 673–683.
- Humnicki, L., Goldovsky, L., Freilich, S., Moustakas, A., Ouzounis, C., Heldin, C.H., 2009. Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evol. Biol.* 9, 28.
- Langeland, J.A., Holland, L.Z., Chastain, R.A., Holland, N.D., 2006. An amphioxus LIM-homeobox gene, *Amphilim1/5*, expressed early in the invaginating organizer region and later in differentiating cells of the kidney and central nervous system. *Int. J. Biol. Sci.* 2, 110–116.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Willm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, pp. 1–8.
- Muller, I.L., Knapik, E.W., Hatzopoulos, A.K., 2006. Expression of the protein related to Dan and Cerberus gene—*prdc*—during eye, pharyngeal arch, somite, and swim bladder development in zebrafish. *Dev. Dyn.* 235, 2881–2888.
- Nicoli, S., Gilardelli, C.N., Pozzoli, O., Presta, M., Cotelli, F., 2005. Regulated expression pattern of gremlin during zebrafish development. *Gene Expr. Patterns* 5, 539–544.
- Ogasawara, M., 2000. Overlapping expression of amphioxus homologs of the thyroid transcription factor-1 gene and thyroid peroxidase gene in the endostyle: insight into evolution of the thyroid gland. *Dev. Genes Evol.* 210, 231–242.
- Ogita, J., Isogai, E., Sudo, H., Sakiyama, S., Nakagawara, A., Koseki, H., 2001. Expression of the Dan gene during chicken embryonic development. *Mech. Dev.* 109, 363–365.
- Onai, T., Yu, J.K., Blitz, I.L., Cho, K.W., Holland, L.Z., 2010. Opposing Nodal/Vg1 and BMP signals mediate axial patterning in embryos of the basal chordate amphioxus. *Dev. Biol.* 344, 377–389.
- Pearce, J.J., Penny, G., Rossant, J., 1999. A mouse cerberus/Dan-related gene family. *Dev. Biol.* 209, 98–110.
- Rodriguez Esteban, C., Capdevila, J., Economides, A.N., Pascual, J., Ortiz, A., Izpisua Belmonte, J.C., 1999. The novel Cer-like protein *Caronte* mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Nature* 401, 243–251.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Hohna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Somorjai, I., Bertrand, S., Camasses, A., Haguenaer, A., Escriva, H., 2008. Evidence for stasis and not genetic piracy in developmental expression patterns of *Branchiostoma lanceolatum* and *Branchiostoma floridae*, two amphioxus species that have evolved independently over the course of 200 Myr. *Dev. Genes Evol.* 218, 703–713.
- Thisse, C., Thisse, B., 2004. Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis.

- Urist, M.R., 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893–899.
- Wu, M.Y., Hill, C.S., 2009. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev. Cell* 16, 329–343.
- Yanagita, M., 2005. BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 309–317.
- Yokouchi, Y., Vogan, K.J., Pearse 2nd, R.V., Tabin, C.J., 1999. Antagonistic signaling by Caronte, a novel Cerberus-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression. *Cell* 98, 573–583.
- Yu, J.K., Meulemans, D., McKeown, S.J., Bronner-Fraser, M., 2008. Insights from the amphioxus genome on the origin of vertebrate neural crest. *Genome Res.* 18, 1127–1132.
- Yu, J.K., Satou, Y., Holland, N.D., Shin, I.T., Kohara, Y., Satoh, N., Bronner-Fraser, M., Holland, L.Z., 2007. Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer. *Nature* 445, 613–617.

Sequencing and Analysis of the Mediterranean Amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) Transcriptome

Silvan Oulion*, Stephanie Bertrand, Mohamed R. Belgacem, Yann Le Petillon, Hector Escriva*

CNRS, UMR7232, Université Pierre et Marie Curie Paris 06, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France

Abstract

Background: The basally divergent phylogenetic position of amphioxus (Cephalochordata), as well as its conserved morphology, development and genetics, make it the best proxy for the chordate ancestor. Particularly, studies using the amphioxus model help our understanding of vertebrate evolution and development. Thus, interest for the amphioxus model led to the characterization of both the transcriptome and complete genome sequence of the American species, *Branchiostoma floridae*. However, recent technical improvements allowing induction of spawning in the laboratory during the breeding season on a daily basis with the Mediterranean species *Branchiostoma lanceolatum* have encouraged European Evo-Devo researchers to adopt this species as a model even though no genomic or transcriptomic data have been available. To fill this need we used the pyrosequencing method to characterize the *B. lanceolatum* transcriptome and then compared our results with the published transcriptome of *B. floridae*.

Results: Starting with total RNA from nine different developmental stages of *B. lanceolatum*, a normalized cDNA library was constructed and sequenced on Roche GS FLX (Titanium mode). Around 1.4 million of reads were produced and assembled into 70,530 contigs (average length of 490 bp). Overall 37% of the assembled sequences were annotated by BlastX and their Gene Ontology terms were determined. These results were then compared to genomic and transcriptomic data of *B. floridae* to assess similarities and specificities of each species.

Conclusion: We obtained a high-quality amphioxus (*B. lanceolatum*) reference transcriptome using a high throughput sequencing approach. We found that 83% of the predicted genes in the *B. floridae* complete genome sequence are also found in the *B. lanceolatum* transcriptome, while only 41% were found in the *B. floridae* transcriptome obtained with traditional Sanger based sequencing. Therefore, given the high degree of sequence conservation between different amphioxus species, this set of ESTs may now be used as the reference transcriptome for the *Branchiostoma* genus.

Citation: Oulion S, Bertrand S, Belgacem MR, Le Petillon Y, Escriva H (2012) Sequencing and Analysis of the Mediterranean Amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) Transcriptome. PLoS ONE 7(5): e36554. doi:10.1371/journal.pone.0036554

Editor: Vincent Laudet, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France

Received: March 14, 2012; **Accepted:** April 7, 2012; **Published:** May 9, 2012

Copyright: © 2012 Oulion et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The laboratory of HE is supported by the Agence Nationale de la Recherche Grants ANR-2010-BLAN-1716 01 and ANR-2010-BLAN-1234 02. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: HE is a PLoS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: oulion@obs-banyuls.fr (SO); hescriva@obs-banyuls.fr (HE)

Introduction

The Mediterranean amphioxus, *Branchiostoma lanceolatum*, belongs to the subphylum Cephalochordata, one of the three extant chordate groups with the urochordates and the vertebrates. Although urochordates are the closest relatives of vertebrates [1], they are extremely derived animals when considered from an anatomic and genomic viewpoint. In contrast, cephalochordates, which diverged earlier within the chordate lineage, show many conserved characteristics with vertebrates, such as their genomic organization, genetics, morphoanatomy and developmental mechanisms [2,3]. Amphioxus is thus considered 'vertebrate-like', but simpler and characterized by a dorsal hollow nerve cord, dorsal notochord, ventral digestive tract, and pharynx perforated with gill slits. This relative simplicity is also found in its genome because cephalochordates diverged from the other chordates before the two whole genome duplication events that occurred at the base of the vertebrate diversification [4,5]. For these reasons, amphioxus belongs to a phylogenetic group that is extremely important for

understanding how vertebrates evolved from an invertebrate-chordate ancestor (i.e. Evo-Devo studies).

Three amphioxus species are currently used for Evo-Devo studies: the Floridian-Caribbean *Branchiostoma floridae*, the East Asian *B. belcheri*, and the Mediterranean *B. lanceolatum*. Even if the divergence time between these species was estimated to be between 100 and 200 Myr [6,7] they show a high degree of conservation both at the morphological and gene expression levels [8]. *B. floridae* is to date the best-characterized species and its complete genome sequence [9,10] as well as data for many ESTs [10,11,12] are published. However, the Mediterranean amphioxus species is becoming an attractive model since, unlike for the other species, a reliable method now exists for inducing spawning in the laboratory on a daily basis during the breeding season (i.e. from May to July) [13,14]. *B. lanceolatum* is becoming a model for developmental biology and evolution [3], and its complete genome sequence will be available in the next future (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/L-espece-d-amphioxus-un-modele.html>). In this context, in order to expand our knowledge and to develop

new tools for the scientific community working with *B. lanceolatum*, we have sequenced and analyzed its normalized transcriptome. The high quality of the *B. lanceolatum* reference transcriptome obtained will become essential for the annotation and study of amphioxus genomic resources in future studies.

Results and Discussion

454-pyrosequencing and Assembly

A total of 1,423,403 reads (average length 275 bp) and 391 Mbp were generated by 454-pyrosequencing from a normalized random-primed cDNA library. The cDNA library was constructed with total RNA extracted from eight different developmental stages (eight-cell embryos, blastula, gastrula, four different neurula stages, and larva) as well as from adult tissues of the Mediterranean amphioxus, *B. lanceolatum* (Table 1; sequencing performed by GATC Biotech AG). After cleaning and removing the 5' and 3' 30 bp adapters of each sequence, a total of 1,148,112 high quality reads (318 Mbp) were obtained and used for *de novo* assembly. The size distribution of these high quality reads is shown in Figure 1A (sequences shorter than 100 bp were removed from the analysis). After clustering and assembly with the CLC workbench Version 4.6.1, a total of 70,530 contigs, whose size distribution is represented in Figure 1B, were obtained. Contig lengths ranged from 100 bp to 6,202 bp, with an average length of 490 bp (Table 1 and Figure 1B). The contig coverage ranges from 2 to more than 1,000 reads per contig, with the majority of contigs covered by less than 20 reads (Figure 2). There is a positive relationship between the length of a contig and the number of reads it contains (Figures 2 and 3), as expected for a randomly fragmented transcriptome.

Sequence Annotation

The annotation of the 70,530 contigs was performed by BlastX searches against the SwissProt database and the NCBI non-redundant (nr) protein database using the Blast2GO suite [15,16].

Table 1. Sequence and assembly statistics.

Sequence statistics	
Raw sequencing reads	
Number of reads	1,423,403
Total size, bp	391,432,116
Average size, bp	275
Aligned reads	
Number of reads	1,153,224
Total size, bp	319,427,969
Average size, bp	277
Maximum length, bp	1175
% GC	44.2
% N	0.02
Assembly statistics	
Number of contigs	70,530
Total size, bp	34,583,174
Average size of contigs, bp	490
Maximum length, bp	6202
% GC	44.4

doi:10.1371/journal.pone.0036554.t001

From the SwissProt database we have found matches for 17,930 sequences, and from the NCBI non-redundant (nr) protein database we obtained 7,964 supplementary matches. Thus, a total of 25,894 sequences were annotated (i.e. 37% of the contigs), and corresponded to 17,104 unique accession numbers. It is worth noting that the number of annotated short sequences (i.e. shorter than 500 bp) is less important than the number of annotated long sequences (i.e. longer than 500 bp) (Figure 4). This result can be explained by the presence in the short sequences of fragments corresponding to 5' and 3' UTRs that are not highly conserved between species and therefore not annotated.

If we consider that the Mediterranean amphioxus has the same gene set as the American species (i.e. about 21,900 protein coding loci [10]), we can estimate that the annotated subset of the *B. lanceolatum* transcriptome covers 78% (17,104 of 21,900) of the amphioxus genes. The majority of the top BLAST hits of these annotated sequences correspond to sequences from *Branchiostoma floridae*. This was expected since these two cephalochordate species are closely related and both the whole genome sequence and ESTs data are available for *B. floridae* in the databases used [9,10,11].

Survey of the Transcriptome Representativeness

In order to validate the high presence of the amphioxus genes in the *B. lanceolatum* transcriptome (78%), we performed a survey of some multigenic families that have been well characterized in amphioxus previously. Thus, of the 132 homeobox genes identified in the *B. floridae* genome [17], 94 are present in the *B. lanceolatum* transcriptome (i.e. 71%) (Table S1). This result is similar to the 78% of coverage at the genome scale. Moreover, some genes (like the posterior Hox ones: from Hox7 to Hox15) that are not expressed in the eight developmental stages selected for the RNA pool used for the cDNA library construction, are not detected. Other well characterized superfamilies which are also well-represented in the *B. lanceolatum* transcriptome are the Fox gene family and the Nuclear Receptor (NR) gene family. We have identified 43 Fox genes of the 49 (i.e. 88%) described in *B. floridae* [18], and 25 nuclear receptors of the 33 (i.e. 76%) present in *B. floridae* [19,20] (Table S2). These results confirm the good coverage of the amphioxus genome by the *B. lanceolatum* transcriptome. However, other gene families like the Fgf (Fibroblast growth factors) or the opsins are less present in the transcriptome. Indeed, only 2 of the 8 Fgfs [21] and 3 of the 20 opsins [9] are part of the *B. lanceolatum* transcriptome (Table S2). This low representation of some genes in the transcriptome may be explained by the low level of gene expression of some genes or because these genes are only expressed during late embryonic development (i.e. in late larva stages whose RNA was not included in the pool used for the cDNA library construction).

Gene Ontology Analyses and Comparisons with the *B. floridae* Genomic and Transcriptomic Data

Gene Ontology (GO) analyses of the *B. lanceolatum* transcriptome were performed using the Blast2GO suite annotation [22,23], which provides information on the molecular function, the cellular component and the biological process for each sequence present in the transcriptome. In total, 188,185 GO terms were assigned for 21,819 (84%) sequences, classed into three independent ontology categories: (i) 54,218 (28.8%) terms corresponding to a biological process, (ii) 85,213 (45.3%) to a molecular function, and (iii) 48,754 (25.9%) to a cellular component. Level 2 of these GO assignments are shown in Figures 5, 6, and 7. Concerning biological processes, the most important categories present in the transcriptome are: cellular process (19%), metabolic process (14%) and biological regulation

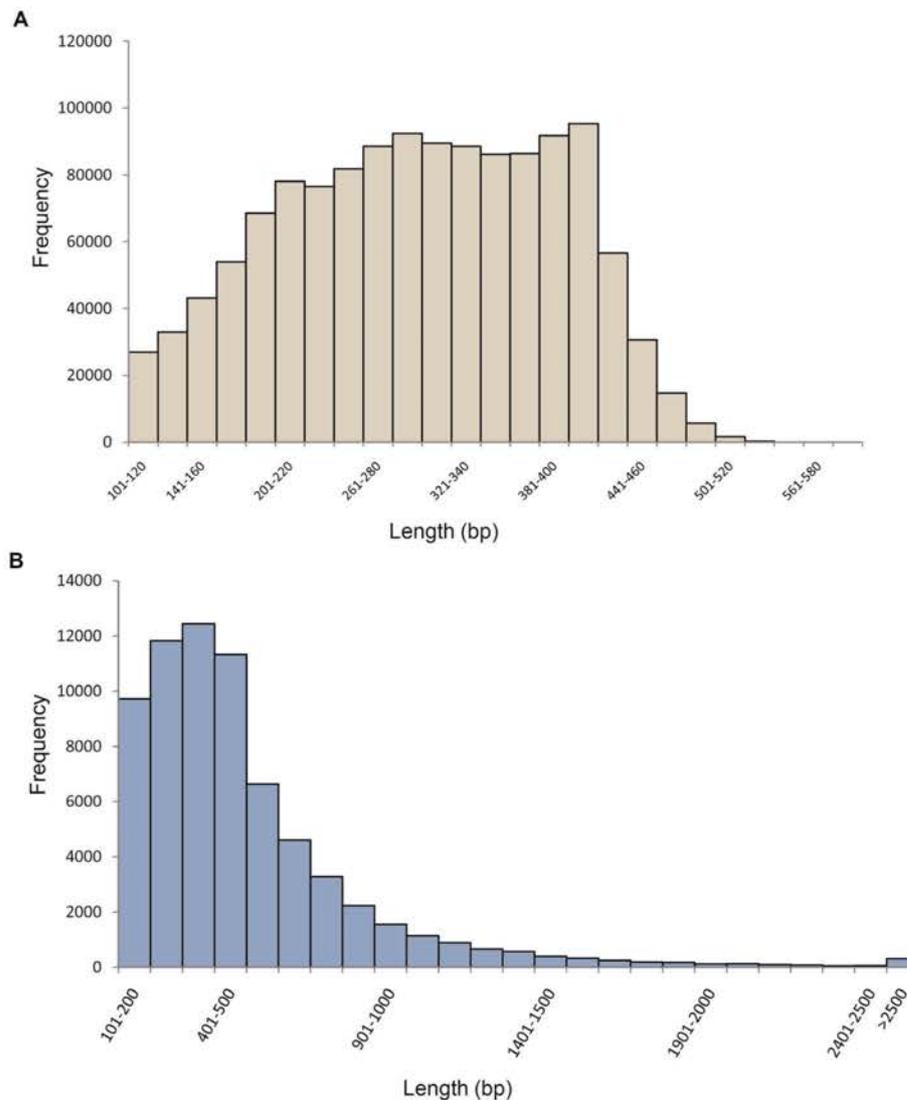


Figure 1. Size distribution of reads and contigs. Only reads (A) and contigs (B) bigger than 100 bp were figured.
doi:10.1371/journal.pone.0036554.g001

(11%), followed by multicellular organismal process (8%), developmental process (7%), cellular component organization (6%), response to stimulus (6%), localization (6%) and signaling (5%). Genes coding for other biological categories such as locomotion, growth, death, pigmentation and rhythmic processes are also present but in a lower proportion (Figure 5). Concerning the molecular function category, the binding (51%) and catalytic activities (28%) account for most of the terms, followed by transcription regulator (6%), molecular transducer (4%), transporter (4%) and enzyme regulator (3%) activities (Figure 6). Finally, among the cellular component category, 43% of the terms are related to the cell, 31% to organelles, 13% to macromolecular complexes, 9% to the membrane enclosed lumen, 3% to the extracellular region and 1% to the synapses (Figure 7).

The distribution of genes based on the GO terms within these three ontology categories in *B. lanceolatum* is consistent with

a similar study carried out on *B. floridae* [10]. Indeed, in both species, the most represented terms corresponding to a biological process are cellular and metabolic processes as well as biological regulation. In addition, the binding and the catalytic activities are the major molecular functions; and the cell, organelle and macromolecular complexes are the main cellular components represented. Although there are a few differences within each category, the general organization and the main terms are similar in both amphioxus species. With the rapid rise of high throughput sequencing, many transcriptomic data are now available, in particular for vertebrate species. Comparing the transcriptome of both amphioxus species with other aquatic vertebrates (teleost fishes like the European eel [24], the rainbow trout [25], the guppy or the zebrafish [26]), we observed the same general organization for each ontological category of genes. Even if a possible bias may exist due to the huge amount of vertebrate transcriptomic data in

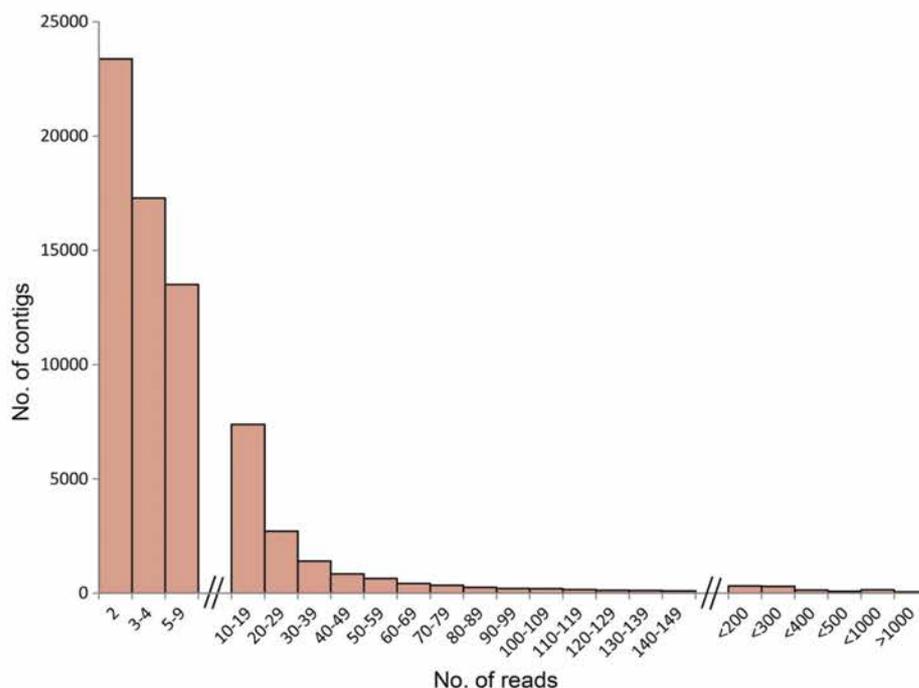


Figure 2. Composition of contigs. The majority of contigs have a low numbers of reads (less than 10 reads). doi:10.1371/journal.pone.0036554.g002

databases, these results suggest that the observed gene content distribution in the presented amphioxus transcriptome is a common feature in chordates.

A comparative analysis (using BlastN approaches with an E-value cut-off of $1E^{-3}$ and a minimal alignment size of 50 bp) between the 70,530 contigs of *B. lanceolatum* and the genomic [10]

and transcriptomic [11] data of *B. floridae* shows that 83% of the *B. floridae* predicted genes have significant hits for one or more sequences of the *B. lanceolatum* transcriptome (Figure 8). This is consistent with our previous data showing that the annotated part of the *B. lanceolatum* transcriptome covered 78% of the *B. floridae* predicted genes.

The 83% coverage of the amphioxus gene set obtained here is better than the coverage reported previously (only 41%) with the 262,037 ESTs of *B. floridae* [11] (Figure 8). The quality of both the assembly and the annotation of the *B. lanceolatum* transcriptome obtained in our present study confirm that high throughput sequencing on the GS FLX of a normalized cDNA library is better suited than traditional sequencing methods (i.e. Sanger) for acquiring an overview of a species' transcriptomic landscape.

Additional differences between the two transcriptomic approaches are also evident when the two data sets are compared. For example, 86% of the *B. floridae* ESTs sequences (i.e. 226,250 of 262,037) have significant hits in the *B. lanceolatum* transcriptome, and only 53% of the *B. lanceolatum* transcriptome sequences (i.e. 37,034 of 70,530) match the *B. floridae* transcriptome (Figure 8). This result is supplementary evidence showing that the *B. lanceolatum* transcriptome set is larger than the *B. floridae* one, and confirms the robustness of this analysis. However, it is also fair to note that even if the coverage using a Sanger sequencing approach is lower, it results in a cDNA library whose clones are very useful for further studies.

However, comparing the *B. lanceolatum* transcriptome (annotated and non-annotated contigs) and the 21,900 predicted genes of the *B. floridae* genome found only 49% positive hits (34,560 of the 70,530 sequences). This result seems quite low even if it is consistent with 50% of the matches described for the same comparison using the *B. floridae* transcriptome [11] (Figure 8). Two

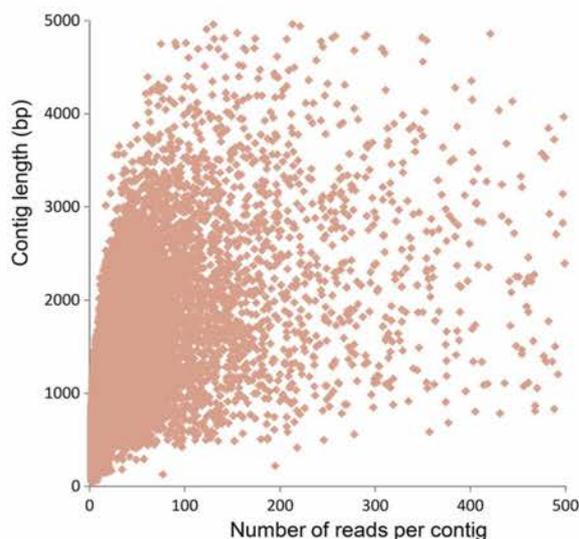


Figure 3. Scatter plot representing the number of reads per contig for each contig length. doi:10.1371/journal.pone.0036554.g003

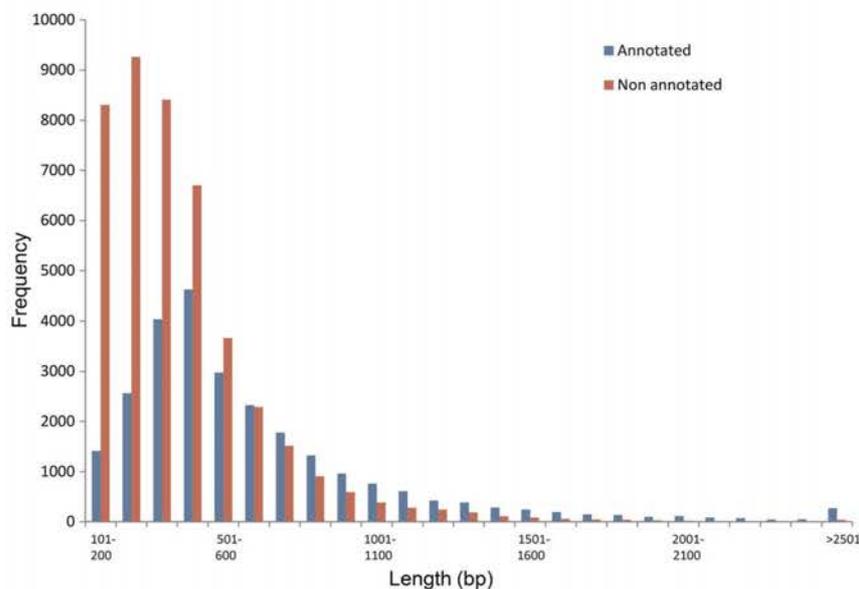


Figure 4. Size distribution of annotated (blue) and non-annotated (red) contigs. Non-annotated contigs are highly present within the shorter contigs (less than 500 bp).
doi:10.1371/journal.pone.0036554.g004

possible explanations for this low number of hits can be suggested: first, the presence in the transcriptome of transcripts that do not code for proteins, and, second, the presence of short sequences corresponding to the non-translated regions of protein coding RNAs (5' and 3' UTRs). Both explanations are reasonable because the comparison between the annotated part of the *B. lanceolatum* transcriptome (i.e. 25,894 of the 70,530 assembled sequences) with the *B. floridae* predicted genes showed matches with 92% of the sequences and the majority of the annotated

sequences of the transcriptome correspond to long sequences, while the shorter ones contain predominantly non-annotated sequences (Figure 4).

Conclusions

In this study, RNA-seq was used to describe the reference transcriptome of the Mediterranean amphioxus *B. lanceolatum*. The strategy used here, combining the construction of a normalized cDNA library with RNAs extracted from nine key developmental

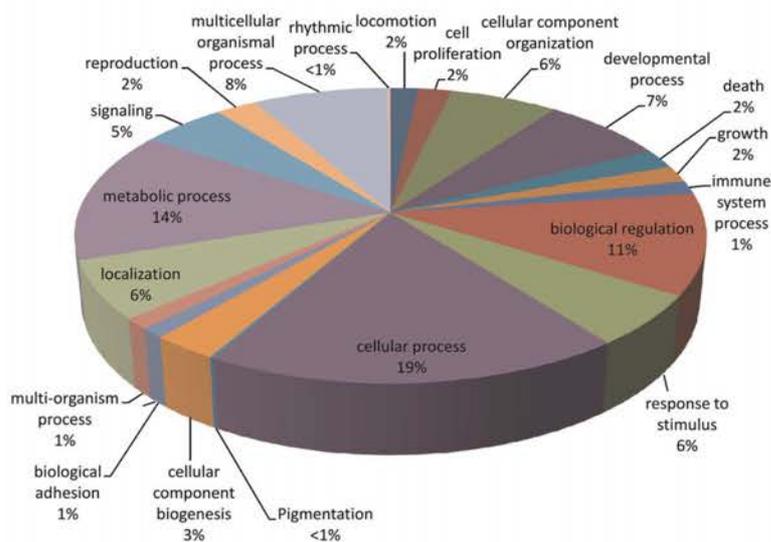


Figure 5. Biological Process. Gene Ontology (GO) assignment of the *Branchiostoma lanceolatum* transcriptome for the Biological Process category (total of 54,218 terms).
doi:10.1371/journal.pone.0036554.g005

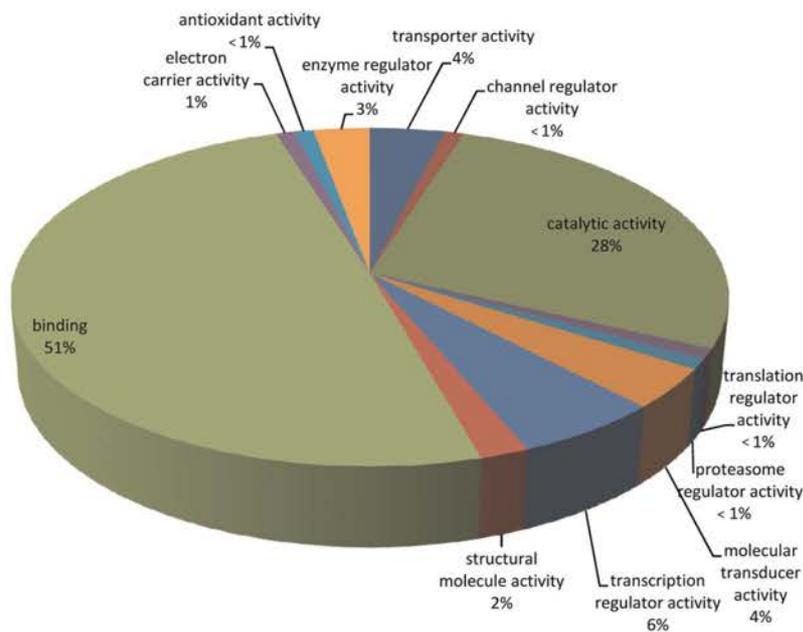


Figure 6. Molecular Function. Gene Ontology (GO) assignment of the *B. lanceolatum* transcriptome for the Molecular Function category (total of 85,213 terms).
doi:10.1371/journal.pone.0036554.g006

stages with a high throughput GS FLX sequencing, resulted in the achievement of high quality results. Indeed, sequencing of 1,423,403 reads allowed their assembly into 70,530 contigs and the functional annotation of 37% of these. Moreover, the *B. lanceolatum* reference transcriptome contains more than 83% of the genes that have been predicted in the genome of the Floridian species. Given the morphological and functional closeness between

different amphioxus species [8], as well as the sequence conservation of coding genes, these transcriptomic data should be extremely useful, not only for future research on *B. lanceolatum* but also on the other cephalochordate species. Moreover, these data will be essential as a basis for the characterization of the *B. lanceolatum* genome in the near future.

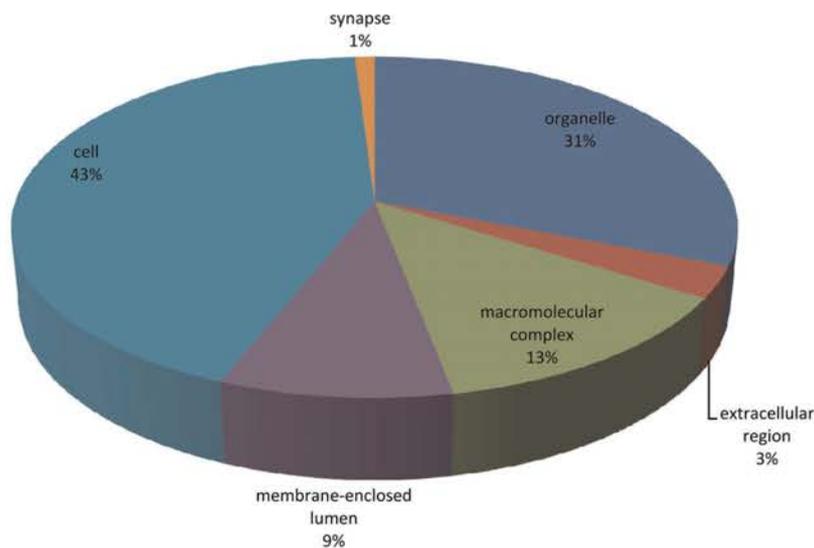


Figure 7. Cellular Component. Gene Ontology (GO) assignment of the *B. lanceolatum* transcriptome for the Cellular Component category (total of 48,754 terms).
doi:10.1371/journal.pone.0036554.g007

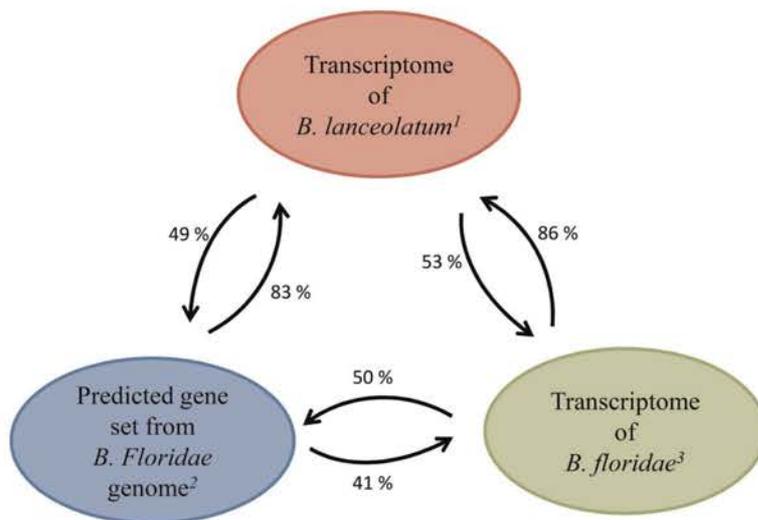


Figure 8. Genomic and transcriptomic comparisons between *B. floridae* and *B. lanceolatum*. BlastN were performed between each database in both directions. The arrow indicates the sense of the blast, from the query to the database. Databases used: (1) transcriptomic data of *B. lanceolatum* presented here; (2) genomic data of *B. floridae* published by Putnam et al. [10]; (3) transcriptomic data of *B. floridae* published by Yu et al. [11].

doi:10.1371/journal.pone.0036554.g008

Materials and Methods

Amphioxus Sample, RNA Isolation and cDNA Library Construction

Ripe animals of the Mediterranean amphioxus species (*B. lanceolatum*) were collected from Argelès-sur-Mer (France), and gametes were obtained by heat stimulation [13,14] (note that no specific permits were required for this study). *B. lanceolatum* embryos at different developmental stages (eight-cell embryos, blastula, gastrula, early neurula, mid-neurula, late neurula, neurula before the mouth opening and larva stages), as well as ripe adults, were frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using the RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) after disrupting and homogenizing the sample with TissueLyser (QIAGEN). A mix of 25 µg of total RNA was used for the cDNA library construction by GATC Biotech SARL.

Sequencing and Assembly

A cDNA library was constructed from isolated poly(A)+ RNA and normalized through denaturation and reassociation of cDNA according to standard protocols. Before sequencing, the library was PCR amplified (8 cycles) and gel purified (size range of interest: 500–800 bp). Sequencing was performed by GATC Biotech SARL using a GS FLX sequencer. The raw reads obtained were cleaned (by removing the adapters) and assembled by *de novo* assembling with the CLC workbench Version 4.6.1. Sequences were deposited in the NCBI Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) database (accession numbers: JT846176 - JT905674).

Functional Annotation

Functional annotation of the *B. lanceolatum* transcriptome was done using the Blast2GO software v.2.5.0 [15,16]. Homology searches were first performed using BlastX against the SwissProt database. In a second step, queries that did not match with any SwissProt sequences were searched for using BlastX against the

NCBI non-redundant protein database. Both BLAST searches were performed with the same parameters (E-value cut-off of $1E^{-3}$). For the Gene Ontology (GO) association to BLAST hits previously obtained, we used the Blast2GO suite with the following standard parameters: E-value $<1E^{-6}$, annotation cut-off >55 , and a GO weight >5 .

Supporting Information

Table S1 Representativeness of Homeobox genes in the transcriptome. Survey showing which amphioxus Homeobox genes are present in the *B. lanceolatum* transcriptome. The study was done on the homeobox genes identified by Takatori et al. [17], plus the related *Pon* and *Pax-1/9* genes. Green: the gene is present; red: the gene is absent.

(PDF)

Table S2 Representativeness of Fox genes, Nuclear Receptor genes and Fibroblast Growth Factor genes in the transcriptome. Survey showing which amphioxus Fox genes (A), Nuclear Receptor (NR) genes (B) and Fibroblast Growth Factor (Fgf) genes (C) are present in the *B. lanceolatum* transcriptome. Green: the gene is present; red: the gene is absent.

(PDF)

Acknowledgments

We thank the anonymous reviewers for the constructive criticism that improved the manuscript. We would like to thank Jennifer Coston-Guarini for improvement of the manuscript. This research was supported by Agence Nationale de la Recherche and the European network ASSEMBLE.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HE. Performed the experiments: SO SB MRB YL. Analyzed the data: SO HE. Contributed reagents/materials/analysis tools: SO MRB YL. Wrote the paper: SO SB HE.

References

- Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H (2006) Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439: 965–968.
- Schubert M, Escriva H, Xavier-Neto J, Laudet V (2006) Amphioxus and tunicates as evolutionary model systems. *Trends Ecol Evol* 21: 269–277.
- Bertrand S, Escriva H (2011) Evolutionary crossroads in developmental biology: amphioxus. *Development* 138: 4819–4830.
- Dehal P, Boore JL (2005) Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol* 3: e314.
- Kuraku S, Meyer A, Kuratani S (2009) Timing of genome duplications relative to the origin of the vertebrates: did cyclostomes diverge before or after? *Mol Biol Evol* 26: 47–59.
- Canestro C, Albalat R, Hjeltnqvist I, Godoy L, Jorntvall H, et al. (2002) Ascidian and amphioxus Adh genes correlate functional and molecular features of the ADH family expansion during vertebrate evolution. *J Mol Evol* 54: 81–89.
- Nohara M, Nishida M, Manthacitra V, Nishikawa T (2004) Ancient phylogenetic separation between Pacific and Atlantic cephalochordates as revealed by mitochondrial genome analysis. *Zool Sci* 21: 203–210.
- Somorjai I, Bertrand S, Camasses A, Haguenaer A, Escriva H (2008) Evidence for stasis and not genetic piracy in developmental expression patterns of *Branchiostoma lanceolatum* and *Branchiostoma floridae*, two amphioxus species that have evolved independently over the course of 200 Myr. *Dev Genes Evol* 218: 703–713.
- Holland LZ, Albalat R, Azumi K, Benito-Gutierrez E, Blow MJ, et al. (2008) The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res* 18: 1100–1111.
- Putnam NH, Butts T, Ferrier DE, Furlong RF, Hellsten U, et al. (2008) The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453: 1064–1071.
- Yu JK, Wang MC, Shin IT, Kohara Y, Holland LZ, et al. (2008) A cDNA resource for the cephalochordate amphioxus *Branchiostoma floridae*. *Dev Genes Evol* 218: 723–727.
- Jin P, Ji X, Wang H, Li-Ling J, Ma F (2010) AmphiEST: Enabling comparative analysis of ESTs from five developmental stages of amphioxus. *Mar Genomics* 3: 151–155.
- Fuentes M, Benito E, Bertrand S, Paris M, Mignardot A, et al. (2007) Insights into spawning behavior and development of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308: 484–493.
- Fuentes M, Schubert M, Dalfó D, Candiani S, Benito E, et al. (2004) Preliminary observations on the spawning conditions of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) in captivity. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 302: 384–391.
- Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, et al. (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* 36: 3420–3435.
- Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, et al. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674–3676.
- Takatori N, Butts T, Candiani S, Pestarino M, Ferrier DE, et al. (2008) Comprehensive survey and classification of homeobox genes in the genome of amphioxus, *Branchiostoma floridae*. *Dev Genes Evol* 218: 579–590.
- Yu JK, Mazet F, Chen YT, Huang SW, Jung KC, et al. (2008) The Fox genes of *Branchiostoma floridae*. *Dev Genes Evol* 218: 629–638.
- Schubert M, Brunet F, Paris M, Bertrand S, Benoit G, et al. (2008) Nuclear hormone receptor signaling in amphioxus. *Dev Genes Evol* 218: 651–665.
- Langlois MC, Vanacker JM, Holland ND, Escriva H, Queva C, et al. (2000) Amphicoupl-1F, a nuclear orphan receptor of the lancelet *Branchiostoma floridae*, is implicated in retinoic acid signalling pathways. *Dev Genes Evol* 210: 471–482.
- Bertrand S, Camasses A, Somorjai I, Belgacem MR, Chabrol O, et al. (2011) Amphioxus FGF signaling predicts the acquisition of vertebrate morphological traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9160–9165.
- The Gene Ontology Consortium (2004) The Gene Ontology Consortium: The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res* 32: D258–261.
- The Gene Ontology Consortium (2008) The Gene Ontology Consortium: The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Res* 36: D440–444.
- Coppe A, Pujolar JM, Maes GE, Larsen PF, Hansen MM, et al. (2010) Sequencing, de novo annotation and analysis of the first *Anguilla anguilla* transcriptome: EelBase opens new perspectives for the study of the critically endangered European eel. *BMC Genomics* 11: 635.
- Salem M, Rexroad CE III, Wang J, Thorgaard GH, Yao J (2010) Characterization of the rainbow trout transcriptome using Sanger and 454-pyrosequencing approaches. *BMC Genomics* 11: 564.
- Fraser BA, Weadick CJ, Janowitz I, Rodd FH, Hughes KA (2011) Sequencing and characterization of the guppy (*Poecilia reticulata*) transcriptome. *BMC Genomics* 12: 202.

BIBLIOGRAPHIE

- Amaya, E., Musci, T. J. and Kirschner, M. W.** (1991). Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **66**, 257-70.
- Amaya, E., Stein, P. A., Musci, T. J. and Kirschner, M. W.** (1993). FGF signalling in the early specification of mesoderm in *Xenopus*. *Development* **118**, 477-87.
- Bachiller, D., Klingensmith, J., Kemp, C., Belo, J. A., Anderson, R. M., May, S. R., McMahon, J. A., McMahon, A. P., Harland, R. M., Rossant, J. et al.** (2000). The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* **403**, 658-61.
- Baker, J. C., Beddington, R. S. and Harland, R. M.** (1999). Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits bmp4 expression and activates neural development. *Genes Dev* **13**, 3149-59.
- Balemans, W. and Van Hul, W.** (2002). Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* **250**, 231-50.
- Barnett, M. W., Old, R. W. and Jones, E. A.** (1998). Neural induction and patterning by fibroblast growth factor, notochord and somite tissue in *Xenopus*. *Dev Growth Differ* **40**, 47-57.
- Bayramov, A. V., Eroshkin, F. M., Martynova, N. Y., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A. and Zaraksky, A. G.** (2011). Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling. *Development* **138**, 5345-56.
- Benito-Gutierrez, E., Illas, M., Comella, J. X. and Garcia-Fernandez, J.** (2005). Outlining the nascent nervous system of *Branchiostoma floridae* (amphioxus) by the pan-neural marker *AmphiElav*. *Brain Res Bull* **66**, 518-21.
- Benito-Gutierrez, E., Weber, H., Bryant, D. V. and Arendt, D.** (2013). Methods for generating year-round access to amphioxus in the laboratory. *PLoS One* **8**, e71599.
- Bertrand, S., Belgacem, M. R. and Escriva, H.** (2011a). Nuclear hormone receptors in chordates. *Mol Cell Endocrinol* **334**, 67-75.
- Bertrand, S., Camasses, A. and Escriva, H.** (2007). L'amphioxus ou comment devient-on un vertébré. *J Soc Biol* **201**, 51-7.
- Bertrand, S., Camasses, A., Somorjai, I., Belgacem, M. R., Chabrol, O., Escande, M. L., Pontarotti, P. and Escriva, H.** (2011b). Amphioxus FGF signaling predicts the acquisition of vertebrate morphological traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9160-5.
- Bertrand, S. and Escriva, H.** (2011). Evolutionary crossroads in developmental biology: amphioxus. *Development* **138**, 4819-30.
- Bertrand, V., Hudson, C., Caillol, D., Popovici, C. and Lemaire, P.** (2003). Neural tissue in ascidian embryos is induced by FGF9/16/20, acting via a combination of maternal GATA and Ets transcription factors. *Cell* **115**, 615-27.
- Birsoy, B., Kofron, M., Schaible, K., Wylie, C. and Heasman, J.** (2006). Vg 1 is an essential signaling molecule in *Xenopus* development. *Development* **133**, 15-20.
- Blum, M., Gaunt, S. J., Cho, K. W., Steinbeisser, H., Blumberg, B., Bittner, D. and De Robertis, E. M.** (1992). Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene *gooseoid*. *Cell* **69**, 1097-106.
- Boore, J. L., Daehler, L. L. and Brown, W. M.** (1999). Complete sequence, gene arrangement, and genetic code of mitochondrial DNA of the cephalochordate *Branchiostoma floridae* (Amphioxus). *Mol Biol Evol* **16**, 410-8.
- Bottcher, R. T. and Niehrs, C.** (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev* **26**, 63-77.
- Bourlat, S. J., Juliusdottir, T., Lowe, C. J., Freeman, R., Aronowicz, J., Kirschner, M., Lander, E. S., Thorndyke, M., Nakano, H., Kohn, A. B. et al.** (2006). Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida. *Nature* **444**, 85-8.
- Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M.** (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* **382**, 595-601.
- Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J. and Nohe, A.** (2011). Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal* **23**, 609-20.

- Cancre, I., Van Wormhoudt, A. and le Gal, Y.** (1999). Heparin-binding molecules with growth factor activities in regenerating-tissues of the starfish *Asterias rubens*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **123**, 285-92.
- Candiani, S., Castagnola, P., Oliveri, D. and Pestarino, M.** (2002). Cloning and developmental expression of *AmphiBrn1/2/4*, a POU III gene in amphioxus. *Mech Dev* **116**, 231-4.
- Cerfontaine, P.** (1906). Recherches sur le development de l'amphioxus. *Arch. Biol.* **22**.
- Chandramore, K., Ito, Y., Takahashi, S., Asashima, M. and Ghaskadbi, S.** (2010). Cloning of *noggin* gene from hydra and analysis of its functional conservation using *Xenopus laevis* embryos. *Evol Dev* **12**, 267-74.
- Chang, C. and Harland, R. M.** (2007). Neural induction requires continued suppression of both *Smad1* and *Smad2* signals during gastrulation. *Development* **134**, 3861-72.
- Christiaen, L., Stolfi, A. and Levine, M.** (2010). BMP signaling coordinates gene expression and cell migration during precardiac mesoderm development. *Dev Biol* **340**, 179-87.
- Ciruna, B. G., Schwartz, L., Harpal, K., Yamaguchi, T. P. and Rossant, J.** (1997). Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (*Fgfr1*) function: a role for *FGFR1* in morphogenetic movement through the primitive streak. *Development* **124**, 2829-41.
- Cole, A. G. and Meinertzhagen, I. A.** (2004). The central nervous system of the ascidian larva: mitotic history of cells forming the neural tube in late embryonic *Ciona intestinalis*. *Dev Biol* **271**, 239-62.
- Conklin, E. G.** (1932). The embryology of amphioxus. *J. Morphol.* **45**, 69-151.
- Costa, O. G.** (1834). Cenni zoologici, ossia descrizione somaria delle specie nuove di animali scoperti in diverse contrade del regno nell'anno 1834. In *Annuario Zoologico*, Vol. 12, pp. 49-50. Napoli, Italy: Tipografia di Azzolino e Comp.
- Cox, W. G. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1995). Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development* **121**, 4349-58.
- D'Aniello, S., Irimia, M., Maeso, I., Pascual-Anaya, J., Jimenez-Delgado, S., Bertrand, S. and Garcia-Fernandez, J.** (2008). Gene expansion and retention leads to a diverse tyrosine kinase superfamily in amphioxus. *Mol Biol Evol* **25**, 1841-54.
- da Silva, L. F. B., Tavares, M. and Soares-Gomes, A.** (2008). Population structure of the lancelet *Branchiostoma caribaeum* (Cephalochordata: Branchiostomidae) in the Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, southeastern Brazil. *Rev. Bras. Zool.* **25**, 617-623.
- DaCosta Byfield, S., Major, C., Laping, N. J. and Roberts, A. B.** (2004). SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors *ALK4*, *ALK5*, and *ALK7*. *Mol Pharmacol* **65**, 744-52.
- Darras, S. and Nishida, H.** (2001a). The BMP signaling pathway is required together with the FGF pathway for notochord induction in the ascidian embryo. *Development* **128**, 2629-38.
- Darras, S. and Nishida, H.** (2001b). The BMP/CHORDIN antagonism controls sensory pigment cell specification and differentiation in the ascidian embryo. *Dev Biol* **236**, 271-88.
- De Robertis, E. M.** (2008). Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell*, 185-195.
- De Robertis, E. M. and Kuroda, H.** (2004). Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 285-308.
- Dehal, P. and Boore, J. L.** (2005). Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol* **3**, e314.
- Delaune, E., Lemaire, P. and Kodjabachian, L.** (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development* **132**, 299-310.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D. and Philippe, H.** (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* **439**, 965-8.
- Delsuc, F., Tsagkogeorga, G., Lartillot, N. and Philippe, H.** (2008). Additional molecular support for the new chordate phylogeny. *Genesis* **46**, 592-604.
- Deng, C. X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M. M., Daugherty, C., Ornitz, D. M. and Leder, P.** (1994). Murine *FGFR-1* is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev* **8**, 3045-57.
- Derynck, R. and Zhang, Y. E.** (2003). *Smad*-dependent and *Smad*-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-84.
- Desdevises, Y., Maillet, V., Fuentes, M. and Escriva, H.** (2011). A snapshot of the population structure of *Branchiostoma lanceolatum* in the Racou beach, France, during its spawning season. *PLoS One* **6**, e18520.

- Di-Gregorio, A., Sancho, M., Stuckey, D. W., Crompton, L. A., Godwin, J., Mishina, Y. and Rodriguez, T. A.** (2007). BMP signalling inhibits premature neural differentiation in the mouse embryo. *Development* **134**, 3359-69.
- Fainsod, A., Deissler, K., Yelin, R., Marom, K., Epstein, M., Pillemer, G., Steinbeisser, H. and Blum, M.** (1997). The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech Dev* **63**, 39-50.
- Fainsod, A., Steinbeisser, H. and De Robertis, E. M.** (1994). On the function of BMP-4 in patterning the marginal zone of the *Xenopus* embryo. *Embo J* **13**, 5015-25.
- Ferguson, E. L. and Anderson, K. V.** (1992). Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* **71**, 451-61.
- Francois, V. and Bier, E.** (1995). *Xenopus* chordin and *Drosophila* short gastrulation genes encode homologous proteins functioning in dorsal-ventral axis formation. *Cell* **80**, 19-20.
- Fuentes, M., Benito, E., Bertrand, S., Paris, M., Mignardot, A., Godoy, L., Jimenez-Delgado, S., Oliveri, D., Candiani, S., Hirsinger, E. et al.** (2007). Insights into spawning behavior and development of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **308**, 484-93.
- Fuentes, M., Schubert, M., Dalfo, D., Candiani, S., Benito, E., Gardenyes, J., Godoy, L., Moret, F., Illas, M., Patten, I. et al.** (2004). Preliminary observations on the spawning conditions of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) in captivity. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **302**, 384-91.
- Furthauer, M., Thisse, B. and Thisse, C.** (1999). Three different noggin genes antagonize the activity of bone morphogenetic proteins in the zebrafish embryo. *Dev Biol* **214**, 181-96.
- Furthauer, M., Van Celst, J., Thisse, C. and Thisse, B.** (2004). Fgf signalling controls the dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* **131**, 2853-64.
- Futch, C. R. a. D., S. E.** (1977). Nearshore marine ecology at Hutchinson Island, Florida: 1971-1974: IV. lancelets and fishes. *Fla. Mer. Res. Publ.* **24**, 1-23.
- Garcia-Fernandez, J. and Benito-Gutierrez, E.** (2009). It's a long way from amphioxus: descendants of the earliest chordate. *Bioessays* **31**, 665-75.
- Gazzerro, E. and Canalis, E.** (2006). Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* **7**, 51-65.
- Godsave, S. F. and Slack, J. M.** (1989). Clonal analysis of mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **134**, 486-90.
- Gosselck, F. a. S., P.** (1979). Age structure, growth and weight of *Branchiostoma senegalense* (Acrania, Branchiostomidae) off North-West Africa. *Int. Revue Ges. Hydrobiol.* **64**, 541-550.
- Gostling, N. J. and Shimeld, S. M.** (2003). Protochordate Zic genes define primitive somite compartments and highlight molecular changes underlying neural crest evolution. *Evol Dev* **5**, 136-44.
- Goto, K., Kamiya, Y., Imamura, T., Miyazono, K. and Miyazawa, K.** (2007). Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem* **282**, 20603-11.
- Griffin, K., Patient, R. and Holder, N.** (1995). Analysis of FGF function in normal and no tail zebrafish embryos reveals separate mechanisms for formation of the trunk and the tail. *Development* **121**, 2983-94.
- Grunz, H. and Tacke, L.** (1989). Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer. *Cell Differ Dev* **28**, 211-7.
- Grunz, H. and Tacke, L.** (1990). Extracellular matrix components prevent neural differentiation of disaggregated *Xenopus* ectoderm cells. *Cell Differ Dev* **32**, 117-23.
- Gurdon, J. B.** (1987). Embryonic induction - molecular prospects. *Development* **99**, 285-306.
- Hammerschmidt, M., Serbedzija, G. N. and McMahon, A. P.** (1996). Genetic analysis of dorsoventral pattern formation in the zebrafish: requirement of a BMP-like ventralizing activity and its dorsal repressor. *Genes Dev* **10**, 2452-61.
- Hansen, C. S., Marion, C. D., Steele, K., George, S. and Smith, W. C.** (1997). Direct neural induction and selective inhibition of mesoderm and epidermis inducers by Xnr3. *Development* **124**, 483-92.
- Hanyu, A., Ishidou, Y., Ebisawa, T., Shimanuki, T., Imamura, T. and Miyazono, K.** (2001). The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *J Cell Biol* **155**, 1017-27.
- Hao, J., Ho, J. N., Lewis, J. A., Karim, K. A., Daniels, R. N., Gentry, P. R., Hopkins, C. R., Lindsley, C. W. and Hong, C. C.** (2009). In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors. *ACS Chem Biol* **5**, 245-53.

- Hata, A., Lagna, G., Massague, J. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* **12**, 186-97.
- Hatschek, B.** (1893). Amphioxus and its Development (translated by J. Tuckey). *Swan Sonnenschein and Co.*
- Hatta, K. and Takahashi, Y.** (1996). Secondary axis induction by heterospecific organizers in zebrafish. *Dev Dyn* **205**, 183-95.
- Hawley, S. H., Wunnenberg-Stapleton, K., Hashimoto, C., Laurent, M. N., Watabe, T., Blumberg, B. W. and Cho, K. W.** (1995). Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction. *Genes Dev* **9**, 2923-35.
- Heeg-Truesdell, E. and LaBonne, C.** (2006). Neural induction in *Xenopus* requires inhibition of Wnt-beta-catenin signaling. *Dev Biol* **298**, 71-86.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G. and Melton, D. A.** (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* **77**, 283-95.
- Hemmati-Brivanlou, A. and Melton, D.** (1997). Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise. *Cell* **88**, 13-7.
- Hemmati-Brivanlou, A. and Melton, D. A.** (1994). Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in *Xenopus*. *Cell* **77**, 273-81.
- Hemmati-Brivanlou, A. and Thomsen, G. H.** (1995). Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. *Dev Genet* **17**, 78-89.
- Hild, M., Dick, A., Rauch, G. J., Meier, A., Bouwmeester, T., Haffter, P. and Hammerschmidt, M.** (1999). The smad5 mutation somitabun blocks Bmp2b signaling during early dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* **126**, 2149-59.
- Holland, L. Z. and Onai, T.** (2012). Early development of cephalochordates (amphioxus). *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**, 167-83.
- Holland, L. Z., Schubert, M., Holland, N. D. and Neuman, T.** (2000). Evolutionary conservation of the presumptive neural plate markers *AmphiSox1/2/3* and *AmphiNeurogenin* in the invertebrate chordate amphioxus. *Dev Biol* **226**, 18-33.
- Holland, L. Z., Schubert, M., Kozmik, Z. and Holland, N. D.** (1999). *AmphiPax3/7*, an amphioxus paired box gene: insights into chordate myogenesis, neurogenesis, and the possible evolutionary precursor of definitive vertebrate neural crest. *Evol Dev* **1**, 153-65.
- Holland, N. D. and Holland, L. Z.** (2010). Laboratory spawning and development of the Bahama lancelet, *Asymmetron lucayanum* (cephalochordata): fertilization through feeding larvae. *Biol Bull* **219**, 132-41.
- Holland, N. D., Panganiban, G., Henyey, E. L. and Holland, L. Z.** (1996). Sequence and developmental expression of *AmphiDll*, an amphioxus *Distal-less* gene transcribed in the ectoderm, epidermis and nervous system: insights into evolution of craniate forebrain and neural crest. *Development* **122**, 2911-20.
- Holowacz, T. and Sokol, S.** (1999). FGF is required for posterior neural patterning but not for neural induction. *Dev Biol* **205**, 296-308.
- Holtfreter, J. and Hamburger, V.** (1955). Amphibians. In *Analysis of Development*. pp. 230-296.
- Hongo, I., Kengaku, M. and Okamoto, H.** (1999). FGF signaling and the anterior neural induction in *Xenopus*. *Dev Biol* **216**, 561-81.
- Hudson, C., Darras, S., Caillol, D., Yasuo, H. and Lemaire, P.** (2003). A conserved role for the MEK signalling pathway in neural tissue specification and posteriorisation in the invertebrate chordate, the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development* **130**, 147-59.
- Hudson, C. and Lemaire, P.** (2001). Induction of anterior neural fates in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mech Dev* **100**, 189-203.
- Hufton, A. L., Groth, D., Vingron, M., Lehrach, H., Poustka, A. J. and Panopoulou, G.** (2008). Early vertebrate whole genome duplications were predated by a period of intense genome rearrangement. *Genome Res* **18**, 1582-91.
- Hunt, T. E.** (1929). Hensen's node as an organizer in the formation of the chick embryo. *Anat. Rec.* **22**.
- Isaacs, H. V.** (1997a). New perspectives on the role of the fibroblast growth factor family in amphibian development. *Cell Mol Life Sci* **53**, 350-61.
- Isaacs, H. V.** (1997b). New perspectives on the role of the fibroblast growth factor family in amphibian development. *Cell Mol Life Sci* **53(4)**, 350-61.

- Isaacs, H. V., Pownall, M. E. and Slack, J. M. (1994). eFGF regulates Xbra expression during *Xenopus* gastrulation. *Embo J* **13**, 4469-81.
- Ishisaki, A., Yamato, K., Hashimoto, S., Nakao, A., Tamaki, K., Nonaka, K., ten Dijke, P., Sugino, H. and Nishihara, T. (1999). Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *J Biol Chem* **274**, 13637-42.
- Jaillon, O., Aury, J. M., Brunet, F., Petit, J. L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A. et al. (2004). Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* **431**, 946-57.
- Jeffery, W. R., Strickler, A. G. and Yamamoto, Y. (2004). Migratory neural crest-like cells form body pigmentation in a urochordate embryo. *Nature* **431**, 696-9.
- Karabinos, A., Wang, J., Wenzel, D., Panopoulou, G., Lehrach, H. and Weber, K. (2001). Developmentally controlled expression patterns of intermediate filament proteins in the cephalochordate *Branchiostoma*. *Mech Dev* **101**, 283-8.
- Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H. and Wrana, J. L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* **6**, 1365-75.
- Kengaku, M. and Okamoto, H. (1993). Basic fibroblast growth factor induces differentiation of neural tube and neural crest lineages of cultured ectoderm cells from *Xenopus* gastrula. *Development* **119**, 1067-78.
- Kengaku, M. and Okamoto, H. (1995). bFGF as a possible morphogen for the anteroposterior axis of the central nervous system in *Xenopus*. *Development* **121**, 3121-30.
- Kenny, A. P., Oleksyn, D. W., Newman, L. A., Angerer, R. C. and Angerer, L. M. (2003). Tight regulation of SpSoxB factors is required for patterning and morphogenesis in sea urchin embryos. *Dev Biol* **261**, 412-25.
- Khokha, M. K., Yeh, J., Grammer, T. C. and Harland, R. M. (2005). Depletion of three BMP antagonists from Spemann's organizer leads to a catastrophic loss of dorsal structures. *Dev Cell* **8**, 401-11.
- Kintner, C. R. and Dodd, J. (1991). Hensen's node induces neural tissue in *Xenopus* ectoderm. Implications for the action of the organizer in neural induction. *Development* **113**, 1495-505.
- Kishi, M., Mizuseki, K., Sasai, N., Yamazaki, H., Shiota, K., Nakanishi, S. and Sasai, Y. (2000). Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* **127**, 791-800.
- Knoetgen, H., Viebahn, C. and Kessel, M. (1999). Head induction in the chick by primitive endoderm of mammalian, but not avian origin. *Development* **126**, 815-25.
- Kon, T., Nohara, M., Yamanoue, Y., Fujiwara, Y., Nishida, M. and Nishikawa, T. (2007). Phylogenetic position of a whale-fall lancelet (Cephalochordata) inferred from whole mitochondrial genome sequences. *BMC Evol Biol* **7**, 127.
- Koshida, S., Shinya, M., Nikaido, M., Ueno, N., Schulte-Merker, S., Kuroiwa, A. and Takeda, H. (2002). Inhibition of BMP activity by the FGF signal promotes posterior neural development in zebrafish. *Dev Biol* **244**, 9-20.
- Kowalevsky, A. (1867). Entwicklungsgeschichte des *Amphioxus lanceolatus*. *Mem. Acad. Imp. Sci. St-Petersb* **11**, 1-17.
- Kowalevsky, A. (1876). Weitere studienuber die entwicklungsgeschichte des *Amphioxus lanceolatus*, etc. *Arch. F. Mik. Anat.*, 13.
- Kozmikova, I., Candiani, S., Fabian, P., Gurska, D. and Kozmik, Z. (2013). Essential role of Bmp signaling and its positive feedback loop in the early cell fate evolution of chordates. *Dev Biol* **382**, 538-54.
- Kretschmar, M., Doody, J. and Massague, J. (1997). Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* **389**, 618-22.
- Kroll, K. L. and Amaya, E. (1996). Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* **122**, 3173-83.
- Kudoh, T., Concha, M. L., Houart, C., Dawid, I. B. and Wilson, S. W. (2004). Combinatorial Fgf and Bmp signalling patterns the gastrula ectoderm into prospective neural and epidermal domains. *Development* **131**, 3581-92.
- Kuroda, H., Fuentealba, L., Ikeda, A., Reversade, B. and De Robertis, E. M. (2005). Default neural induction: neuralization of dissociated *Xenopus* cells is mediated by Ras/MAPK activation. *Genes Dev* **19**, 1022-7.
- Lai, C. J., Ekker, S. C., Beachy, P. A. and Moon, R. T. (1995). Patterning of the neural ectoderm of *Xenopus laevis* by the amino-terminal product of hedgehog autoproteolytic cleavage. *Development* **121**, 2349-60.

- Lamb, T. M., Knecht, A. K., Smith, W. C., Stachel, S. E., Economides, A. N., Stahl, N., Yancopoulos, G. D. and Harland, R. M.** (1993). Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* **262**, 713-8.
- Langeland, J. A., Tomsa, J. M., Jackman, W. R., Jr. and Kimmel, C. B.** (1998). An amphioxus snail gene: expression in paraxial mesoderm and neural plate suggests a conserved role in patterning the chordate embryo. *Dev Genes Evol* **208**, 569-77.
- Lanner, F. and Rossant, J.** (2010). The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* **137**, 3351-60.
- Lapraz, F., Besnardeau, L. and Lepage, T.** (2009). Patterning of the dorsal-ventral axis in echinoderms: insights into the evolution of the BMP-chordin signaling network. *PLoS Biol* **7**, e1000248.
- Larabell, C. A., Torres, M., Rowning, B. A., Yost, C., Miller, J. R., Wu, M., Kimelman, D. and Moon, R. T.** (1997). Establishment of the dorso-ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in beta-catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *J Cell Biol* **136**, 1123-36.
- Launay, C., Fromentoux, V., Shi, D. L. and Boucaut, J. C.** (1996). A truncated FGF receptor blocks neural induction by endogenous *Xenopus* inducers. *Development* **122**, 869-80.
- Le Gouar, M., Guillou, A. and Vervoort, M.** (2004). Expression of a SoxB and a Wnt2/13 gene during the development of the mollusc *Patella vulgata*. *Dev Genes Evol* **214**, 250-6.
- Le Petillon, Y., Oulion, S., Escande, M. L., Escriva, H. and Bertrand, S.** (2013). Identification and expression analysis of BMP signaling inhibitors genes of the DAN family in amphioxus. *Gene Expr Patterns* **13**, 377-83.
- Lewis, W. H.** (1907). Transplantation of the lips of the blastopore in *Rana pipiens*. *Am. J. anat.* **7**, 137-141.
- Li, G., Shu, Z. and Wang, Y.** (2013). Year-round reproduction and induced spawning of Chinese amphioxus, *Branchiostoma belcheri*, in laboratory. *PLoS One* **8**, e75461.
- Linker, C., De Almeida, I., Papanayotou, C., Stower, M., Sabado, V., Ghorani, E., Streit, A., Mayor, R. and Stern, C. D.** (2009). Cell communication with the neural plate is required for induction of neural markers by BMP inhibition: evidence for homeogenetic induction and implications for *Xenopus* animal cap and chick explant assays. *Dev Biol* **327**, 478-86.
- Linker, C. and Stern, C. D.** (2004). Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development* **131**, 5671-81.
- Long, J. A.** (1995). The rise of fishes: 500 million years of evolution. *Johns Hopkins University Press*
- Lowe, C. J., Wu, M., Salic, A., Evans, L., Lander, E., Stange-Thomann, N., Gruber, C. E., Gerhart, J. and Kirschner, M.** (2003). Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell* **113**, 853-65.
- Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B. and Smith, A. G.** (2006). Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol* **4**, e121.
- Lu, T. M., Luo, Y. J. and Yu, J. K.** (2012). BMP and Delta/Notch signaling control the development of amphioxus epidermal sensory neurons: insights into the evolution of the peripheral sensory system. *Development* **139**, 2020-30.
- Luther, W. H.** (1935). Entwicklungsphysiologische Untersuchungen am Forellenkeim: die Rolle des Organisationszentrums bei der Entstehung der Embryonalanlage. *Biol Zentralbl*, 114-137.
- Marchal, L., Luxardi, G., Thome, V. and Kodjabachian, L.** (2009). BMP inhibition initiates neural induction via FGF signaling and Zic genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17437-42.
- McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland, R. M. and McMahon, A. P.** (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* **12**, 1438-52.
- Meinertzhagen, I. A., Lemaire, P. and Okamura, Y.** (2004). The neurobiology of the ascidian tadpole larva: recent developments in an ancient chordate. *Annu Rev Neurosci* **27**, 453-85.
- Meulemans, D. and Bronner-Fraser, M.** (2002). Amphioxus and lamprey AP-2 genes: implications for neural crest evolution and migration patterns. *Development* **129**, 4953-62.
- Meulemans, D. and Bronner-Fraser, M.** (2007). The amphioxus SoxB family: implications for the evolution of vertebrate placodes. *Int J Biol Sci* **3**, 356-64.
- Meyer, A. and Schartl, M.** (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 699-704.

- Miller-Bertoglio, V. E., Fisher, S., Sanchez, A., Mullins, M. C. and Halpern, M. E.** (1997). Differential regulation of chordin expression domains in mutant zebrafish. *Dev Biol* **192**, 537-50.
- Min, T. H., Kriebel, M., Hou, S. and Pera, E. M.** The dual regulator Sufu integrates Hedgehog and Wnt signals in the early *Xenopus* embryo. *Dev Biol* **358**, 262-76.
- Miya, T., Morita, K., Suzuki, A., Ueno, N. and Satoh, N.** (1997). Functional analysis of an ascidian homologue of vertebrate Bmp-2/Bmp-4 suggests its role in the inhibition of neural fate specification. *Development* **124**, 5149-59.
- Mizutani, C. M. and Bier, E.** (2008). EvoD/Vo: the origins of BMP signalling in the neuroectoderm. *Nat Rev Genet* **9**, 663-77.
- Mohammadi, M., McMahon, G., Sun, L., Tang, C., Hirth, P., Yeh, B. K., Hubbard, S. R. and Schlessinger, J.** (1997). Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* **276**, 955-60.
- Moon, R. T.** (2005). Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE* **2005**, cm1.
- Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K. and Sugino, H.** (1990). Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* **247**, 836-8.
- Nishida, H.** (1987). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. *Dev Biol* **121**, 526-41.
- Nishida, H.** (1991). Induction of brain and sensory pigment cells in the ascidian embryo analyzed by experiments with isolated blastomeres. *Development*, 389-395
- Ohno, S.** (1970). Evolution by Gene Duplication. *Heidelberg, Germany: Springer-Verlag*.
- Ohta, K., Kuriyama, S., Okafuji, T., Gejima, R., Ohnuma, S. and Tanaka, H.** (2006). Tsukushi cooperates with VG1 to induce primitive streak and Hensen's node formation in the chick embryo. *Development* **133**, 3777-86.
- Okuda, Y., Yoda, H., Uchikawa, M., Furutani-Seiki, M., Takeda, H., Kondoh, H. and Kamachi, Y.** (2006). Comparative genomic and expression analysis of group B1 sox genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution. *Dev Dyn* **235**, 811-25.
- Onai, T., Lin, H. C., Schubert, M., Koop, D., Osborne, P. W., Alvarez, S., Alvarez, R., Holland, N. D. and Holland, L. Z.** (2009). Retinoic acid and Wnt/beta-catenin have complementary roles in anterior/posterior patterning embryos of the basal chordate amphioxus. *Dev Biol* **332**, 223-33.
- Onai, T., Yu, J. K., Blitz, I. L., Cho, K. W. and Holland, L. Z.** (2010). Opposing Nodal/Vg1 and BMP signals mediate axial patterning in embryos of the basal chordate amphioxus. *Dev Biol* **344**, 377-89.
- Oppenheimer, J. M.** (1936a). Structures developed in amphibians by implantation of living fish organizer *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 461-463.
- Oppenheimer, J. M.** (1936b). Transplantation experiments on developing teleosts (*Fundulus* and *Perca*). *J. Exp. Zool.*, 409-437.
- Ornitz, D. M. and Leder, P.** (1992). Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. *J Biol Chem* **267**, 16305-11.
- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G. and Goldfarb, M.** (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* **271**, 15292-7.
- Oulion, S., Bertrand, S. and Escriva, H.** (2012). Evolution of the FGF Gene Family. *Int J Evol Biol* **2012**, 298147.
- Pallas, P. S.** (1774). *Limax lanceolatus*. p. 19 + Plate I. In *Spicilegia zoologica*, Vol. I (Quadrupedum, avium, amphibiorum, piscium, insectorum, molluscorum, aliorumque marinorum). Fascicle 10 (quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus atque comentariis illustrantur cura P. S. Pallas). Berlin, Germany: G. A. Lange.
- Panopoulou, G. D., Clark, M. D., Holland, L. Z., Lehrach, H. and Holland, N. D.** (1998). AmphibMP2/4, an amphioxus bone morphogenetic protein closely related to *Drosophila* decapentaplegic and vertebrate BMP2 and BMP4: insights into evolution of dorsoventral axis specification. *Dev Dyn* **213**, 130-9.
- Paps, J., Holland, P. W. and Shimeld, S. M.** (2012). A genome-wide view of transcription factor gene diversity in chordate evolution: less gene loss in amphioxus? *Brief Funct Genomics* **11**, 177-86.
- Patthey, C. and Gunhaga, L.** (2013). Signaling pathways regulating ectodermal cell fate choices. *Exp Cell Res* **321**, 11-6.

- Pavlicek, J., Sauzet, S., Besseau, L., Coon, S. L., Weller, J. L., Boeuf, G., Gaildrat, P., Omelchenko, M. V., Koonin, E. V., Falcon, J. et al. (2010). Evolution of AANAT: expansion of the gene family in the cephalochordate amphioxus. *BMC Evol Biol* **10**, 154.
- Penzel, R., Oswald, R., Chen, Y., Tacke, L. and Grunz, H. (1997). Characterization and early embryonic expression of a neural specific transcription factor xSOX3 in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* **41**, 667-77.
- Pera, E. M., Ikeda, A., Eivers, E. and De Robertis, E. M. (2003). Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev* **17**, 3023-8.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T. and De Robertis, E. M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**, 707-10.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**, 589-98.
- Poss, S. G. a. B., H. T. (1996). Lancelets (Cephalochordata: Branchiostomatidae): how many species are valid? *Israel J. Zool.* **42** Suppl., 13-66.
- Putnam, N. H., Butts, T., Ferrier, D. E., Furlong, R. F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J. K. et al. (2008). The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* **453**, 1064-71.
- Qiao, Y., Zhu, Y., Sheng, N., Chen, J., Tao, R., Zhu, Q., Zhang, T., Qian, C. and Jing, N. (2012). AP2gamma regulates neural and epidermal development downstream of the BMP pathway at early stages of ectodermal patterning. *Cell Res* **22**, 1546-61.
- Rentzsch, F., Bakkers, J., Kramer, C. and Hammerschmidt, M. (2004). Fgf signaling induces posterior neuroectoderm independently of Bmp signaling inhibition. *Dev Dyn* **231**, 750-7.
- Rex, M., Orme, A., Uwanogho, D., Tointon, K., Wigmore, P. M., Sharpe, P. T. and Scotting, P. J. (1997). Dynamic expression of chicken Sox2 and Sox3 genes in ectoderm induced to form neural tissue. *Dev Dyn* **209**, 323-32.
- Rhinn, M., Picker, A. and Brand, M. (2006). Global and local mechanisms of forebrain and midbrain patterning. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 5-12.
- Ribisi, S., Jr., Mariani, F. V., Aamar, E., Lamb, T. M., Frank, D. and Harland, R. M. (2000). Ras-mediated FGF signaling is required for the formation of posterior but not anterior neural tissue in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **227**, 183-96.
- Richard-Parpaillon, L., Heligon, C., Chesnel, F., Boujard, D. and Philpott, A. (2002). The IGF pathway regulates head formation by inhibiting Wnt signaling in *Xenopus*. *Dev Biol* **244**, 407-17.
- Rogers, C. D., Archer, T. C., Cunningham, D. D., Grammer, T. C. and Casey, E. M. (2008). Sox3 expression is maintained by FGF signaling and restricted to the neural plate by Vent proteins in the *Xenopus* embryo. *Dev Biol* **313**, 307-19.
- Rogers, C. D., Moody, S. A. and Casey, E. S. (2009). Neural induction and factors that stabilize a neural fate. *Birth Defects Res C Embryo Today* **87**, 249-62.
- Sasai, Y., Lu, B., Piccolo, S. and De Robertis, E. M. (1996). Endoderm induction by the organizer-secreted factors chordin and noggin in *Xenopus* animal caps. *Embo J* **15**, 4547-55.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H. and De Robertis, E. M. (1995a). Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* **376**, 333-6.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H. and De Robertis, E. M. (1995b). Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* **377**, 757.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K. and De Robertis, E. M. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* **79**, 779-90.
- Sato, S. M. and Sargent, T. D. (1989). Development of neural inducing capacity in dissociated *Xenopus* embryos. *Dev Biol* **134**, 263-6.
- Satoh, G., Wang, Y., Zhang, P. and Satoh, N. (2001). Early development of amphioxus nervous system with special reference to segmental cell organization and putative sensory cell precursors: a study based on the expression of pan-neuronal marker gene *Hu/elav*. *J Exp Zool* **291**, 354-64.
- Satou, Y., Wada, S., Sasakura, Y. and Satoh, N. (2008). Regulatory genes in the ancestral chordate genomes. *Dev Genes Evol* **218**, 715-21.
- Schubert, M., Escrava, H., Xavier-Neto, J. and Laudet, V. (2006). Amphioxus and tunicates as evolutionary model systems. *Trends Ecol Evol* **21**, 269-77.

- Schubert, M., Holland, L. Z., Stokes, M. D. and Holland, N. D.** (2001). Three amphioxus Wnt genes (AmphiWnt3, AmphiWnt5, and AmphiWnt6) associated with the tail bud: the evolution of somitogenesis in chordates. *Dev Biol* **240**, 262-73.
- Schubert, M., Holland, N. D. and Holland, L. Z.** (1998). Amphioxus AmphiDRAL encoding a LIM-domain protein: expression in the epidermis but not in the presumptive neuroectoderm. *Mech Dev* **76**, 203-5.
- Schulte-Merker, S., Lee, K. J., McMahon, A. P. and Hammerschmidt, M.** (1997). The zebrafish organizer requires chordin. *Nature* **387**, 862-3.
- Shen, M. M.** (2007). Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* **134**, 1023-34.
- Sheng, G., dos Reis, M. and Stern, C. D.** (2003). Churchill, a zinc finger transcriptional activator, regulates the transition between gastrulation and neurulation. *Cell* **115**, 603-13.
- Shinzato, C., Iguchi, A., Hayward, D. C., Technau, U., Ball, E. E. and Miller, D. J.** (2008). Sox genes in the coral *Acropora millepora*: divergent expression patterns reflect differences in developmental mechanisms within the Anthozoa. *BMC Evol Biol* **8**, 311.
- Smith, W. C. and Harland, R. M.** (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* **70**, 829-40.
- Sokol, S. Y.** (1999). Wnt signaling and dorso-ventral axis specification in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 405-10.
- Spemann, H.** (1938). *Embryonic Development and Induction* Yale University Press, New Haven, Conn (reprinted by Hafner publishing company, 1962).
- Spemann, H. and Mangold, H.** (1924). Induction of embryonic primordial by implantation of organizers from a different species. *Roux's Arch. Entw. Mech.*, 599–638 (reprinted and translated in *Int. J. Dev. Biol.* (2001) **45**, 13–31).
- Steinbeisser, H., De Robertis, E. M., Ku, M., Kessler, D. S. and Melton, D. A.** (1993). *Xenopus* axis formation: induction of goosecoid by injected Xwnt-8 and activin mRNAs. *Development* **118**, 499-507.
- Stern, C. D.** (2005). Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development* **132**, 2007-21.
- Streit, A., Berliner, A. J., Papanayotou, C., Sirulnik, A. and Stern, C. D.** (2000). Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* **406**, 74-8.
- Streit, A., Lee, K. J., Woo, I., Roberts, C., Jessell, T. M. and Stern, C. D.** (1998). Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick embryo. *Development* **125**, 507-19.
- Streit, A. and Stern, C. D.** (1999a). Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity. *Mech Dev* **82**, 51-66.
- Streit, A. and Stern, C. D.** (1999b). Mesoderm patterning and somite formation during node regression: differential effects of chordin and noggin. *Mech Dev* **85**, 85-96.
- Sun, X., Meyers, E. N., Lewandoski, M. and Martin, G. R.** (1999). Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* **13**, 1834-46.
- Sun, Y., Zhang, Q. J., Zhong, J. and Wang, Y. Q.** (2010). Characterization and expression of AmphiBMP3 /3b gene in amphioxus *Branchiostoma japonicum*. *Dev Growth Differ* **52**, 157-67.
- Suzuki, A., Kaneko, E., Ueno, N. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1997). Regulation of epidermal induction by BMP2 and BMP7 signaling. *Dev Biol* **189**, 112-22.
- Suzuki, A., Shioda, N., and Ueno, N.** (1995). Bone morphogenetic protein acts as a ventral mesoderm modifier in early *Xenopus* embryos. *Dev. Growth Differ.* **37**, 581–588.
- Suzuki, C., Murakami, G., Fukuchi, M., Shimanuki, T., Shikauchi, Y., Imamura, T., and Miyazono, K.** (2002). Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **277**, 39919–39925.
- Taylor, J. S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A. and Van de Peer, Y.** (2003). Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res* **13**, 382-90.
- Tung, T. C., Wu, S. C. and Tung, Y. F.** (1958). The development of isolated blastomeres of Amphioxus. *Sci Sin* **7**, 1280-320.
- Tung, T. C., Wu, S. C. and Tung, Y. Y.** (1962a). Experimental studies on the neural induction in amphioxus. *Scientia Sinica* **11**, 805-820.

- Tung, T. C., Wu, S. C. and Tung, Y. Y.** (1962b). The presumptive areas of the egg of amphioxus. *Scientia Sinica* **7**, 81-92.
- Wada, H., Garcia-Fernandez, J. and Holland, P. W.** (1999). Colinear and segmental expression of amphioxus Hox genes. *Dev Biol* **213**, 131-41.
- Waddington, C. H.** (1930). Developmental mechanics of chick and duck embryos. *Nature*, 924-925.
- Waddington, C. H.** (1932). Experiments on the development of chick and duck embryos cultivated in vitro. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 179-230.
- Waddington, C. H.** (1933). Induction by the primitive streak and its derivatives in the chick. *J. Exp. Biol.*, 38-48.
- Waddington, C. H.** (1934). Experiments on embryonic induction. *J. Exp. Biol.*, 211-227.
- Waddington, C. H.** (1936). Organizers in Mammalian Development. *Nature*, 125.
- Waddington, C. H.** (1937). Experiments on determination in the rabbit embryo. *Arch. Biol.*, 273-290.
- Wagner, E. and Levine, M.** (2012). FGF signaling establishes the anterior border of the Ciona neural tube. *Development* **139**, 2351-9.
- Wawersik, S., Evola, C. and Whitman, M.** (2005). Conditional BMP inhibition in *Xenopus* reveals stage-specific roles for BMPs in neural and neural crest induction. *Dev Biol* **277**, 425-42.
- Webb, J. E.** (1956a). A note on the lancelets of Singapore, with a description of a new species of Branchiostoma. *Proc. Zool. Soc. Lond.* **127**, 119-123.
- Webb, J. E.** (1956b). On the populations of Branchiostoma lanceolatum and their relations with the West African lancelets. *Proc. Zool. Soc. Lond.* **127**, 125-140.
- Webb, J. E. a. H., M. B.** (1958). The ecology of Lagos lagoon. IV. On the reactions of Branchiostoma nigeriense Webb to its environment. *Philos. Trans. Royal Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **241**, 355-391.
- Wilson, E. B.** (1892). On multiple and partial development in amphioxus. *Anat. Anz* **7**.
- Wilson, E. B.** (1893). Amphioxus and the mosaic theory of development. *J. Morphol.* **8**, 379-638.
- Wilson, P. A. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* **376**, 331-3.
- Wilson, S. I. and Edlund, T.** (2001). Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1161-8.
- Wilson, S. I., Graziano, E., Harland, R., Jessell, T. M. and Edlund, T.** (2000). An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr Biol* **10**, 421-9.
- Winchell, C. J., Sullivan, J., Cameron, C. B., Swalla, B. J. and Mallatt, J.** (2002). Evaluating hypotheses of deuterostome phylogeny and chordate evolution with new LSU and SSU ribosomal DNA data. *Mol Biol Evol* **19**, 762-76.
- Xu, Q. S., Ma, F. and Wang, Y. Q.** (2005). Morphological and 12S rRNA gene comparison of two Branchiostoma species in Xiamen waters. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **304**, 259-67.
- Xu, R. H., Kim, J., Taira, M., Zhan, S., Sredni, D., and Kung, H.F.** (1995). A dominant-negative bone morphogenetic protein 4 receptor causes neuralization in *Xenopus* ectoderm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 212-219.
- Yabe, S., Tanegashima, K., Haramoto, Y., Takahashi, S., Fujii, T., Kozuma, S., Taketani, Y. and Asashima, M.** (2003). FRL-1, a member of the EGF-CFC family, is essential for neural differentiation in *Xenopus* early development. *Development* **130**, 2071-81.
- Yamaguchi, T. P., Harpal, K., Henkemeyer, M. and Rossant, J.** (1994). fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev* **8**, 3032-44.
- Yang, Y. P. and Klingensmith, J.** (2006). Roles of organizer factors and BMP antagonism in mammalian forebrain establishment. *Dev Biol* **296**, 458-75.
- Yarrell, W.** (1836). In A History of British Fishes. Vol. II, 1st edn, pp. i-iv + 1-472. London, UK: J. V. Voorst.
- Yokota, C., Kofron, M., Zuck, M., Houston, D. W., Isaacs, H., Asashima, M., Wylie, C. C. and Heasman, J.** (2003). A novel role for a nodal-related protein; Xnr3 regulates convergent extension movements via the FGF receptor. *Development* **130**, 2199-212.
- Yu, J. K., Meulemans, D., McKeown, S. J. and Bronner-Fraser, M.** (2008). Insights from the amphioxus genome on the origin of vertebrate neural crest. *Genome Res* **18**, 1127-32.
- Yu, J. K., Satou, Y., Holland, N. D., Shin, I. T., Kohara, Y., Satoh, N., Bronner-Fraser, M. and Holland, L. Z.** (2007). Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer. *Nature* **445**, 613-7.

- Yu, P. B., Hong, C. C., Sachidanandan, C., Babitt, J. L., Deng, D. Y., Hoyng, S. A., Lin, H. Y., Bloch, K. D. and Peterson, R. T.** (2008b). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol* **4**, 33-41.
- Yu, X., Li, J., Liu, H., Li, X., Chen, S., Zhang, H. and Xu, A.** (2011). Identification and expression of amphioxus AmphiSmad1/5/8 and AmphiSmad4. *Sci China Life Sci* **54**, 220-6.
- Zhang, Q. J., Zhong, J., Fang, S. H. and Wang, Y. Q.** (2006a). Branchiostoma japonicum and B. belcheri are distinct lancelets (Cephalochordata) in Xiamen waters in China. *Zoolog Sci* **23**, 573-9.
- Zhang S.C., H. N. D., Holland L.Z.** (1997). Topographic changes in nascent and early mesoderm in amphioxus embryos studied by Dil labeling and by in situ hybridization for a Brachyury gene. *Dev Genes Evol* **206**, 532-535.
- Zhang, X., Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., Umemori, H., Mohammadi, M. and Ornitz, D. M.** (2006b). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* **281**, 15694-700.
- Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M. and Harland, R. M.** (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**, 599-606.