



**HAL**  
open science

# Rôle de XDSCR6 et de ses partenaires au cours du développement embryonnaire précoce de *Xenopus laevis*

Mafalda Loreti

► **To cite this version:**

Mafalda Loreti. Rôle de XDSCR6 et de ses partenaires au cours du développement embryonnaire précoce de *Xenopus laevis*. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066443 . tel-02295574

**HAL Id: tel-02295574**

**<https://theses.hal.science/tel-02295574>**

Submitted on 24 Sep 2019

**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.

# Thèse de doctorat de Biologie du développement

Ecole doctorale Complexité du Vivant

Laboratoire de Biologie du développement

## **Rôle de XDSCR6 et de ses partenaires au cours du développement embryonnaire précoce de *Xenopus laevis***

Présentée par

**Mafalda LORETI**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'Université Pierre et Marie Curie**

Soutenue publiquement le 26 septembre 2017

**Devant un jury composé de :**

Dr. De-Li SHI	Directeur de recherche 2	Directeur de thèse
Dr. Clémence CARRON	Maître de conférences	Co-encadrant de thèse
Dr. Raphaël MARGUERON	Directeur de recherche 2	Président du jury
Dr. Béatrice DURAND	Chargé de recherche 1	Rapporteur
Dr. Laurent KODJABACHIAN	Directeur de recherche 1	Rapporteur
Pr. Anne-Marie PRET	Professeur	Examineur



## Rôle de XDSCR6 et de ses partenaires au cours du développement embryonnaire précoce de *Xenopus laevis*

La formation des trois feuillets embryonnaires primordiaux et leur régionalisation selon les axes embryonnaires sont des étapes cruciales au cours du développement précoce. Dans ce contexte, nous avons montré que XDSCR6, un inducteur du mésoderme et des axes embryonnaires qui présente des propriétés dorsalisantes, interagit physiquement et fonctionnellement avec le facteur de transcription XSTAT3. Au cours des étapes précoces du développement, XSTAT3 est active pendant la gastrulation et l'activation anormale de cette protéine dans la région dorsale induit la ventralisation des tissus embryonnaires. Par ailleurs, nous avons montré que XDSCR6 et XSTAT3 présentent des rôles antagonistes *in vivo* au cours de la mise en place des axes embryonnaires. Cet antagonisme peut être expliqué par le fait que XDSCR6 régule négativement l'activité transcriptionnelle de XSTAT3 en modulant sa méthylation sur les résidus lysine. L'ensemble de nos résultats a permis de déterminer l'importance cruciale de cette modification post-traductionnelle dans les propriétés ventralisantes de XSTAT3. Par ailleurs, nous avons montré que la méthyltransférase XEZH2 méthyle et active XSTAT3 *in vivo*. Des travaux antérieurs de l'équipe avaient montré que les propriétés dorsalisantes de XDSCR6 reposent sur sa capacité à inhiber l'activité épigénétique répressive de XEZH2 sur les gènes du mésoderme dorsal. Ainsi, nos travaux suggèrent que XDSCR6 est un modulateur transcriptionnel situé à l'interface entre certains régulateurs chromatinien et des facteurs de transcription pendant la mise en place des axes embryonnaires.

## **XDSCR6 function during early embryonic development of *Xenopus laevis***

One of the most challenging questions in developmental biology is to understand how a totipotent zygote differentiates into an organism containing all cell lineages. The formation of the three germ layers and the establishment of embryonic axis are fundamental events during early development. In this context, we demonstrated that XDSCR6, a mesoderm and embryonic axis inducer that exhibits dorsalizing properties, physically and functionally interacts with the transcriptional factor XSTAT3. During early development, XSTAT3 is active throughout gastrulation step and its abnormal activation in dorsal region leads to embryonic tissues ventralization. Furthermore, we showed that XDSCR6 and XSTAT3 have antagonistic roles *in vivo* during axis formation. This antagonism can be explained by the fact that XDSCR6 negatively regulates the transcriptional activity of XSTAT3 by interfering with its methylation on lysine residues. Moreover, this post-translational modification plays a crucial role in the ventralization abilities of XSTAT3. In a previous study, it has been shown that XDSCR6 negatively regulates the XEZH2 repressive epigenetic activity on dorsal mesoderm genes. Thus, we propose that XDSCR6 is a transcriptional modulator acting between epigenetic regulators and transcriptional factors during embryonic axis formation.



# Table des Matières

<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>6</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>9</b>
<b>PREAMBULE</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>14</b>
<b>A. ETUDE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE</b>	<b>14</b>
<b>1. L'HISTOIRE</b>	<b>14</b>
<b>2. LE MODELE <i>XENOPUS LAEVIS</i></b>	<b>15</b>
<b>B. MISE EN PLACE DES FEUILLETS EMBRYONNAIRES</b>	<b>17</b>
<b>1. LES ETAPES DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE <i>XENOPUS LAEVIS</i></b>	<b>17</b>
1.1. L'ovogenèse	17
1.2. La fécondation	18
1.3. La segmentation	20
1.3.1. La nature moléculaire des inducteurs du mésoderme	22
1.4. La gastrulation	23
1.4.1. Le centre organisateur de Spemann	23
1.4.2. Induction du centre organisateur de Spemann	23
1.4.3. Nature moléculaire du centre organisateur de Spemann	24
1.4.3.1. Les antagonistes de BMP	24
1.4.3.2. Les antagonistes de Wnt	25
1.4.3.3. Les facteurs de transcription Xnot, Xbra, Goosecoïd et Otx-2	26
1.4.3.4. La protéine Cerberus	27

1.4.4. La région ventrale possède un centre activateur des signaux ventro-postérieurs	28
1.4.4.1. BMP4	28
1.4.4.2. Wnt8	29
1.5. La neurulation	30
1.6. L'organogenèse	30
<b>2. RESUME : LES ACTEURS MOLECULAIRES MIS EN JEU AU COURS DE LA MISE EN PLACE DES AXES EMBRYONNAIRES</b>	<b>31</b>
2.1. Polarisation de l'axe dorso-ventral	31
2.2. Polarisation de l'axe antéro-postérieur	31
2.3. Autres facteurs impliqués dans la mise en place des axes embryonnaires	32
<b>C. LES GENES DE LA FAMILLE DSCR</b>	<b>33</b>
<b>1. GENERALITES DE LA TRISOMIE 21</b>	<b>33</b>
<b>2. LA REGION DSCR (DOWN SYNDROM CRITICAL REGION)</b>	<b>33</b>
2.1. DSCR dans les modèles murins	34
2.1.1. Les souris Ts16	34
2.1.2. Les souris Ts65Dn	35
2.1.3. Les souris Ts1Rhr	35
2.1.4. Autres modèles murins	36
2.2. Les gènes localisés dans cette région	36
2.3.1. Dyrk1A	36
2.3.2. DSCR5	37
2.3.3. DSCR6	38
<b>D. LES REGULATIONS EPIGENETIQUES AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE</b>	<b>41</b>
<b>1. GENERALITES</b>	<b>41</b>
<b>2. LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES</b>	<b>42</b>
2.1. L'acétylation	42
2.2. La méthylation	43
<b>3. IMPORTANCE DES POLYCOMBS</b>	<b>43</b>
<b>4. LES COMPLEXES PRC1 ET PRC2</b>	<b>44</b>
4.1. PRC1	45

4.1.1. BMI1	45
4.1.1.1. BMI1 au cours du développement embryonnaire	46
4.2. PRC2	46
4.2.1. EZH2	47
4.2.1.1. L'implication d'EZH2 au cours du développement embryonnaire de la souris	47
4.2.1.2. L'implication d'EZH2 au cours du développement embryonnaire de l'amphibien	48
<b>E. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION STAT3</b>	<b>50</b>
<b>1. LA FAMILLE STAT (SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION)</b>	<b>50</b>
<b>2. IMPLICATION DES DIFFERENTS STATs AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE</b>	<b>51</b>
2.1. STAT1	51
2.2. STAT5	52
2.3. STAT3	53
2.3.1. STAT3 au cours du développement embryonnaire de la souris	53
2.3.2. STAT3 au cours du développement embryonnaire de l'amphibien	53
2.3.3. La régulation de Stat3	56
2.3.3.1. La phosphorylation de STAT3	56
2.3.3.2. L'acétylation de STAT3	56
2.3.3.3. La méthylation de STAT3	57
<b>PROJET DE THESE</b>	<b>59</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>62</b>
<b>1. PRESENTATION DES RESULTATS</b>	<b>62</b>
<b>2. PUBLICATION EN COURS</b>	<b>66</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>67</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>68</b>
<b>MATERIAL AND METHODS</b>	<b>71</b>
Embryos manipulations	71
Plasmid constructs	71
GST pull-down, co-immunoprecipitation and western blot analysis	71
Immunostaining experiments	72
Luciferase assay	73

<b>RESULTS</b>	<b>74</b>
XDSCR6 and XSTAT3 exhibit antagonistic effects <i>in vivo</i>	74
XDSCR6 physically interacts with XSTAT3 <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	74
XSTAT3 is mainly activated during gastrulation	75
XDSCR6 negatively regulates XSTAT3 transcriptional activity and lysine-methylation	76
EZH2 methyltransferase activity is required for optimal XSTAT3 activity <i>in vivo</i>	77
<b>DISCUSSION</b>	<b>78</b>
XSTAT3 is mainly active during xenopus gastrulation and exhibits ventralization properties	78
Implication of XDSCR6 in XSTAT3 regulation during axis specification	79
XDSCR6 negatively regulates XSTAT3 transcriptional activity by modulating its lysine methylation during embryonic development	80
XDSCR6, a regulator at the cross-road between epigenetic and transcriptional control?	80
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b>	<b>81</b>
<b>AUTHOR CONTRIBUTIONS</b>	<b>81</b>
<b>FUNDING</b>	<b>81</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>82</b>
<b>FIGURES</b>	<b>85</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>95</b>
<b>A. LA FONCTION DE XDSCR6, XSTAT3 ET XEZH2 AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE D'AMPHIBIEN</b>	<b>95</b>
1. XSTAT3 EST ACTIVE AU COURS DE LA GASTRULATION	95
2. L'ACTIVATION DE XSTAT3 CONDUIT A DES MALFORMATIONS ANTERIEURES	97
3. IDENTIFICATION DES GENES CIBLES DE XSTAT3 <i>IN VIVO</i> AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE	99
4. L'INACTIVATION XSTAT3, EN MODULANT NEGATIVEMENT SA PHOSPHORYLATION, NE SEMBLE PAS JOUER UN ROLE DANS LA MISE EN PLACE DES AXES EMBRYONNAIRES	100
5. XSTAT3 EST METHYLEE SUR LES RESIDUS LYSINE AU COURS DE LA GASTRULATION ET LA MODULATION DE CETTE METHYLATION EST IMPLIQUEE DANS LA MISE EN PLACE DES AXES EMBRYONNAIRES	101

6. XSTAT3 INTERAGIT DIRECTEMENT AVEC XDSCR6 ET XEZH2 VIA SON DOMAINE CARBOXY-TERMINAL	102
7. XEZH2 ET XSTAT3 SONT PRESENTES DANS LES MEMES FEUILLETS EMBRYONNAIRES	102
8. LA MODULATION DE L'ACTIVITE METHYLTRANSFERASE D'EZH2 INFLUENCE LA MISE EN PLACE DES AXES EMBRYONNAIRES	104
9. XSTAT3 REQUIERT L'ACTIVITE DE LA METHYLTRANSFERASE EZH2 POUR ETRE METHYLEE ET TRANSCRIPTIONNELLEMENT ACTIVE	104
10. LA MODULATION DE LA PHOSPHORYLATION SUR LE RESIDU S21 D'EZH2 MODIFIE LA MISE EN PLACE DES AXES EMBRYONNAIRES	105
11. XDSCR6 INHIBE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE STAT3 EN INTERFERANT AVEC SON ETAT DE METHYLATION	107
12. XDSCR6 REGULE NEGATIVEMENT L'ACTIVITE DE XEZH2 ET DE XSTAT3	109
<b>B. EST-CE QUE LES FONCTIONS DE XDSCR6, XSTAT3 ET XEZH2 EST CONSERVEE AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DES AUTRES VERTEBRES ?</b>	<b>112</b>
<b>C. LA REGULATION NEGATIVE DE XDSCR6 SUR EZH2 ET STAT3 EST-ELLE CONSERVEE AU COURS DES PROCESSUS ONCOGENIQUES ?</b>	<b>113</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>116</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>117</b>

# Table des figures

- Figure 1** : La planche de Haeckel publiée en 1874.
- Figure 2** – Représentation schématique de l'expérience de Wilhem Roux (1890).
- Figure 3** – Représentation schématique de l'expérience John Gurdon (1962).
- Figure 4** – Représentation schématique du cycle de développement de *Xenopus laevis*.
- Figure 5** – Représentation schématique de l'ovogenèse de *Xenopus laevis*.
- Figure 6** – Modèle schématique de la localisation et activation de la  $\beta$ -caténine dans embryons de xénope.
- Figure 7** – Représentation schématique de l'expérience de Hans Spemann en 1903 : l'asymétrie du développement.
- Figure 8** – Représentation schématique de l'expérience de Hans Spemann en 1903 : les déterminants essentiels au développement se trouvent dans le cytoplasme.
- Figure 9** – Représentation schématique des expériences de Nieuwkoop et de Dale et Slack.
- Figure 10** – Représentation schématique des expériences de Gimlich et Gerhart en 1984 : le centre de Nieuwkoop.
- Figure 11** – Modèle représentant les interactions moléculaires qui induisent le centre Nieuwkoop.
- Figure 12** – Modèle représentant les différents mouvements de la gastrulation.
- Figure 13** – Représentation schématique des expériences de Spemann et Mangold en 1924.
- Figure 14** – Modèle représentant la formation du centre organisateur de Spemann et sa nature moléculaire.
- Figure 15** – Etapes de la neurulation.
- Figure 16** – Localisation chromosomique de la région DSCR.
- Figure 17** – Les différents modèles murins de la Trisomie 21
- Figure 18** – La surexpression de xDyrk1A induite des problèmes antérieurs.

- Figure 19** – Dscr5 et Dscr6 sont présents dans les tissus adultes et fœtaux.
- Figure 20** – Arbre phylogénétique des membres de la famille Ripply.
- Figure 21** – Comparaison des séquences primaires des différents membres de la famille RIPPLY d'amphibien.
- Figure 22** – La fonction de XDSCR6 au cours du développement embryonnaire de l'amphibien.
- Figure 23** – Les modifications des histones.
- Figure 24** – Les complexes Polycomb Repressive 1 et 2.
- Figure 25** – Représentation de la protéine BMI1.
- Figure 26** – BMI1 est impliquée dans la mise en place des axes embryonnaires.
- Figure 27** – Représentation de la protéine EZH2.
- Figure 28** – Profil d'expression spatio-temporel d'EZH2 et de H3K27me3 dans les embryons préimplantatoires de souris.
- Figure 29** – EZH2 au cours du développement embryonnaire de *Xenopus laevis*.
- Figure 30** – Schéma simplifié de la voie de signalisation de JAK/STAT.
- Figure 31** – Schéma simplifié des protéines de la famille STAT.
- Figure 32** – Profil d'expression spatio-temporel de STAT3 et de STAT3 (Y705) dans les embryons préimplantatoires de souris.
- Figure 33** – Schéma simplifié des résultats obtenus durant les études de Nishinakamura et d'Ohkawara.
- Figure 34** – Représentation des modifications post-traductionnelles de STAT3.
- Figure 35** – STAT3 est méthylée par EZH2 et SET9 sur les résidus lysine.
- Figure 36** – Représentation schématique des deux fonctions d'EZH2 dans les GSCs.
- Figure 37** – La protéine XSTAT3 est méthylée au cours de la gastrulation.
- Figure 38** – Hypothèses pour les propriétés ventralisantes de XSTAT3.
- Figure 39** – Les conséquences de la surexpression de XSTAT3-YFSA au cours du développement embryonnaire.
- Figure 40** – XSTAT3 interagit avec XDSCR6 et XEZH2 au cours de la segmentation et au cours de la gastrulation.

- Figure 41** – Profil d'expression spatio-temporel de la protéine XEZH2 endogène.
- Figure 42** – Profil d'expression spatio-temporel de la protéine XDSCR6 endogène et spécificité de l'anticorps anti-XDSCR6.
- Figure 43** – Modèle explicatif pour les propriétés ventralisantes de XSTAT3 régulées par la méthylation de XEZH2.
- Figure 44** – Représentation schématique pour expliquer les hypothèses concernant le mécanisme d'inhibition de XDSCR6 sur l'activité de XSTAT3.
- Figure 45** – Représentation schématique pour expliquer les trois hypothèses concernant le mécanisme d'inhibition de XDSCR6 sur la méthylation de XSTAT3.
- Figure 46** – XDSCR6m interagit avec XSTAT3.
- Figure 47** – La surexpression de XDSCR6 ne diminue pas la phosphorylation de XEZH2 sur le résidu S21.
- Figure 48** – XDSCR6 interagit avec JARID2 et RING1.
- Figure 49** – Immunodétection de STAT3 et EZH2 dans l'ovocyte et l'embryon précoce de souris.
- Table 1** – Les anomalies communes entre les patients atteints de trisomie 21 et les souris Ts65Dn.
- Table 2** – Les conséquences des mutants ponctuels non méthylables de STAT3.
- Table 3** – Les conséquences des mutants ponctuels d'EZH2 sur le résidu sérine 21.
- Table 4** – Les conséquences de la surexpression des formes mutantes de XSTAT3 dans l'embryon de xénope.

# Abréviations

<b>ADN</b>	<b>Acide Désoxyribonucléique</b>
<b>AEBP2</b>	(Adipocyte enhancer)-binding protein 2)
<b>AKT</b>	Protéine kinase B
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>Ascl1</b>	Achaete-scute homolog 1 is a protein
<b>BMI 1</b>	B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1
<b>BMP</b>	Bone morphogenetic protein
<b>CBP</b>	p300/ CREB-binding protein
<b>CDK5</b>	cyclin-dependent-like kinase 5
<b>CREB</b>	C-AMP Response Element-binding protein
<b>Dkk1</b>	<i>Dickkopf-related protein 1</i>
<b>DSCR</b>	Down Syndrome Critical Region
<b>DSCR6</b>	Down Syndrome Critical Region 6
<b>Dsh</b>	Dishevelled
<b>DYRK</b>	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase
<b>DYRK1A</b>	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétraacétique
<b>EED</b>	Embryonic Ectoderm Development
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>ERK1/2</b>	extracellular signal-regulated kinase 1/2
<b>ESC</b>	Cellules souches embryonnaires
<b>EZH2</b>	Enhancer of zeste homolog 2
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factors
<b>Frzb-1</b>	<i>Frizzled-Related Protein 1</i>
<b>GATA4</b>	GATA Binding Protein 4
<b>gp130</b>	Signal transducer glycoprotein 130
<b>GPI-GnT</b>	glycosylphosphatidylinositol-N-acétylglucosaminyltransférase
<b>GSCs</b>	Glioblastoma stem cells
<b>GSK-3</b>	Glycogène synthétase kinase 3
<b>hCG</b>	Hormone chorionique gonadotrope humaine
<b>HSA21</b>	Human chromosome 21

<b>ICM</b>	Inner Cell Mass
<b>IFN</b>	interférons
<b>iPS</b>	Cellules souches à pluripotence induite
<b>JAK</b>	Janus kinase
<b>JARID2</b>	Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2
<b>JNK</b>	Jun N-terminal kinase
<b>KO</b>	Knockout
<b>LSD1</b>	Lysine-Specific Demethylase
<b>MAPK</b>	Mitogen Associated Protein Kinase
<b>MLC</b>	myosin ligh chain
<b>MMU16</b>	Chromosome 16 murin
<b>MMU17</b>	Chromosome 17 murin
<b>MTC</b>	Human Multiple Tissue cDNA panels
<b>NFAT</b>	Nuclear <i>factor</i> of activated T-cells
<b>Oct4</b>	octamer-binding transcription factor 4
<b>Otx2</b>	Orthodenticle Homeobox 2
<b>PC</b>	Polycomb
<b>PDGF</b>	Platelet Derived Growth Factor
<b>PH</b>	Polyhomeotic
<b>PIG-P</b>	Phosphatidylinositol glucan, classe P
<b>PRC</b>	Polycomb Repressive complexe
<b>PRMT</b>	protein arginine methyltransferase
<b>PSC</b>	Posterior Sex Combs
<b>PSORTII</b>	Protein sorting signal and localization sites in amino acid sequences
<b>RbAP46/48</b>	Retinoblastoma Associated Protein
<b>Ripply/BDLC</b>	Bowline-DSCR-Ledgerline conserved region
<b>RIPPLY3</b>	Ripply transcriptional repressor 3
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcription polymerase chain reaction
<b>S21</b>	Résidu serine en position 2
<b>SET</b>	Suppressor of variegation 3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax
<b>SETDB1</b>	Set Domain Bifurcated 1
<b>sFRP2</b>	<i>Secreted frizzled-related protein 2</i>
<b>sFRPs</b>	(Secreted Frizzled-related proteins)
<b>SH2</b>	Src Homology 2
<b>Socs-3</b>	<i>Supressor of cytokine-signaling 3</i>

---

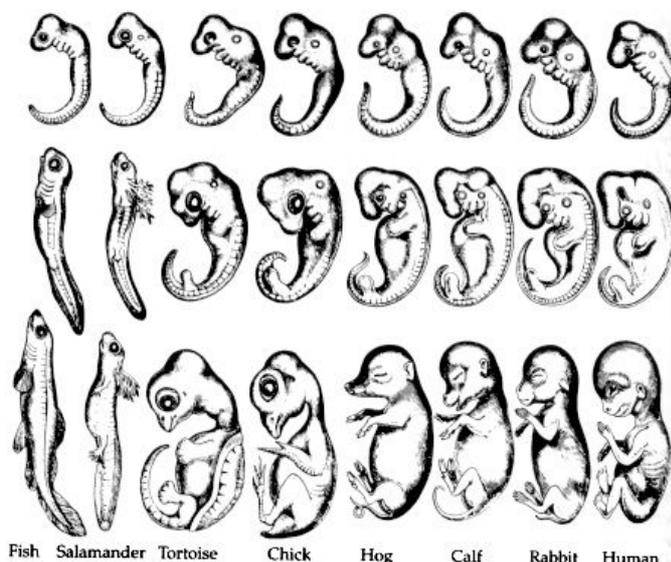
<b>STAT</b>	Signal transducer and activator of transcription
<b>STAT3</b>	Signal transducer and activator of transcription 3
<b>STAT3-Y705</b>	Stat3 phosphorylée sur la tyrosine 705
<b>SUZ12</b>	Suppressor of Zeste 12
<b>TAD</b>	Domaine de transactivation
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factors
<b>VBI</b>	Ventral Blood Island
<b>Xbra</b>	Xenopus brachyury
<b>XDSCR6</b>	Xenopus homologue of Down syndrome critical region 6
<b>Xnr</b>	Xenopus nodal related

---

# Préambule

Un vertébré adulte est constitué de plusieurs centaines de millions de cellules. Comment cet individu s'est formé à partir d'une seule cellule ? Pourquoi a-t-on besoin de deux parents pour former un nouveau-né ? Pendant des siècles, les embryologistes ont cherché à répondre à ces questions. Déjà, dès l'antiquité le philosophe grec stipula qu'un embryon se développe progressivement à partir d'un état indifférencié, en devenant de plus en plus complexe. Cette théorie nommée épigénèse a été formellement décrite en 1651 par William Harvey. Cette théorie a été opposée à celle de la préformation qui considéra que l'ovule ou le spermatozoïde étaient des êtres vivants en miniature dont tous les organes étaient déjà formés. Ainsi, cet individu ne faisait que grandir au cours de son développement. Cependant, cette théorie n'expliquait pas pourquoi il fallait deux individus, un mâle et une femelle, pour former un nouveau-né.

Au cours du temps, d'autres théories ont été évoquées et crues pendant des années. Par exemple, au XIX<sup>ème</sup> siècle, « L'origine des espèces » a été publiée par Charles Darwin. Dans cette publication, il décrit la théorie de l'évolution : au tout début du développement les différentes espèces se ressemblent, puis des caractères spécialisés apparaissent et se développent au cours du développement. Cette théorie a été défendue par l'allemand Ernest Haeckel qui proposa que les embryons des vertébrés présentent des structures comparables avec un plan d'organisation commun (Figure 1).

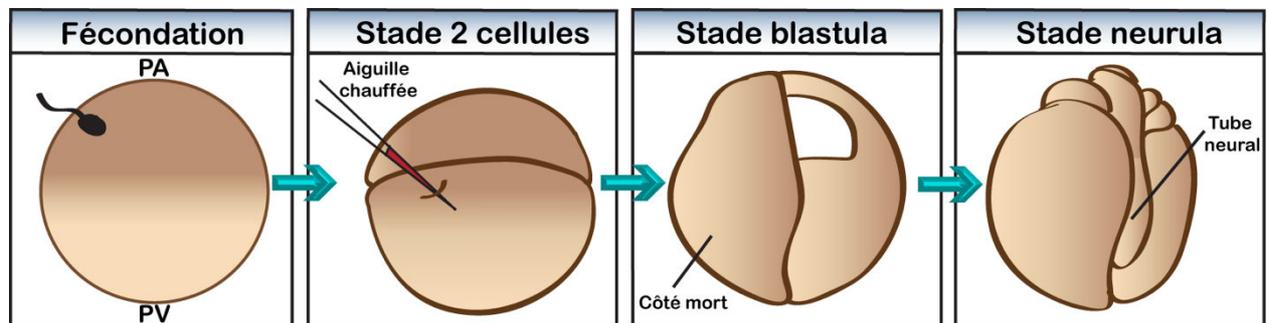


**Figure 1 : La planche de Haeckel publiée en 1874.** Cette planche illustre le développement embryonnaire des vertébrés. La première ligne représente le stade précoce commun aux espèces représentées et celle du bas montre un stade de l'embryon plus tardif. Il est à noter que ces dessins ont fait l'objet de plusieurs critiques relatives à la falsification de certaines observations pour mettre en évidence les similitudes des différentes espèces.

(D'après Gilbert, S. F., 1997)

Avec le temps, il y a eu un énorme progrès au niveau expérimental et des nouvelles techniques se sont développées. L'avènement de la théorie cellulaire, grâce aux progrès en la microscopie optique, a enfin donné accès à la cellule. La découverte de la cellule comme unité du vivant, puis la découverte de la différence entre cellule somatique et gamète, ont été des événements majeurs dans la biologie. Ceci a permis des énormes progrès dans la biologie du développement. Par exemple, les embryologistes ont montré que l'embryon triploblastique précoce est constitué de trois feuillets primordiaux, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme, et que leur régionalisation selon les axes embryonnaires est une étape cruciale au cours du développement précoce. Chez l'amphibien, le mésoderme, qui est destiné à produire les muscles, le squelette et les vaisseaux sanguins, se met en place pendant la segmentation et se régionalise progressivement selon l'axe dorso-ventral au cours de la gastrulation. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail d'étude qui est présenté dans ce manuscrit. Il consiste à étudier la fonction de XDSCR6 (Xenopus homologue of Down Syndrome Critical Region protein 6) au cours de la mise en place des axes embryonnaires. Mon équipe a montré que cette protéine agit comme un inducteur du mésoderme et présente des propriétés dorsalisantes.

Mon manuscrit est composé de trois parties principales comprenant une introduction divisée en cinq chapitres. Le premier chapitre expose très succinctement l'histoire de la biologie du développement ainsi que le modèle *Xenopus laevis*. Le deuxième chapitre décrit les étapes essentielles du développement en se focalisant sur la mise en place des feuillets primordiaux et des axes embryonnaires. Une grande partie de ce chapitre décrit les acteurs moléculaires principaux de ces événements. Le troisième chapitre expose les gènes de la région DSCR (Down Syndrome Critical Region), et plus particulièrement leur fonction au cours du développement embryonnaire. Le quatrième chapitre est consacré à la description de la fonction des protéines membres de la famille Polycomb au cours du développement embryonnaire. Enfin, le dernier chapitre de l'introduction présente les membres de la famille STAT (Signal transducer and activator of transcription). La deuxième partie de mon manuscrit commence par la présentation de la problématique de mon doctorat ainsi que tous les résultats obtenus au cours de ces trois dernières années. Ils seront présentés sous forme d'un article actuellement en préparation. Enfin, la dernière partie de mon manuscrit est consacrée à la discussion de ces résultats.



**Figure 2 – Représentation schématique de l'expérience de Wilhem Roux (1890).** Après la fécondation, un blastomère a été tué avec une aiguille chauffée au stade 2 cellules. Aux stades blastula et neurula nous pouvons voir que le côté gauche ne se développe pas. Cette expérience démontre que le développement des cellules embryonnaires est mosaïque et est prédéterminé dès le stade 2 cellules. (PA : pôle animal ; PV : pôle végétatif).

(D'après GILBERT, 1994)

# Introduction

## A. Etude du développement embryonnaire

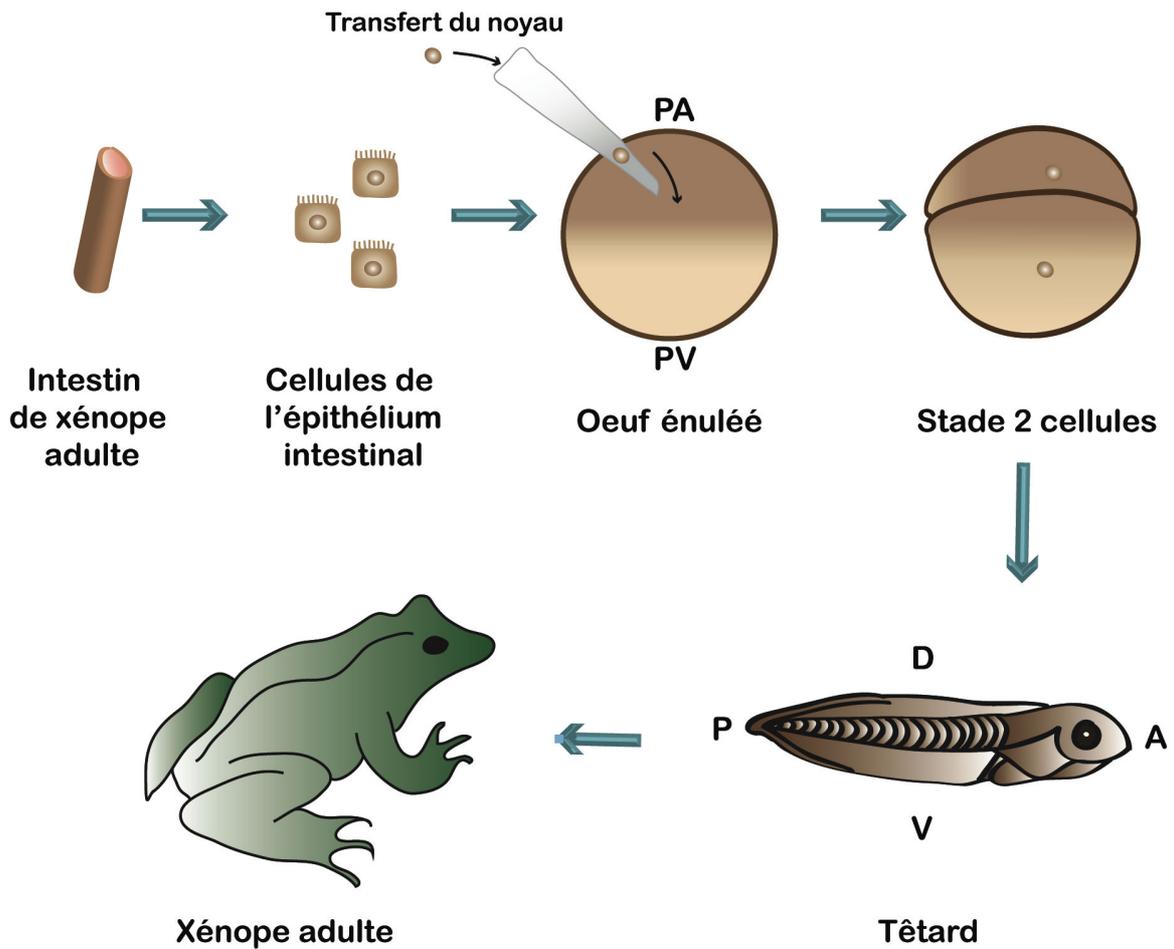
### 1. L'histoire

La biologie du développement embryonnaire étudie les phénomènes qui permettent de comprendre comment une seule cellule, appelée zygote, est capable d'être à l'origine d'un organisme adulte. Cette discipline a beaucoup évolué depuis le XX<sup>ème</sup> siècle grâce à la l'utilisation expérimentale de plusieurs espèces modèles. Il s'agit notamment du nématode *Caenorhabditis elegans*, de la drosophile *Drosophila melanogaster*, de l'oursin *Paracentrotus lividus*, du poisson zèbre *Danio rerio*, de l'amphibien *Xenopus laevis*, du poulet *Gallus gallus* ou encore de la souris *Mus musculus*. L'utilisation de ces modèles permet d'avoir aujourd'hui une vision de l'ensemble des mécanismes fondamentaux de la biologie du développement.

Les expériences pionnières en embryologie expérimentale ont été effectuées sur des embryons d'amphibien et d'oursin.

Dans les années 1880s, l'allemand Wilhelm Roux a réalisé les premières expériences sur l'amphibien *Rana fusca*. Au stade 2 cellules, ce chercheur a tué le blastomère gauche avec une aiguille chauffée et a observé que l'embryon résultant ne forme que sa partie droite. Il a donc montré que le développement des cellules embryonnaires est prédéterminé dès le stade 2 cellules et qu'il est mosaïque, chaque cellule contient très tôt les informations pour orienter son devenir (Roux, 1890) (figure 2). Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, Hans Spemann et Hilde Mangold ont mené leurs recherches sur les embryons de *Triton taeniatus* et ont découvert une région capable d'induire des structures dorsales, montrant alors que le développement pouvait aussi faire appel à des mécanismes d'induction embryonnaire. Cette région fut appelée centre organisateur de Spemann et Mangold (Spemann and Mangold, 1924).

Ce n'est que à partir de la 2<sup>ème</sup> Guerre Mondiale que le xénope (*Xenopus laevis*) a été utilisé comme modèle d'étude. En effet, il servait d'indicateur de présence de gonadotrophines dans l'urine des femmes enceintes (L. Hogben et al., 1931). L'injection d'urine contenant l'hormone gonadotrophique dans les sacs lymphatiques dorsaux



**Figure 3 – Représentation schématique de l'expérience John Gurdon (1962).**

John Gurdon a d'abord isolé des cellules de l'épithélium intestinal, et ensuite a transféré un noyau de ces cellules dans un oeuf énucléé. Cet oeuf se développe normalement jusqu'au stade adulte. Cette expérience démontre que le noyau d'une cellule somatique adulte différenciée peut être reprogrammé pour redevenir pluripotent. (PA : pôle animal ; PV : pôle végétatif ; D : dorsal ; V : ventral ; A : antérieur ; P : postérieur).

(D'après Gurdon, 2009).

induit la libération d'œufs entre 8 et 12h post-injection (Oakley, 1984, p. 97). En 1940, ce test a été nommé test de Hogben (Hogben, 1946). A partir des années 60s ce diagnostic a été remplacé par des méthodes immunologiques. Le xénope a été de plus en plus utilisé par les biologistes du développement, notamment pour la microchirurgie traditionnelle et pour les études biochimiques qui demandent des grandes quantités de matériel biologique.

Pour la première fois dans l'histoire de la science, la voie du clonage animale a commencé en 1962 par John Gurdon sur les embryons de *Xenopus laevis*. Il a transféré le noyau d'une cellule d'épithélium intestinal d'un têtard âgé (cellule donneuse) dans un oeuf énucléé (cellule receveuse) et a montré que le noyau de la cellule donneuse (cellule somatique adulte différenciée) peut retourner à un état de type embryonnaire, permettant à l'oeuf injecté de reproduire les étapes de développement qui conduisent à l'obtention d'un animal adulte (figure 3). John Gurdon a ainsi montré que le noyau d'une cellule mature d'un organisme adulte pouvait être reprogrammé en cellule pluripotente (Gurdon, 1962). Ces expériences ont été reprises en 2006 par Shinya Yamanaka qui a démontré qu'il était possible de manipuler des cellules différenciées de souris adulte pour leur faire retrouver les mêmes propriétés que les cellules souches embryonnaires. Ces cellules ont été appelées « cellules souches à pluripotence induite » (ou cellules iPS) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Les travaux de ces deux chercheurs ont abouti à un prix Nobel en 2012.

## **2. Le modèle *Xenopus laevis***

L'espèce *Xenopus laevis*, aussi appelée le crapaud à griffes ou dactylère du Cap, est originaire de l'Afrique du Sud. C'est un amphibien anoure de la famille des pipiadés. Son mode de vie est essentiellement aquatique, et il ne remonte à la surface de l'eau que pour respirer. Il s'élève facilement et se développe à une température de 20°C. Cette espèce peut se reproduire toute l'année, est exceptionnellement résistante aux maladies et a un cycle de vie assez court par rapport à d'autres espèces. De plus, lors de la ponte, les femelles peuvent déposer un grand nombre d'œufs et de grande taille (environ 1,25 mm de diamètre) ce qui facilite l'observation macroscopique des différentes étapes précoces du développement ainsi que la manipulation des embryons, notamment pour des expériences de microchirurgie. Le développement

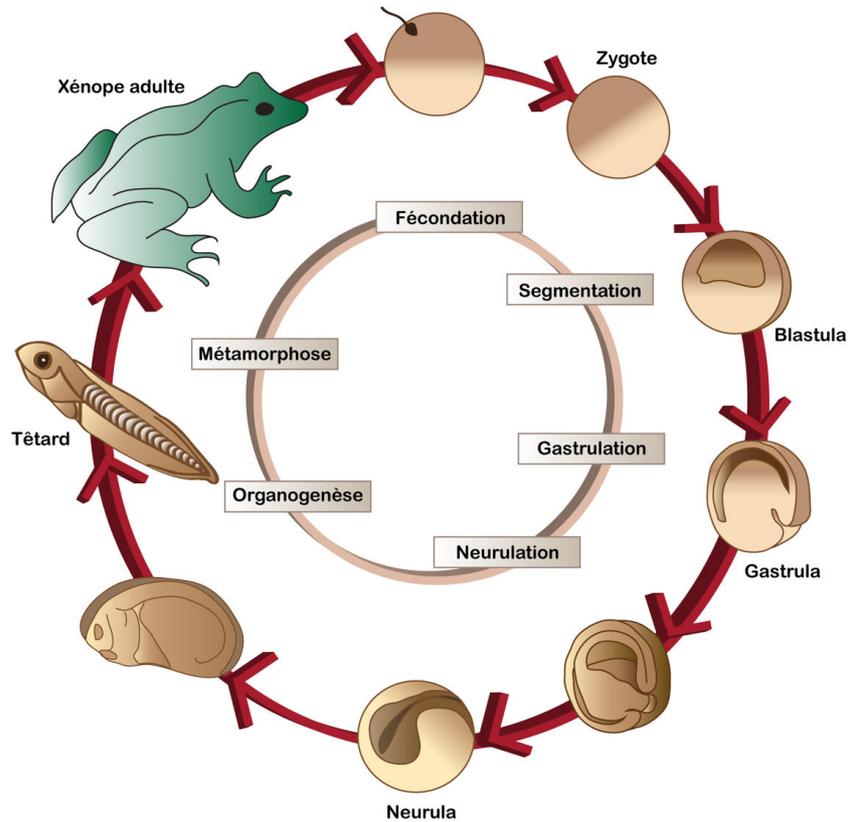


embryonnaire externe rend le xénope particulièrement intéressant pour des approches d'embryologie expérimentale.

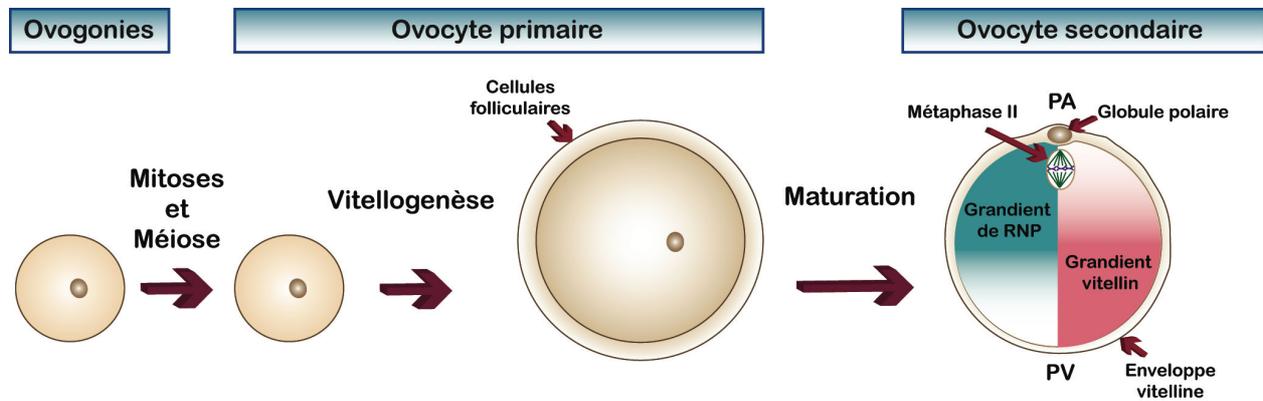
Chez le xénope les principales phases du développement sont bien documentées. En effet, la carte des territoires présomptifs est définie et stéréotypée (Nieuwkoop, P. D. and Faber, J., 1956). Ceci a permis aux biologistes de développer de nombreuses techniques et outils pour étudier la fonction des gènes au cours du développement embryonnaire. Par exemple, la taille des embryons rend la micro-injection une expérience particulièrement accessible. Cette technique permet l'étude rapide de la fonction d'un ou de plusieurs gènes simultanément, ce qui est plus difficile chez d'autres espèces comme la souris par exemple. En effet, la micro-injection d'ARNm ou d'ADN permet la surexpression ou le gain de fonction d'un gène. La perte de fonction se fait par l'injection d'oligonucléotides de type Morpholino (qui bloquent la traduction d'un ARNm cible ou son épissage) ou d'ARNm codant pour des formes tronquées de protéines fonctionnant comme des dominants négatifs. La visualisation du profil d'expression des transcrits ou des protéines au cours du développement embryonnaire est également possible grâce aux techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, respectivement.

Ainsi, depuis le XX<sup>ème</sup> siècle, le xénope est devenu un modèle d'étude puissant pour comprendre et décrire le développement embryonnaire.

Comme tous les modèles, *Xenopus laevis* présente également des désavantages. En effet, cet amphibien est un vertébré allo-tétraploïde ce qui rend plus difficile les études par l'utilisation de la génétique classique. C'est pour cette raison que les biologistes du développement ont commencé à étudier le développement de *Xenopus tropicalis*, une espèce très proche de *Xenopus laevis*. Cet amphibien est diploïde et est sexuellement mature à l'âge de quatre mois. De plus, son génome a été entièrement séquencé (Hellsten et al., 2010), ce qui permet l'utilisation de méthodes génétiques pour l'étude de la fonction des gènes chez l'embryon.



**Figure 4 – Représentation schématique du cycle de développement de *Xenopus laevis*.** Les différentes étapes du cycle de développement du xénope sont représentées dans le cercle central : la fécondation, la segmentation, la gastrulation, la neurulation, l'organogenèse et la métamorphose. (D'après Darribère, 2002)



**Figure 5 – Représentation schématique de l'ovogenèse de *Xenopus laevis*.** Les ovogonies sont issues des cellules germinales primordiales. Ces cellules vont de multiplier et après les mitoses, les ovogonies vont entrer en méiose. Les ovocytes primaires vont rester bloqués au stade diplotène de la prophase I. L'étape suivante, la vitellogenèse, correspond à la croissance ovocytaire et à l'accumulation de réserves. L'ovogenèse se termine par la maturation de l'ovocyte et donc à la formation de l'ovocyte secondaire. Dans cet ovocyte, les réserves se distribuent de manière hétérogène : on observe un gradient vitellin dans lequel les plaquettes vitellines s'accumulent dans la région végétative (rouge) ; et un gradient de ribonucléoprotéines (RNP, en vert) dans lequel les ARN ribosomiques se concentrent autour du noyau dans la région de l'hémisphère animal. Les granules pigmentaires sont concentrés au niveau du cortex de l'hémisphère animal, tandis que certains déterminants cytoplasmiques comme les ARNm Vg1 et VegT sont au niveau de l'hémisphère végétatif. Cet ovocyte est en métaphase de 2<sup>ème</sup> division de méiose. (PA : pôle animal ; PV : Pôle végétatif). (D'après Darribère, 2002)

## B. Mise en place des feuillets embryonnaires

### 1. Les étapes du développement embryonnaire de *Xenopus laevis*

Le développement d'un organisme à partir d'une cellule totipotente est une question centrale étudiée en embryologie. Comme dans d'autres organismes, le développement des vertébrés est subdivisé en différentes phases définies : la fécondation, le clivage, la gastrulation, la neurulation et l'organogenèse (figure 4). Chez le xénope, les différents stades de développement ont été observés en détail et décrits par les tables de Nieuwkoop et Faber (Nieuwkoop and Faber, 1994).

#### 1.1. L'ovogenèse

L'ovogenèse débute par une période d'activité mitotique des ovogonies, des cellules issues des cellules germinales primordiales. Les ovogonies se différencient pour donner l'ovocyte primaire, le gamète femelle qui est bloqué au stade diplotène en prophase I de la méiose. La croissance de l'ovocyte primaire permet l'accumulation de réserves nutritives d'origine endogène et exogènes. Ces réserves permettent un développement externe et autonome de l'embryon en absence de ressources nutritives externes jusqu'au stade larvaire. Chez le xénope, ces réserves s'accumulent dans l'ovocyte de manière hétérogène et sont disposées en gradient dans le cytoplasme, ce qui permet la mise en place d'une polarité structurale.

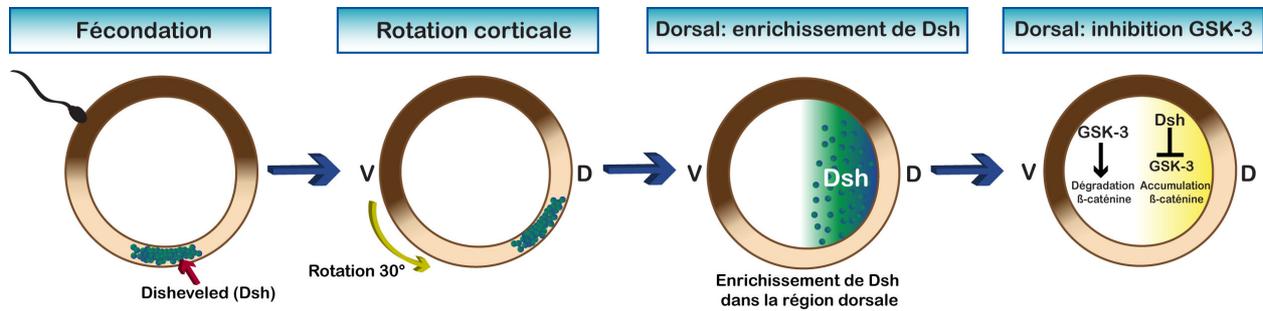
Dans l'hémisphère animal, il y a accumulation de granules pigmentaires dans le cortex et le déplacement de la vésicule germinative, tandis que dans l'hémisphère végétatif, les plaquettes vitellines riches en protéines sont accumulées (Dumont, 1972). C'est également dans le pôle animal de l'ovocyte II qui se trouve fuseau méiotique du gamète femelle bloqué en métaphase de seconde division de méiose (figure 5). Lors de sa mise en place, certains pigments du cortex localisés dans le pôle animal au-dessus fuseau seront déplacés, ce qui conduit à l'apparition de la tâche de maturation. Ainsi, l'axe animal-végétatif est établi très tôt et correspond approximativement à la future polarité antéro-postérieure de l'embryon.



## 1.2. La fécondation

Dans la nature, lors de l'accouplement, les femelles xénope pondent des centaines d'œufs et les mâles, accrochés sur le dos de la femelle, déposent leurs spermatozoïdes au fur et à mesure. Au laboratoire, les femelles sont stimulées par l'injection de l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) dans les sacs lymphatiques dorsaux, ce qui permet la ponte d'ovocytes. Ils sont ensuite fécondés *in vitro* par l'ajout de fragments de testicule dilacéré. Cette méthode permet la fécondation d'un grand nombre d'ovocytes simultanément, ce qui conduit à un développement synchrone des embryons.

La fécondation a lieu dans l'hémisphère animal du gamète femelle. La fusion des membranes plasmiques des deux gamètes provoque la dépolarisation temporaire de l'œuf. La membrane plasmique de l'œuf devient donc moins réceptive à l'entrée d'un deuxième spermatozoïde, ce qui empêche en partie la polyspermie (Grey et al., 1982). De plus, la reprise de la méiose provoque la disparition du fuseau méiotique initialement présent dans le cytoplasme, ce qui entraîne le recouvrement du pigment cortical au-dessus du pronucléus femelle, et donc à la disparition de la tâche de maturation. La fécondation induit la libération de Calcium dans le cytoplasme. Les granules corticaux libèrent leur contenu dans l'espace entre la membrane plasmique et l'enveloppe vitelline (Grey et al., 1974). Ceci permet la formation d'un espace périvitellin et d'une membrane de fécondation appelée chorion. La formation de l'espace périvitellin permet à l'œuf fécondé de tourner librement sous l'influence de la gravité en fonction du gradient vitellin pour amener l'hémisphère animal vers le haut. Ce mouvement est un processus qui induit la rotation du cortex de 30°. Ce phénomène induit la formation d'une région dépigmentée appelée croissant gris (Brachet, 1977). La rotation corticale coïncide avec le déplacement des déterminants dorsaux présents dans le pôle végétatif vers la région au niveau du croissant gris. Ainsi, la spécification de l'axe dorso-ventral a lieu dès le début du développement via la rotation corticale. Ces événements nécessitent d'un réarrangement des microtubules. En effet, une partie du faisceau de microtubules polymérise depuis le point d'entrée du spermatozoïde vers le cortex de l'hémisphère végétatif au fur et à mesure que la rotation corticale progresse (Houliston and Elinson, 1991). Ces mouvements de microtubules sont cruciaux pour le développement de l'axe dorso-ventral. Par exemple, si la polymérisation des microtubules est bloquée avant la rotation corticale, par exposition de l'œuf aux irradiations UV ou au nocodazole, les embryons formés ne présentent pas toutes les



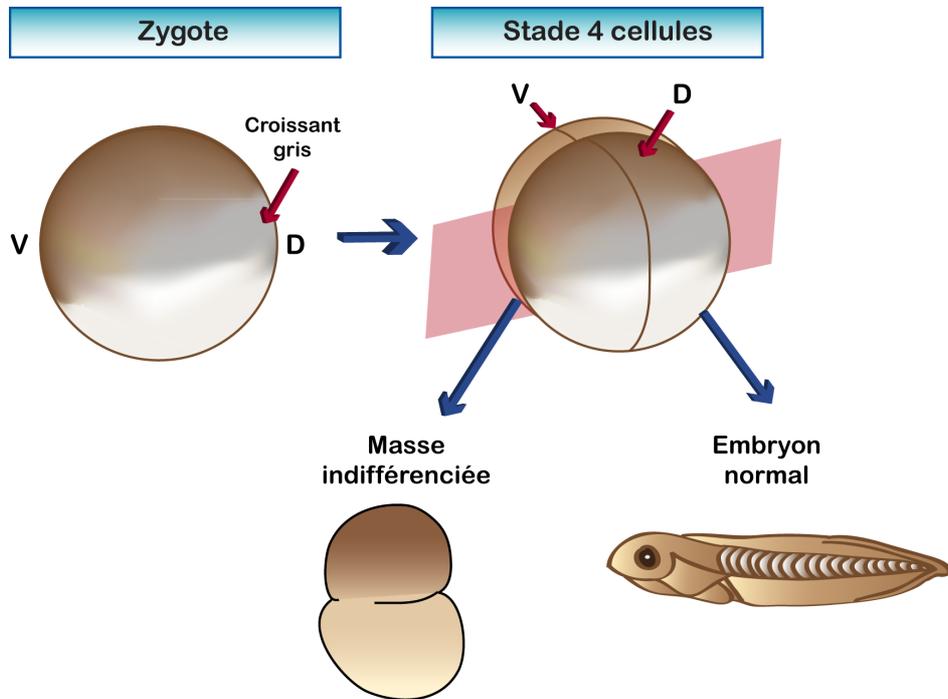
**Figure 6 - Modèle schématique de la localisation et activation de la  $\beta$ -caténine dans embryons de xénope.** Au stade ovocyte, la protéine Dishevelled (Dsh) est accumulée dans les vésicules du cortex végétatif. Après la fécondation, ces vésicules sont transloquées dans la future région dorsale. Le contenu de ces vésicules est libéré dans le cytoplasme et distribué la future région dorsale. Dans cette région, Dsh se lie et bloque l'action de GSK-3, ce qui permet l'accumulation de  $\beta$ -caténine. Dans la future région ventrale, en absence de Dsh, GSK-3 peut induire la dégradation de la  $\beta$ -caténine. (V : ventral; D : dorsal ; Dsh : Dishevelled ; GSK-3 : Glycogène synthétase 3)

(D'après GILBERT, 1994)

structures dorso-antérieures, ils sont ventralisés (Elinson and Rowing, 1988; Scharf and Gerhart, 1983). Ceci montre l'importance de la rotation corticale pour l'activité dorsalisante des déterminants cytoplasmiques qui se situent initialement au niveau de l'hémisphère végétatif.

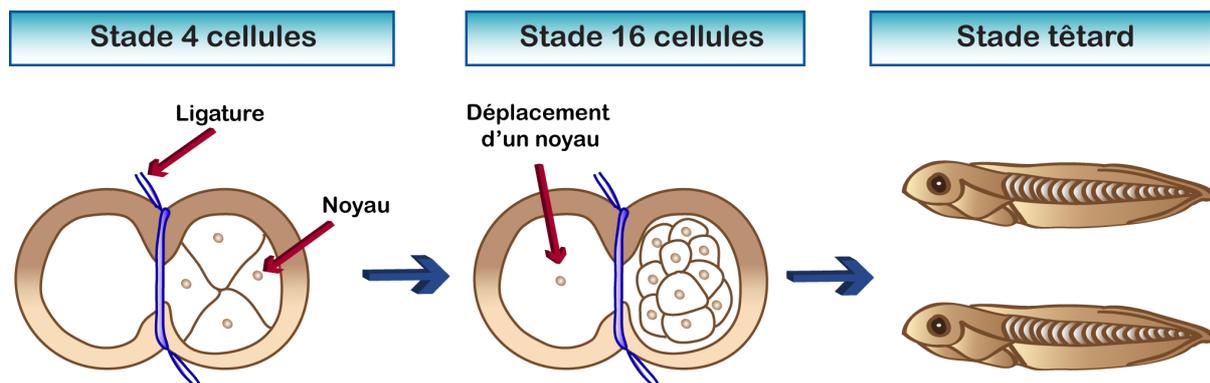
Un des acteurs principaux dans la détermination de l'axe dorso-ventral est la protéine Dishevelled (Dsh). Cette protéine d'origine maternelle, est accumulée dans des vésicules du cortex végétatif. Lors de la rotation corticale, ces vésicules sont transloquées dans la future région dorsale et libèrent leur contenu dans le cytoplasme. Dsh est une protéine inhibitrice de GSK-3 (Glycogène synthétase kinase 3). GSK-3 provoque la dégradation de la protéine cytoplasmique  $\beta$ -caténine, un facteur de transcription essentiel pour la formation des structures dorsales de l'embryon. Ainsi, dans la région dorsale, il y a enrichissement de Dsh, qui par conséquent inhibe l'activité de GSK-3, et donc la protéine  $\beta$ -caténine n'est pas dégradée. La  $\beta$ -caténine peut ainsi activer la transcription des gènes dorsaux, ce qui permet donc la formation des structures dorsales. A l'inverse, dans la région ventrale de l'embryon, en absence de Dsh, GSK-3 demeure active et peut provoquer la dégradation de  $\beta$ -caténine (figure 6). La déplétion de  $\beta$ -caténine conduit à une perte complète des structures dorsales, tandis que l'expression ectopique de cette protéine dans la région ventrale de l'embryon induit la formation d'un deuxième axe embryonnaire (Funayama et al., 1995; Heasman et al., 1994; Larabell et al., 1997). L'ensemble de ces résultats montre que la stabilisation de la  $\beta$ -caténine dans la future région dorsale est essentielle pour la formation des structures dorsales de l'embryon.

Dans le cortex végétatif, en plus de Dsh, se trouve un autre déterminant crucial : le facteur de transcription à boîte T, VegT. L'ARNm de VegT est présent dès l'ovogenèse et est nécessaire à la spécification de l'endoderme et du mésoderme ainsi qu'à la formation du centre de Nieuwkoop (Zhang et al., 1998). VegT régule l'expression des gènes de la famille Nodal, comme *Xnr1*, *Xnr2*, *Xnr4*, *Xnr5*, *Xnr6* et *Derrière* (Kofron et al., 1999; Sun et al., 1999; Takahashi et al., 2000; Xanthos et al., 2002). Ces gènes sont exprimés tout le long de l'axe dorso-ventral, et sont répartis selon un gradient décroissant selon l'axe dorso-ventral au stade blastula.



**Figure 7 – Représentation schématique de l'expérience de Hans Spemann en 1903 : l'asymétrie du développement.** Au stade quatre cellules, les deux blastomères dorsaux contenant le croissant gris ont été isolés des blastomères ventraux. Les blastomères contenant le croissant gris se développent et forme un embryon normal. Les blastomères dans lesquels le croissant gris est absent ne sont pas capables de se développer et forment une masse indifférenciée. (V : ventral ; D : dorsal).

(D'après Darribère, 2002)



**Figure 8 – Représentation schématique de l'expérience de Hans Spemann en 1903 : les déterminants essentiels au développement se trouvent dans le cytoplasme.** L'œuf fécondé est ligaturé afin d'isoler le noyau dans un seul compartiment cytoplasmique. Au stade 4 cellules seul le compartiment contenant les noyaux continue à se diviser. Au stade 16 cellules, la ligature a été desserrée et un noyau est passé dans le compartiment qui en était dépourvu. Ces deux compartiments ont continué leurs divisions et deux têtards viables se sont développés.

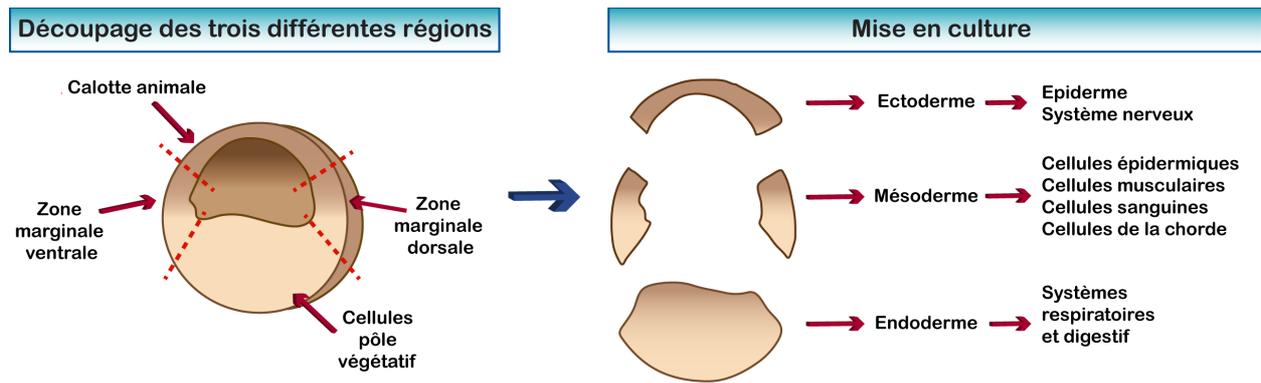
(D'après Darribère, 2002)

### 1.3. La segmentation

Après la fécondation, le zygote subit une succession rapide de divisions mitotiques sans croissance cellulaire, permettant ainsi le passage d'un état unicellulaire à un état pluricellulaire. Ces clivages donnent naissance à des cellules de plus en plus petites, appelées blastomères. L'apparition d'une cavité au sein de l'embryon, le blastocèle, définit le stade blastula.

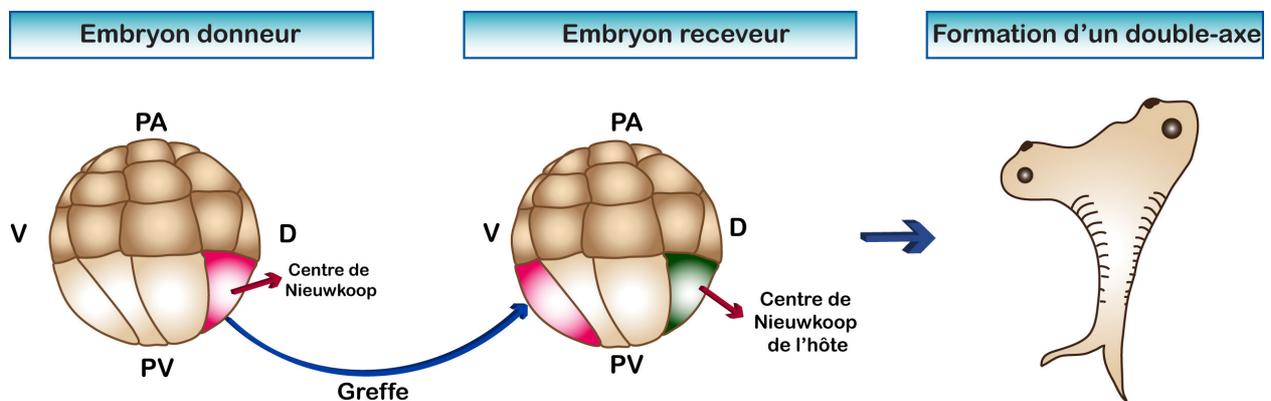
Chez l'amphibien, la segmentation est totale et inégale. En effet, les deux premiers plans de segmentation sont verticaux et méridiens parallèles à l'axe animal-végétatif et divisent l'œuf en deux puis en quatre cellules de taille identique, mais avec des compositions moléculaires différentes. En effet, Hans Spemann en 1903 a montré chez le triton (*Triton taeniatus*) que si les deux blastomères dorsaux contenant le croissant gris sont isolés au stade 4 cellules, ils sont capables de poursuivre leur développement et produire un embryon, tandis que les deux autres blastomères ventraux forment une masse indifférenciée constitué de cellules épidermiques, de mésenchyme et de cellules endodermiques (figure 7) (Spemann, 1903). Cette expérience est la première preuve de l'existence de déterminants qui contrôlent la réalisation du programme de développement dans la région du croissant gris. Ce biologiste a réalisé une autre expérience qui consistait à ligaturer un œuf fécondé de triton en deux afin d'isoler un compartiment cytoplasmique avec le noyau. Seul le compartiment contenant le noyau continue à se diviser. Au stade 16 cellules, la ligature est desserrée et un noyau passe dans la moitié qui en était dépourvue, puis elle est serrée à nouveau. Le développement se poursuit et 4 mois et demi plus tard, individus se sont développés. Quelques années plus tard, cette expérience a été répétée également chez le xénope (figure 8) (Newport and Kirschner, 1982). Les expériences de Spemann en 1903 et de Newport et Kirschner en 1982 ont ainsi montré qu'aux stades précoces, les déterminants capables de diriger un développement harmonieux se trouvent au niveau du cytoplasme et pas dans les noyaux qui sont génétiquement identiques. Elles montrent également que les blastomères, malgré leur taille identique, sont moléculairement différents dès le stade 4 cellules.

A partir du stade 4 cellules, les blastomères se divisent en taille inégale et au fur et à mesure du développement, ils forment une morula, puis blastula (avec la cavité du blastocèle localisée dans l'hémisphère animal). C'est à partir du stade blastula que la reprise de la transcription zygotique est observée. La désynchronisation des cycles de



**Figure 9 – Représentation schématique des expériences de Nieuwkoop et de Dale et Slack.** L'embryon au stade blastula a été découpé en trois régions distinctes selon l'axe pôle animal-végétatif. Ces régions ont été cultivées *in vitro* et des analyses histologiques ont été réalisées. Les cellules issues de la calotte animale donneront l'ectoderme. Les cellules de la zone marginale seront à l'origine du mésoderme. Les blastomères végétatifs formeront l'endoderme. Ces trois feuillet embryonnaires seront à l'origine des différents types cellulaires listés à droite.

(D'après Darribère, 2002)



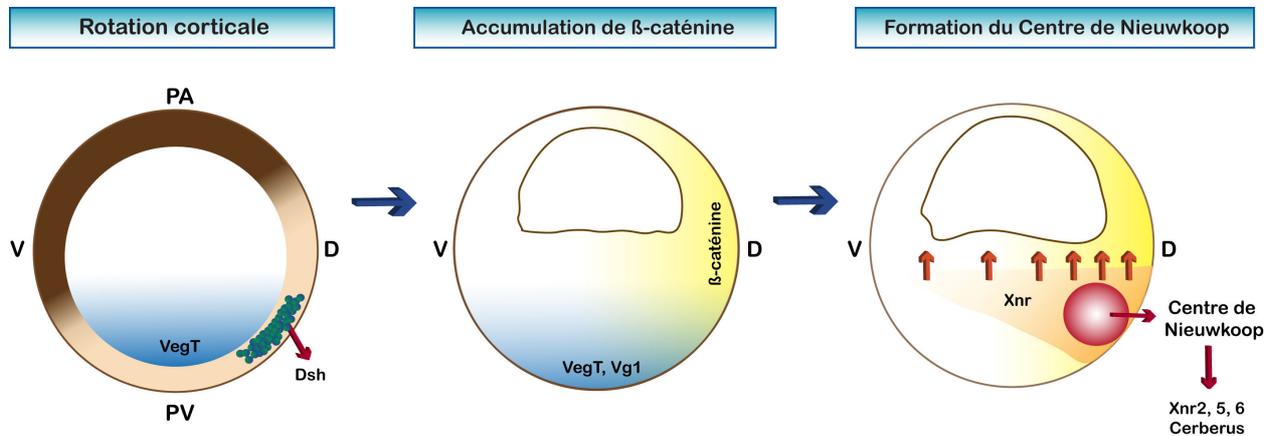
**Figure 10 – Représentation schématique des expériences de Gimlich et Gerhart en 1984 : le centre de Nieuwkoop.** Au stade 32 cellules, un blastomère végétatif dorsal (en rose) a été transplanté dans un autre embryon (receveur) dans la région ventrale. L'embryon receveur se développe et forme un embryon avec un axe surnuméraire. Cette expérience montre l'existence d'un centre inducteur dans la région dorsale (vert) appelé centre de Nieuwkoop. (PA : pôle animal ; PV : pôle végétatif ; V : ventral ; D : dorsal)

(D'après Boujard et al., 2016)

division et la reprise de la transcription caractérisent un événement important pour la suite du développement : la transition blastuléenne. C'est à partir de ce moment que les blastomères deviennent transcriptionnellement actifs pour la première fois (Kimelman, 1999; Newport, J., and Kirschner, M.).

En 1969, Nieuwkoop a isolé et cultivé *in vitro* trois régions distinctes de l'embryon au stade blastula : la calotte animale, la région végétative et la zone marginale. De façon isolée, la calotte animale ou l'hémisphère végétatif ne peuvent pas former de mésoderme. En revanche, la recombinaison des deux tissus conduit à la formation de structures mésodermiques, comme le muscle, le mésenchyme et la corde (Nieuwkoop, 1969). Ceci démontre que pour induire du mésoderme, il faut combiner les tissus ectodermiques et endodermiques. Cette expérience a également permis de montrer l'existence de trois types de cellules spécifiées au stade blastula, qui seront à l'origine des trois feuillet embryonnaires. Les cellules de la calotte animale donneront l'ectoderme, l'endoderme sera formé par les cellules du pôle végétatif, et le mésoderme se localisera dans la zone marginale de l'embryon. Des expériences complémentaires, en utilisant des marqueurs fluorochrome pour suivre la destinée cellulaire, ont permis de montrer que l'ectoderme donnera naissance à l'épiderme et au système nerveux, le mésoderme dérivera en muscles, tissu conjonctif, système urogénital et système vasculaire, et finalement l'endoderme sera à l'origine des systèmes respiratoire et digestif. De plus, d'autres expériences de recombinaison de blastomères individualisés ont montré l'existence de deux types de mésoderme : dorsal et ventral. Le mésoderme dorsal produit des cellules de la corde et des cellules musculaires alors que le mésoderme ventral est à l'origine des cellules mésenchymateuses, des érythrocytes et du mésothélium (figure 9) (Dale et al., 1985).

Des expériences *in vivo*, en utilisant des embryons de xénope au stade 64 cellules, ont également été réalisées par Gimlich et Gerhart en 1984. Ils ont montré que lorsqu'un blastomère issu de la région dorso-végétative a été transplanté dans la région ventrale d'un autre embryon, celui-ci induit la formation d'un deuxième axe embryonnaire (figure 10) (Gimlich, 1986; Gimlich and Gerhart, 1984). Ces expériences suggèrent l'existence d'un centre inducteur dans lequel des signaux dorsaux sont actifs et induisent la formation du mésoderme dorsal. Ce centre a été nommé centre de Nieuwkoop.



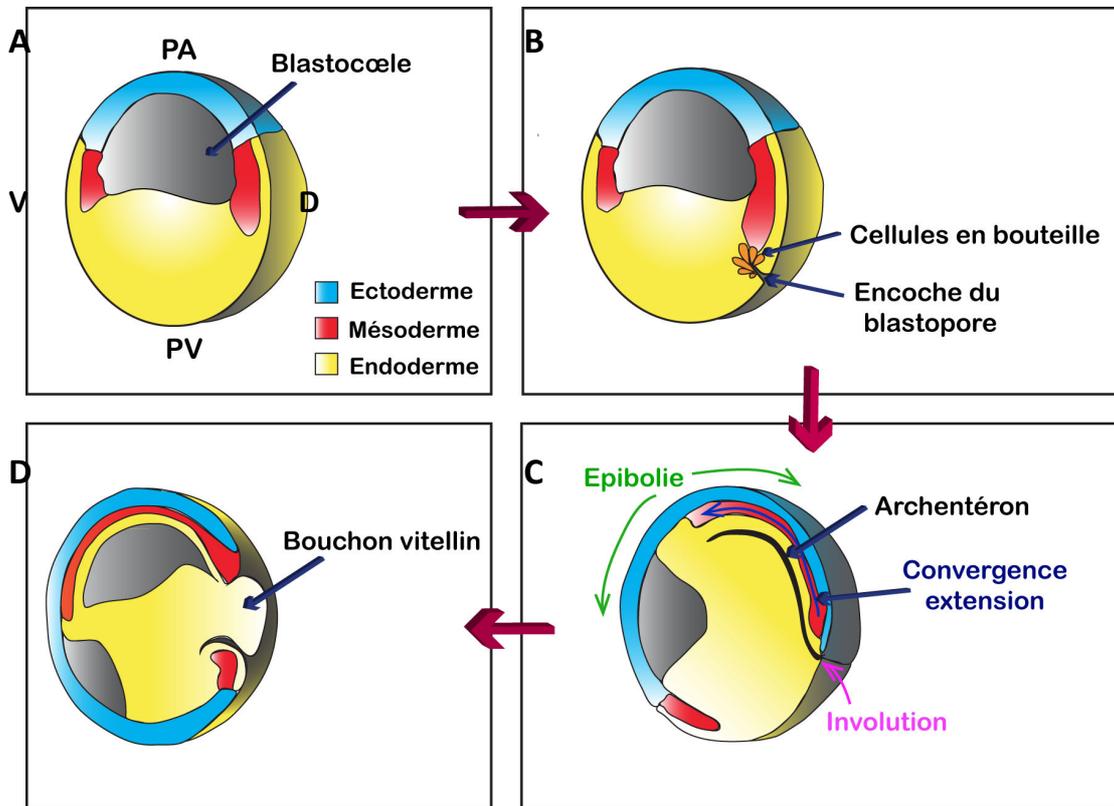
**Figure 11 – Modèle représentant les interactions moléculaires qui induisent le centre Nieuwkoop.** Après la fécondation, lors de la rotation corticale la protéine Dsh est libérée dans le cytoplasme de la région dorsale. L'ARNm de VegT est accumulé dans le cytoplasme de l'hémisphère végétatif (en bleu). Au stade blastula, il y a enrichissement de la  $\beta$ -caténine dans les noyaux des cellules de la future région dorsale (en jaune). Vg1, VegT et la  $\beta$ -caténine vont activer l'expression zygotique des protéines Nodal (Xnr, en orange). La région riche en Xnr et l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine permettent la formation du centre de Nieuwkoop (en rose). (PA : pôle animal ; PV : pôle végétatif ; V : ventral ; D : dorsal)

(D'après Darribère, 2002)

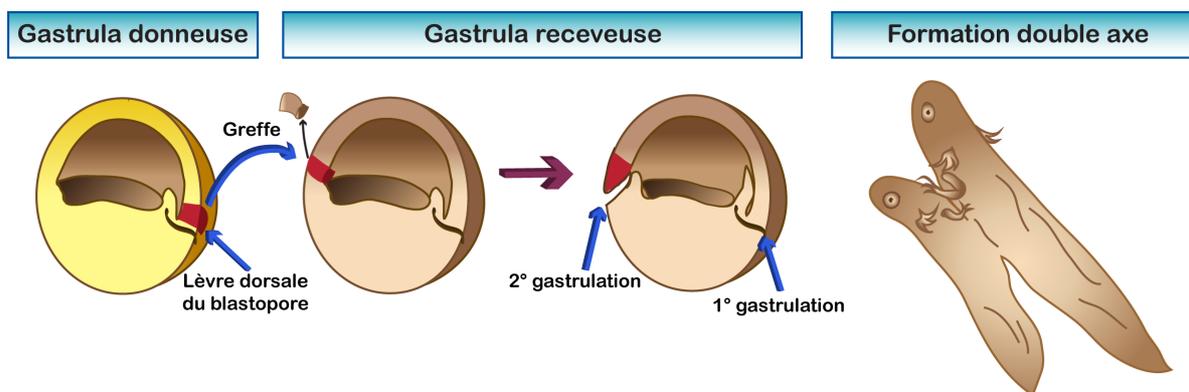
### 1.3.1. La nature moléculaire des inducteurs du mésoderme

De nombreux travaux ont été réalisés pour découvrir les molécules qui participent à l'induction du mésoderme. Ces facteurs doivent remplir un certain nombre de critères. Tout d'abord ils doivent être exprimés avant la transition blastuléenne. De plus, l'injection d'ARNm codant pour un inducteur mésodermique dorsal doit être susceptible d'induire la formation d'un second axe embryonnaire lorsqu'il est injecté dans la région ventrale de l'embryon, ou encore de restaurer la formation d'un embryon normal lorsque l'embryon a été irradié aux UV. Enfin, si cette molécule est incubée *in vitro* en présence des cellules du pôle animal, elle doit être capable d'induire du mésoderme. Des expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* ont permis d'isoler les membres de la famille des facteurs de croissance fibroblastiques, les FGF (Fibroblast Growth Factors) (Dale and Slack, 1987) et des facteurs de croissance transformants, les TGF- $\beta$  (Transforming Growth factors) (Rosa et al., 1988). Ces deux facteurs induisent différents types de tissus : les facteurs de la famille FGF induisent du mésoderme ventral alors que ceux de la famille TGF- $\beta$  sont plutôt associés aux structures mésodermiques dorsales.

Le centre de Nieuwkoop est formé suite à l'accumulation d'un certain nombre de protéines. La formation de ce centre requiert l'implication de divers facteurs et peut se résumer de la manière suivante : au cours de l'ovogenèse, les ARNm maternels Vg1 et VegT et les protéines Dsh sont accumulés dans l'hémisphère végétatif cortical. Lors de la rotation corticale, le facteur de transcription VegT est localisé dans le cytoplasme des cellules de l'hémisphère végétatif tandis que Vg1 et Dsh se restreignent dans la future région dorsale. Vg1, VegT et la  $\beta$ -caténine activent l'expression zygotique des protéines de la famille Nodal, (chez le xénope elles sont appelées Xnr, pour Xenopus Nodal Related) et un gradient de ces protéines se met en place dans l'hémisphère végétatif. C'est l'accumulation de ces protéines couplée à l'activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ caténine qui permettent la formation du centre de Nieuwkoop (figure 11). Ce centre est caractérisé par l'expression de plusieurs facteurs (Nodal, TGF- $\beta$ , Siamoïse, entre autres) qui induisent les blastomères à produire du mésoderme dorso-antérieur. En ce qui concerne la région ventrale, la combinaison des protéines de la famille FGF avec les faibles concentrations de Xnr induit la formation du mésoderme ventral.



**Figure 12 – Modèle représentant les différents mouvements de la gastrulation.** (A) Stade jeune gastrula avec les trois feuillets embryonnaires représentés (ectoderme en bleu, mésoderme en rouge et endoderme en jaune). (B) Les cellules endodermiques qui s'allongent vers l'intérieur de la endodermique s'appellent cellules en bouteille (en orange). (C) Ces mouvements forment l'encoche du blastopore. L'ensemble de la zone marginale subit des mouvements de convergence et extension et les cellules endodermiques des mouvements d'involution. Les cellules de l'hémisphère animal subissent les processus d'épibolie et recouvrent la surface de l'embryon. Au cours de la gastrulation le blastopore se creuse d'une cavité appelée archentéron. (D) À la fin de la gastrulation l'allongement du sillon blastoporal permet de délimiter le bouchon vitellin. Il sera internalisé dans l'embryon et recouvert des tissus dorsaux et latéro-dorsaux. (PA : pôle animal ; PV : pôle végétatif ; V : ventral ; D : dorsal) (D'après GILBERT, 1994)



**Figure 13 – Représentation schématique des expériences de Spemann et Mangold en 1924.** La lèvre dorsale du blastopore d'une gastrula donneuse a été greffée dans la région ventrale d'une gastrula receveuse en respectant l'orientation de l'axe du pôle animal-végétatif. Au cours de la gastrulation, un deuxième site d'invagination se met en place (2° gastrulation) dans la région greffée. L'embryon continue à se développer jusqu'à former un double axe. Les cellules issues de la lèvre dorsale du blastopore ont ainsi induit la formation d'un embryon secondaire. Cette région représente un centre inducteur et organise la mise en place du système nerveux central. Elle a ainsi été appelée « centre organisateur de Spemann ». (D'après GILBERT, 1994)

## 1.4. La gastrulation

La gastrulation est caractérisée par des mouvements cellulaires coordonnés qui permettent la mise en place des trois feuillets embryonnaires. L'ectoderme recouvrira la surface de l'embryon et sera à l'origine de l'épiderme et du système nerveux central. Les cellules équatoriales du mésoderme vont se positionner à l'intérieur de l'embryon et produiront la chorde, les somites, et les cellules sanguines. Enfin, les cellules de l'endoderme en position profonde vont se différencier et former l'épithélium du tube digestif ou des voies respiratoires. Ainsi, des mouvements cellulaires d'invagination, d'involution, de convergence-extension, de migrations cellulaires et d'épibolie aboutissent au recouvrement de l'embryon par le feuillet ectodermique, à la mise en place du mésoderme entre l'ectoderme et l'endoderme et à l'internalisation du feuillet endodermique. Ce dernier événement permet la formation d'une nouvelle cavité appelée archentéron, la lumière de l'intestin primitif (figure 12).

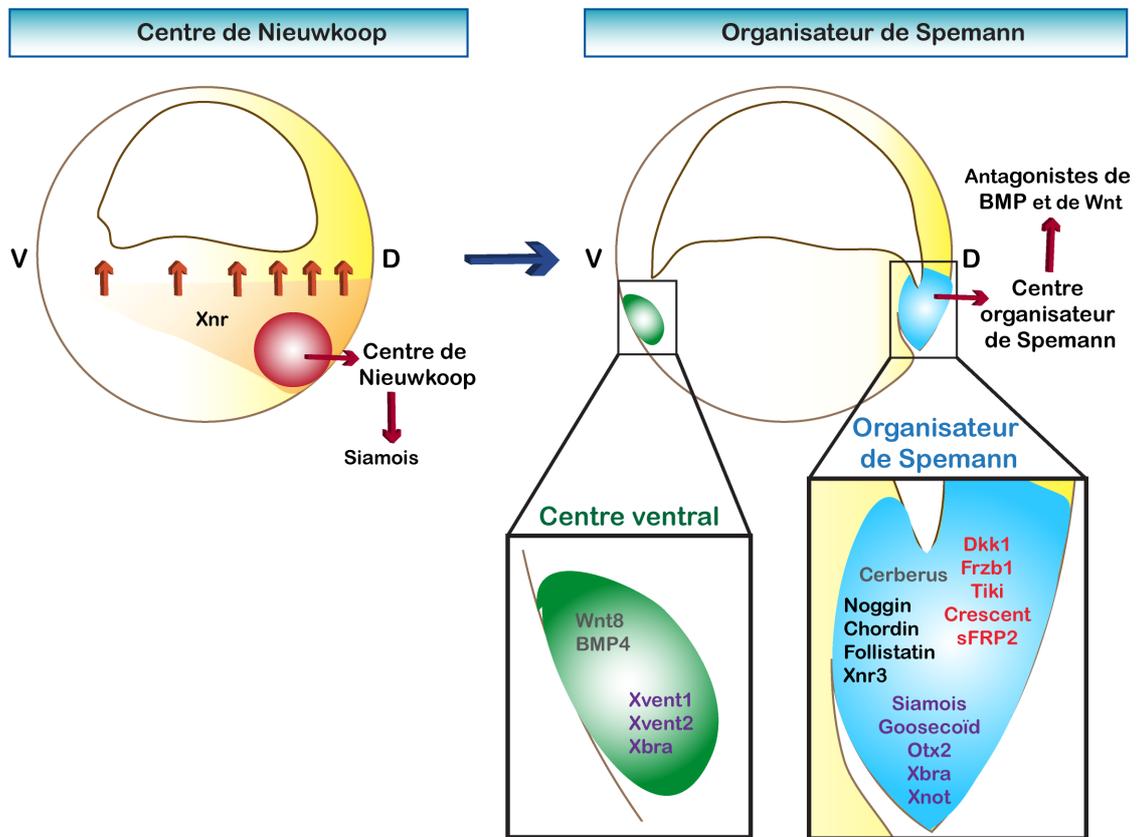
### 1.4.1. Le centre organisateur de Spemann

Des expériences de transplantation réalisées chez le triton par Spemann et Mangold en 1924, ont permis de découvrir l'existence d'un centre organisateur des axes embryonnaires dans la région de la lèvre dorsale de l'embryon. Cette région, appelé centre organisateur de Spemann et Mangold, contient un territoire capable de spécifier les différentes structures de l'axe embryonnaire (figure 13) (Spemann and Mangold, 1924).

### 1.4.2. Induction du centre organisateur de Spemann

Le centre organisateur de Spemann correspond au mésendoderme dorsal, territoire présomptif de la chorde, de la plaque préchordale et de l'endoderme pharygien.

Au stade blastula, les activités combinées de Vg1 et VegT avec les concentrations élevées de  $\beta$ -caténine, génèrent un gradient dorso-ventral des protéines de la famille Nodal, les Xnrs (Xnr1, Xnr2, Xnr4, Xnr5 et Xnr6), dans l'endoderme. Ce gradient de



**Figure 14 – Modèle représentant la formation du centre organisateur de Spemann et sa nature moléculaire.** Les concentrations élevées de Xnr (orange) et le gène Siamois exprimé par le centre de Nieuwkoop participent à la formation du centre organisateur de Spemann (bleu). Cet organisateur est localisé dans le mésendoderme dorsal et exprime des antagonistes des voies BMP (en noir) et Wnt (en rouge). Dans la région ventrale, il y a formation d'un centre ventral (vert) dans lequel des facteurs ventralisants comme BMP4 et Wnt8 sont exprimés. Dans les encadrés, les différentes molécules sécrétées sont représentées : les facteurs de transcription (en violet), les protéines extracellulaires (en gris), les antagonistes des voies BMP (en noir) et Wnt (en rouge). (V : ventral ; D : dorsal).

(D'après Carron and Shi, 2016)

concentration conduit la spécification du mésoderme : les faibles concentrations de Xnr permettent la formation du mésoderme ventral, tandis que dans la région où ces concentrations sont élevées, il y aura la formation du mésoderme dorsal et du centre organisateur de Spemann. Le centre de Nieuwkoop exprime également *Siamois* un gène à homéoboîtes qui fonctionne comme un intermédiaire entre les facteurs maternels et la formation de l'organisateur de Spemann (Carron and Shi, 2016). Ainsi, le centre organisateur de Spemann, localisé dans la zone marginale dorsale, est induit suite aux signaux envoyés par le centre de Nieuwkoop (figure 14).

### 1.4.3. Nature moléculaire du centre organisateur de Spemann

Le centre organisateur de Spemann est une source de facteurs qui permettent la régionalisation des axes dorso-ventral et antéro-postérieur. Au niveau moléculaire, l'organisateur de Spemann induit l'expression de deux catégories de facteurs antagonistes : les antagonistes de BMP (Bone morphogenetic protein) et de Wnt. La partie de l'organisateur troncal exprime des antagonistes de la voie de signalisation BMP, comme Chordin, Noggin, Follistatin et Xnr3 et des facteurs de transcription telles que Xnot et Xbra (*Xenopus brachyury*) (von Dassow et al., 1993; Hansen et al., 1997; Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Sasai et al., 1994; Smith and Harland, 1992; Smith et al., 1991). Il est important de noter Xbra est un facteur de transcription qui n'est pas exclusivement exprimé dans le centre de Spemann. En effet, il est exprimé dans le mésoderme en général et n'est pas spécifique de ce centre organisateur. L'organisateur de Spemann exprime également des gènes inhibiteurs de la signalisation Wnt comme *Crescent*, *Tiki*, *Frzb-1* (*Frizzled-Related Protein 1*), *Dkk1* (*Dickkopf-related protein 1*) et *sFRP2* (*Secreted frizzled-related protein 2*), ainsi que *Cerberus* et d'autres facteurs de transcription comme *Goosecoid* ou *Otx2* (*Orthodenticle Homeobox 2*) (Cho et al., 1991; Glinka et al., 1998; Leyns et al., 1997; Pannese et al., 1995; Pera and De Robertis, 2000; Wang et al., 1997; Zhang et al., 2012).

#### 1.4.3.1. Les antagonistes de BMP

Au stade gastrula, l'expression de Noggin, Chordin et de Follistatin est restreinte au centre organisateur de Spemann. Ces trois protéines sont capables de se lier



directement aux BMPs, ce qui empêche leur liaison à leurs récepteurs (Fainsod et al., 1997; Piccolo et al., 1996; Zimmerman et al., 1996).

L'inhibition de *Chordin*, par l'injection d'oligonucléotides de type morpholino, conduit à la formation d'embryons avec des structures dorso-antérieures réduites (Oelgeschläger et al., 2003). La surexpression de *Chordin* est capable de restaurer le phénotype ventralisé des embryons irradiés aux UV. Dans ces embryons, les structures dorsales sont complètement formées. Ce phénotype est également restauré lors de la surexpression de *Noggin*. Ces expériences montrent que ces deux protéines ont des propriétés dorsalisantes et sont nécessaires au développement embryonnaire (Sasai et al., 1995; Smith and Harland, 1992).

Follistatin est un autre inhibiteur des BMPs et son expression est induite par l'activine. Comme *Noggin* et *Chordin*, cette protéine est capable d'induire la dorsalisation des embryons. En effet, l'injection de l'ARNm *Follistatin* dans la région ventrale de l'embryon induit la formation d'un axe secondaire partiel et la dorsalisation des tissus issus de la zone marginale ventrale. De plus, la surexpression de Follistatin dans les explants de la calotte animale conduit à la formation du tissu neural (Fainsod et al., 1997; Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Sasai et al., 1995).

Enfin, *Xnr3*, un autre antagoniste de BMP, est un facteur sécrété par l'organisateur de Spemann et appartient à la famille TGF- $\beta$ . Lorsque *Xnr3* est surexprimé dans les explants de la calotte animale, il est capable d'induire directement du tissu neural (Hansen et al., 1997).

### 1.4.3.2. Les antagonistes de Wnt

Chez le xénope, l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine au niveau des signaux planaires de l'ectoderme neural induit la postériorisation du tissu neural préalablement induit pendant la gastrulation. Dans la région antérieure de l'embryon, l'activité de cette voie de signalisation est inhibée par *Dkk1-1* et *Frzb-1*, ce qui permet le développement dorso-antérieur (Glinka et al., 1998; Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997).

*Tiki1* est une protéine transmembranaire qui antagonise l'activité de la voie de signalisation Wnt, en agissant comme une protéase qui clive certains résidus de la



protéine Wnt, induisant ainsi des oligomères Wnt oxydés. Zhang et ses collaborateurs ont montré que l'injection d'un oligonucléotide de type Morpholino de Tiki1, dans la région dorsale de l'embryon, induit des défauts antérieurs, comme la perte des structures du cerveau, la diminution ou la perte de la glande adhésive et des yeux. Cette équipe a ainsi montré que Tiki1 est requis pour le développement antérieur (Zhang et al., 2012).

Enfin, les deux membres de la famille sFRPs (Secreted Frizzled-related proteins), sFRP2 et Crescent, régulent les zones de diffusion de Wnt8 et Wnt11. En revanche, malgré le fait que ces deux protéines ont été décrites comme des modulateurs négatifs de la voie de signalisation Wnt, elles peuvent agir aussi comme des activateurs de cette même voie. En effet, il a été montré que Wnt8, qui est diffusé par sFRP, peut activer la voie Wnt, ce qui permet la mise en place des structures ventro-postérieures (Mii and Taira, 2009).

### 1.4.3.3. Les facteurs de transcription Xnot, Xbra, Goosecoïd et Otx-2

*Siamois* est un gène cible de la  $\beta$ -caténine. Ce facteur de transcription permet l'induction de l'expression de *Goosecoïd* (Moon and Kimelman, 1998), un gène qui est exprimé à partir de la transition blastuléenne dans la partie la plus végétative de la zone marginale dorsale. *Goosecoïd* est aussi un facteur de transcription qui joue un rôle important dans la fonction dorsalisante car il peut conduire à la formation d'un deuxième axe embryonnaire lorsqu'il est exprimé ectopiquement dans la région ventrale de l'embryon (Cho et al., 1991).

*Otx2* est exprimé dès l'ovogénèse à des faibles doses, puis son expression augmente à partir de la mise en place de la transcription zygotique, dans le mesendoderme préchordal et dans le neuroectoderme antérieur. La surexpression d'*Otx2* conduit à l'apparition d'une deuxième glande adhésive et des axes secondaires partiels. Ces embryons ont les structures troncales réduites. De plus, la surexpression d'*Otx2* dans des embryons irradiés aux UV, restaure le phénotype de ventralisation. Ces embryons sont capables de former la glande adhésive, les muscles, la notochorde et les tissus neuraux. *Otx2* est un gène inducteur du tissu neural antérieur et joue un rôle crucial dans la formation des axes embryonnaires et en particulier dans la formation de la spécification de la région antérieure de la tête (Pannese et al., 1995).



Les gènes à homéoboîte *Otx2* et *Goosecoïd* sont exprimés dans le mésoderme préchordal et jouent un rôle essentiel dans la spécification de la plaque neurale au cours de la gastrulation. Ces deux facteurs de transcription agissent comme des inhibiteurs de *Xbra* pour permettre le développement antérieur (Carron et al., 2005; Latinkić et al., 1997).

*Xbra* est un facteur de transcription à boîte T. Il est exprimé dans le centre de Spemann et aussi au niveau des cellules du mésoderme présomptif, autour du blastopore dès le début de la gastrulation. Son expression est induite par la voie TGF- $\beta$  et par l'Activine (Smith et al., 1991). L'expression ectopique de *Xbra* dans la calotte animale est suffisante pour induire la formation de tissus mésodermiques (Cunliffe and Smith, 1992). De plus, la surexpression d'une construction dominante négative de *Xbra* conduit à la formation d'embryons sans chorde et sans queue, montrant ainsi que le mésoderme postérieur (troncal et caudal) est absent. Il est également important de noter que *Xbra* est spécifiquement requis pour les mouvements de convergence-extension du mésoderme (Conlon et al., 1996).

*Xnot* est exprimé dans le mésoderme chordal au cours de la gastrulation (von Dassow et al., 1993). Ce facteur de transcription se comporte comme un répresseur de la transcription au moment de la formation de la notochorde, agissant ainsi comme un inducteur de la notochorde. C'est le gène *Goosecoïd* qui agit en amont de *Xnot* pour maintenir son expression et pour permettre la formation de ce tissu (Yasuo and Lemaire, 2001).

*Xbra* et *Xnot* sont exprimés dans le mésoderme chordal au cours de la gastrulation et ces deux facteurs interagissent de manière fonctionnelle pour permettre la formation de la partie troncale et de la tête (Carron and Shi, 2016; von Dassow et al., 1993; Smith et al., 1991).

#### 1.4.3.4. La protéine Cerberus

*Cerberus* est un gène qui code pour une protéine exprimée dans l'endoderme antérieur de l'organisateur de Spemann. Son expression ectopique conduit à la formation d'un deuxième axe avec une tête complète. Chez le xénope, *Cerberus* est une protéine capable de se lier et d'inhiber l'activité de *Wnt8*, *BMP4* et de *Nodal* et est ainsi capable d'induire la formation des tissus neuraux et de la tête. Dans la calotte



animale, il est capable d'activer l'expression de *Otx2* (Bouwmeester et al., 1996; Piccolo et al., 1999).

#### **1.4.4. La région ventrale possède un centre activateur des signaux ventro-postérieurs**

Au stade gastrula, la zone marginale ventrale de l'embryon possède un centre activateur dans lequel se concentre un ensemble de signaux capables de déterminer la région ventrale. Ce centre joue un rôle dans la régionalisation de l'axe dorso-ventral et aussi antéro-postérieur. Cette région exprime principalement *Wnt8* et *BMP4*, deux facteurs qui induisent du mésoderme de nature ventrale (revoir figure 14).

##### **1.4.4.1. BMP4**

Les BMPs appartiennent à la famille des TGF- $\beta$ . Ces protéines participent à l'établissement du plan d'organisation primaire de l'embryon.

*Bmp4* a une expression maternelle et zygotique et au stade gastrula il est détecté dans la zone marginale ventrale (Fainsod et al., 1994). La surexpression de *Bmp4* dans la région dorsale conduit à la ventralisation des embryons avec les structures antérieures absentes (Dale et al., 1992), alors que l'injection d'un ARNm codant pour une forme dominante négative de BMP4 induit la formation d'un deuxième axe embryonnaire et donc à la dorsalisation de l'embryon (Suzuki et al., 1994). Ceci suggère que le signal BMP4 est nécessaire au développement ventral et postérieur. De plus, il a été montré que l'activation de la voie BMP4 est cruciale pour la formation de l'épiderme à partir des cellules de l'ectoderme présomptif ventral (Dosch et al., 1997; Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995).

Les facteurs de transcription *Xvent1*, *Xvent2* et *Mix1* sont des gènes cibles de BMP4 (Gawantka et al., 1995; Mead et al., 1996; Onichtchouk et al., 1996). Ces trois facteurs peuvent ventraliser le mésoderme dorsal. *Xvent1* et *Xvent2* sont deux gènes à homéoboîtes qui sont exprimés dans la zone marginale ventrale au stade gastrula. L'expression de ces deux gènes induit la formation de la lame latérale, alors que l'expression de *Xvent2* seul conduit à la formation des somites (Onichtchouk et al., 1998).



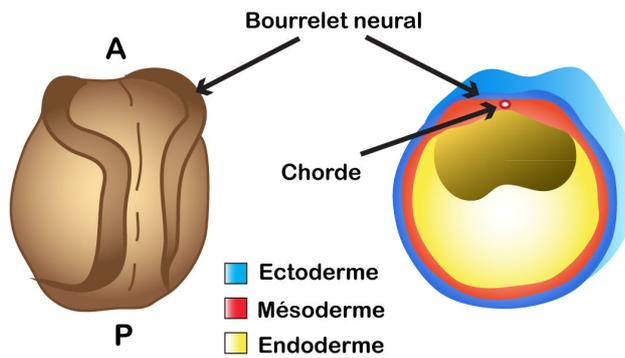
Ces deux gènes cibles de BMP4 participent à la spécification du mésoderme ventral et au maintien du destin ventro-postérieur en inhibant l'activité du centre organisateur de Spemann.

#### 1.4.4.2. *Wnt8*

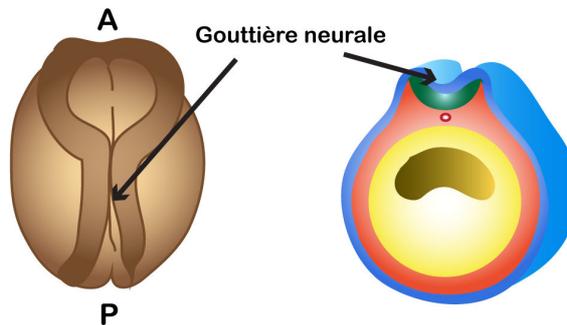
*Wnt8* est exprimé uniquement dans le mésoderme ventro-latéral à partir de la transition blastuléenne, suggérant ainsi que ce gène a un rôle dans la régionalisation de ce tissu. Par ailleurs, *Wnt8* est exprimé en réponse aux FGFs et à l'Activine, ce qui suggère que ce gène agit en aval des inducteurs du mésoderme (Christian et al., 1991; Smith and Harland, 1991). L'injection de *Wnt8* dans l'embryon conduit à des phénotypes différents en fonction du stade auquel cette protéine est surexprimée. En effet, lorsque l'ARNm codant pour *Wnt8* est injecté au stade 32 cellules, l'embryon est dorsalisé et il y a la formation d'un axe surnuméraire (Smith and Harland, 1991). En revanche, si c'est le plasmide de *Wnt8* (sous le contrôle d'un promoteur activé à la transition blastuléenne) qui est injecté, et dans ce cas, l'expression de *Wnt8* ne débute qu'à partir de la transition blastuléenne, l'embryon formé n'a pas les structures de la tête, il est donc ventralisé (Christian and Moon, 1993). De plus, la surexpression d'une forme dominante négative de *Wnt8* dans la zone marginale conduit à la perte des somites, indiquant que *Wnt8* est nécessaire à la spécification du mésoderme paraxial (Hoppler et al., 1996).

En conclusion, au cours de la gastrulation, il existe donc des molécules ventralisantes, comme *Wnt8* et BMP4, et des molécules dorsalisantes comme Frzb, Chordin et Noggin, responsables de la régionalisation dorso-ventrale du mésoderme. Ainsi, le centre organisateur de Spemann apparaît comme une source de facteurs de transcription et de signaux diffusibles qui agissent comme des inhibiteurs des facteurs ventralisants et qui ont ainsi un effet dorsalisant. D'une part, cette structure multifonctionnelle a le rôle d'organiser l'axe dorso-ventral. D'autre part, les cellules issues du centre organisateur de Spemann induisent l'ectoderme dorsal à se convertir en tissu neural.

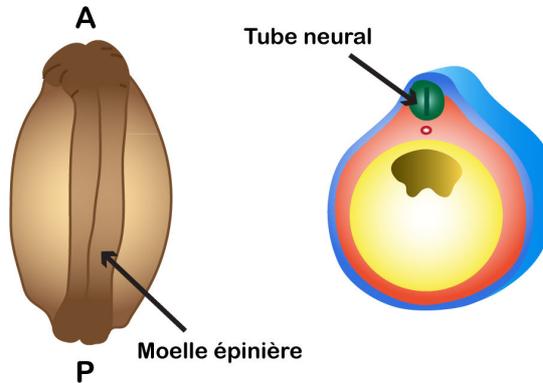
### 1. Epaissement et soulèvement



### 2. Enroulement



### 3. Fermeture et isolement du tube neural



**Figure 15 – Etapes de la neurulation.** Représentation schématique de embryons au stade neurula. (A gauche) Vue dorsale. (A droite) Coupe transversale. **1.** La notochorde se forme à partir des cellules du mésoderme axial juste après la fin de la gastrulation. **2.** Le soulèvement des bourrelets neuraux et la courbure de la plaque neurale permettent la formation de la gouttière neurale et les replis neuraux se dirigent l'un vers l'autre dans un mouvement d'enroulement. **3.** Les bourrelets neuraux fusionnent permettant la fermeture du tube neural. Le tube neural va se différencier selon l'axe antéro-postérieur. (A : antérieur ; P : postérieur).

(D'après Darribère, 2002)

## 1.5. La neurulation

Au cours de la gastrulation, les cellules issues du mésoderme dorsal (issu du centre organisateur de Spemann) migrent à l'intérieur de l'embryon et sont donc à l'origine de l'induction du tube neural. La fin de la gastrulation est marquée par la fermeture du blastopore au niveau postérieur de l'embryon. A partir de cette étape, l'embryon commence à s'allonger selon l'axe antéro-postérieur. La neurulation va ainsi permettre de finaliser la mise en place du plan d'organisation primaire de l'embryon et de modeler le système nerveux du côté dorsal à partir de l'ectoderme dorsal induit au cours de la gastrulation. En effet, c'est au cours de cette étape que les cellules de l'ectoderme dorsal s'épaississent et s'allongent selon l'axe antéro-postérieur et forment la plaque neurale (figure 15).

## 1.6. L'organogenèse

L'étape suivante correspond à l'organogenèse, la phase pendant laquelle les trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) mis en place au cours des étapes précédentes, évoluent et se différencient en organes. Elle se déroule pendant le stade de bourgeon caudal puis les stades larvaires. Le bourgeon caudal correspond au stade où l'embryon s'est globalement allongé selon l'axe antéro-postérieur. A partir de ce stade, les yeux, la glande adhésive et les somites commencent à être bien définis. Au cours de l'organogenèse, l'ectoderme va se différencier en système nerveux et épiderme. Le mésoderme produira la chorde dans la région dorsale de l'embryon. Au niveau latéral de la chorde, le mésoderme somitique sera à l'origine du tissu conjonctif, des os, des muscles, du derme et du cartilage. Le mésoderme adjacent formera le système urinaire, les conduits génitaux, le système vasculaire, le cœur, les cellules sanguines et les composants des membres. Enfin, l'endoderme produira les épithéliums respiratoire et digestif. A l'issue de l'organogenèse, l'embryon au stade larvaire va se libérer de son chorion, ce qui lui permettra de nager librement. A ce stade, l'embryon sera nommé têtard. Le têtard mènera une vie aquatique libre aidée par une respiration de type branchial et la présence d'une région caudale différenciée en nageoire. La métamorphose, impliquant la des remaniements internes, notamment au niveau des organes, et aussi externe, comme la formation des pattes ou la disparition de la queue, conduira au développement d'une grenouille adulte (Darribère, 2002).



## **2. Résumé : les acteurs moléculaires mis en jeu au cours de la mise en place des axes embryonnaires**

### **2.1. Polarisation de l'axe dorso-ventral**

Comme nous avons vu précédemment, la polarité dorso-ventrale est établie dès les premières étapes du développement embryonnaire. La fécondation engendre la rotation corticale, qui, à son tour, induit l'activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine dans la région dorsale de l'embryon. Ceci permet la formation du centre de Nieuwkoop dans la partie dorsale de l'hémisphère végétatif. L'activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine en combinaison avec les molécules sécrétées par le centre de Nieuwkoop permettent la formation du centre organisateur de Spemann. Dans la région ventrale, il y a la formation d'un centre activateur des signaux ventro-postérieurs. Ces deux régions de la partie dorsale et ventrale émettent des signaux antagonistes pour permettre la régionalisation de l'axe dorso-ventral et aussi de l'axe antéro-postérieur.

### **2.2. Polarisation de l'axe antéro-postérieur**

Des études ont montré que différents signaux provenant du centre organisateur de Spemann, localisé dans la région dorsale, sont nécessaires pour induire les structures antéro-postérieures du tube neural. La polarité antéro-postérieure dépend ainsi de l'axe dorso-ventral.

La voie de signalisation Wnt joue un rôle crucial dans la spécification de l'axe antéro-postérieur. En effet, avant la transition blastulienne, les ligands Wnt induisent la postériorisation de l'embryon, alors que les antagonistes Wnt, tels que GSK-3 ou DKK1, conduisent à son antériorisation. Ainsi, dans la région postérieure il y a une forte concentration de l'activation de la voie Wnt, alors que dans la région antérieure le degré d'activation de cette voie est plus faible. Ceci pourrait s'expliquer par la présence des antagonistes de Wnt dans la région antérieure. De plus, des concentrations importantes de Xnr permettent la formation du mésoderme axial

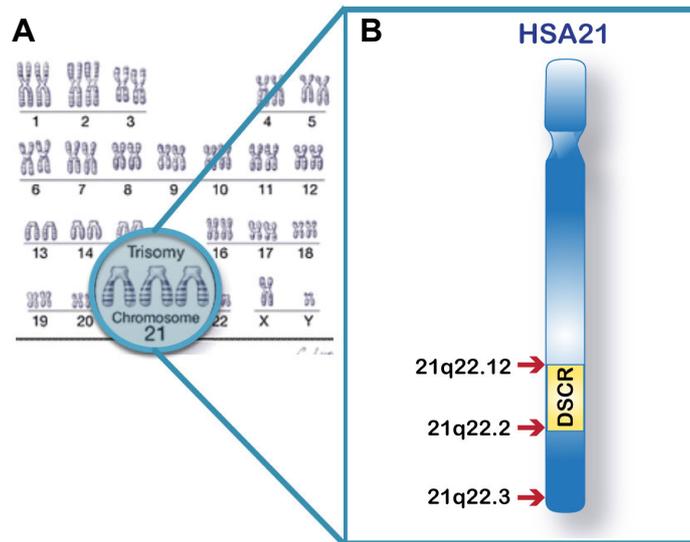


antérieur (préchordal) tandis que des concentrations plus faibles de Xnr sont à l'origine du mésoderme axial postérieur (chordal).

### 2.3. Autres facteurs impliqués dans la mise en place des axes embryonnaires

Nous avons vu que les polarités dorso-ventrale et antéro-postérieure se mettent en place suite à une régulation stricte de différents gènes. Au niveau moléculaire, nous avons vu que les différents facteurs impliqués dans la mise en place des axes peuvent être soit activés soit réprimés. Par exemple, lors de la régionalisation de l'axe dorso-ventral, les facteurs de transcription Goosecoïd et Xvent-1 se répriment mutuellement (Carron and Shi, 2016). Ceci montre que des mécanismes de répression sont importants au cours de la mise en place des axes embryonnaires.

Des mécanismes de dérépression génique sont également importants lors de ces processus. Par exemple, mon équipe a mis en évidence un nouveau mécanisme de dérépression que je vous détaillerai dans le chapitre suivant. Très brièvement, ils ont montré que Xdscr6 est un inducteur du mésoderme dorsal et du tissu neural. Ce gène est un homologue de *Dscr6* humain, un gène localisé dans la région DSCR. Mon équipe a montré que XDSCR6 est capable de lever la répression induite par les membres de la famille polycomb au cours de la mise en place des axes embryonnaires (Li et al., 2013).



**Figure 16 – Localisation chromosomique de la région DSCR. (A)** La trisomie 21 est une anomalie chromosomique provoquée par la présence d'un segment de chromosome ou d'un chromosome surnuméraire sur la 21<sup>ème</sup> paire. **(B)** La région DSCR (Down syndrome critical region) est localisée sur le bras long du chromosome 21 humain (HSA21), plus précisément entre les bandes 21q22.1 et 21q22.3.

(D'après Montoya et al., 2011)

## C. Les gènes de la famille DSCR

### 1. Généralités de la trisomie 21

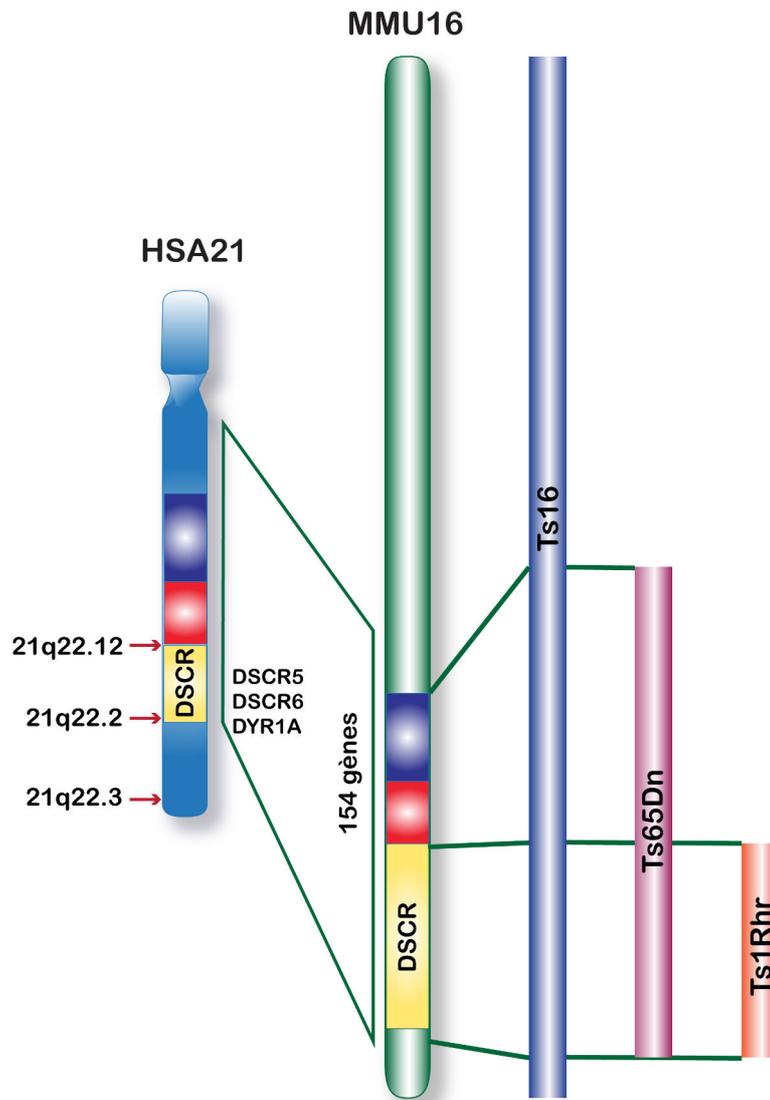
La description détaillée des caractéristiques de personnes atteintes de trisomie 21 a été réalisée pour la première fois, en 1866, par le Dr. John Landgon Down, qui a attribué son nom à cette anomalie. Dans les années 50, l'origine chromosomique de cette trisomie a été mise en évidence par le Professeur Jérôme Lejeune et son équipe. Ils ont en effet montré la présence d'un chromosome surnuméraire dans la 21<sup>ème</sup> paire (Lejeune et al., 1959). Le syndrome de Down est une des pathologies humaines les plus fréquentes à la naissance avec un cas sur environ 700 à 1000 naissances (Olson et al., 2004).

Le syndrome de Down se manifeste lors du développement embryonnaire et conduit à l'apparition de traits phénotypiques variés. Il est caractérisé par plusieurs anomalies dans l'apprentissage, la mémoire, le langage et aussi dans la plupart des cas le retard mental. Au niveau physique, les personnes atteintes présentent un profil facial plat, les yeux en forme d'amande, une racine de nez aplatie, de petites oreilles, des membres plus petits, une petite tête et des malformations cardio-vasculaires et gastro-intestinales.

L'étude moléculaire, génotypique et phénotypique sur des patients atteints de trisomie 21 a permis d'établir des cartes phénotypiques, identifiant des segments chromosomiques liés au syndrome. Ces segments ont été décrits comme étant présents dans la région 21q22 et responsables des caractéristiques cliniques principales du phénotype du syndrome de Down. Une hypothèse a ainsi été posée : l'existence d'une région critique responsable des caractéristiques des patients atteints, appelée DSCR (Delabar et al., 1993).

### 2. La région DSCR (Down Syndrom Critical Region)

Chez l'Homme, DSCR est localisée dans la région HSA21q22 (human chromosome 21) (figure 16). Des chercheurs ont montré que cette région pourrait être suffisante pour reproduire partiellement les phénotypes des patients atteints de trisomie 21, notamment



**Figure 17 – Les différents modèles murins de la Trisomie 21.** Le chromosome murin (MMU16) contient 715 gènes au total, dont 154 sont orthologues au chromosome 21 humain (HSA21). A droite – les modèles transgéniques murins avec les régions dupliquées dans chacun des cas.

(D'après Antonarakis et al., 2004)

le retard mental (Delabar et al., 1993; Korenberg et al., 1994). Cependant, des études plus récentes ont montré que cette région n'est pas aussi restreinte et qu'il existe d'autres régions capables d'induire d'autres caractéristiques de cette pathologie (Lyle et al., 2009).

## 2.1. DSCR dans les modèles murins

La région DSCR a été étudiée plus en détail dans les modèles murins. Le bras long du chromosome 21 humain contient 430 gènes dont 293 trouvent leur homologue dans le génome de la souris. Ils sont positionnés dans le même ordre et la même orientation. Chez la souris, une grande partie de ces gènes (154 orthologues) se localisent dans une région du chromosome 16 murin (MMU16), qui lui contient 715 gènes murins au total (Das and Reeves, 2011; Reymond et al., 2002). C'est également dans ce chromosome murin qu'on retrouve les gènes homologues de la région DSCR de l'Homme (figure 17). Pour étudier cette pathologie, des chercheurs ont donc créé des modèles transgéniques murins. C'est par exemple le cas des souris Ts16, Ts65Dn, Ts1Rhr que je vous présenterai ci-dessous.

### 2.1.1. Les souris Ts16

La première lignée de souris créé pour étudier le syndrome de Down a été celle nommée Ts16. Cette lignée possède une copie supplémentaire du MMU16 dans sa totalité. Ce modèle reproduit certaines caractéristiques du Syndrome de Down, mais reste peu fiable puisque la totalité du chromosome 16 a été tripliquée, comprenant un grand nombre de gènes homologues à l'Homme mais surtout une majorité de gènes non conservés entre la souris et l'Homme. De plus, ce modèle n'est pas viable et les fœtus meurent à la naissance ou *in utero*, ce qui limite leur étude au cours du développement embryonnaire et pour cette raison les phénotypes neurologiques n'ont pas pu être analysés (Gearhart et al., 1986; Miyabara et al., 1982; Polani and Adinolfi, 1980).

Anomalies	Trisomie 21	Ts65Dn
Problèmes d'apprentissage et de mémoire	✓	✓
La mémoire et la capacité d'apprentissage diminuent avec l'âge	✓	✓
Le volume de l'hippocampe diminué	✓	✓
Hyperactivité	+/-	✓
Croissance et développement	Croissance lente, faible taille et obésité	Retard de croissance et poids corporel
Stérilité chez les mâles	✓	✓
Grossesse	Problèmes d'ovulation, vie reproductive plus courte	Vie reproductive plus courte
Vieillessement	L'espérance de vie plus courte	

**Table 1 – Les anomalies communes entre les patients atteints de trisomie 21 et les souris Ts65Dn.** Les patients atteints de trisomie 21 et les souris transgéniques Ts65Dn présentent un certain nombre de phénotypes communs. Quelques exemples de ces phénotypes sont représentés dans ce tableau. ((✓) Oui ; (+/-) certaine).

(D'après Patterson and Costa, 2005)

### **2.1.2. Les souris Ts65Dn**

Un autre modèle a été créé par l'équipe de Muriel Davisson, la souris Ts65Dn (Davisson et al., 1990). Ce modèle a été généré en créant une translocation de la partie distale du MMU16 sur la partie centromérique du MMU17 (chromosome 17 murin) (Cabin et al., 1998). Cette lignée a permis d'apporter un grand nombre de réponses sur les origines et les mécanismes conduisant certains phénotypes comportementaux, physiques et neurologiques chez l'Homme (ils sont résumés dans la Table I). Les souris Ts65Dn survivent après la naissance, ce qui permet d'étudier des caractéristiques cliniques plus tardives. Ce modèle présente beaucoup de traits communs avec l'Homme, tant au niveau morphologique que biologique (Patterson and Costa, 2005).

### **2.1.3. Les souris Ts1Rhr**

Cette lignée a été générée en utilisant la technique de recombinaison Cre/loxP dans les cellules souches embryonnaires. Pour ces souris, seule la région DSCR (contenant 33 gènes) a été tripliquée (Reeves et al., 1995). Avec cette lignée, les chercheurs ont montré que cette région DSCR est suffisante pour induire les défauts cognitifs retrouvés dans le syndrome de Down (Belichenko et al., 2009).

Contrairement à la lignée Ts65Dn, les souris Ts1Rhr adultes sont plus grandes que les contrôles. Ces souris présentent des phénotypes moins sévères que les Ts65Dn et montrent que la région DSCR seule n'est pas suffisante pour reproduire toutes les anomalies morphologiques observées chez les patients trisomiques, notamment les anomalies craniofaciales (Olson et al., 2004, 2007).

L'équipe de Reeves suggère ainsi que certaines anomalies retrouvées chez les patients atteints de trisomie 21 et chez les Ts65Dn ne seraient pas dues à la triplification d'un ou plusieurs gènes d'une région spécifique du chromosome mais à l'interaction entre gènes non contigus (Olson et al., 2004).



### **2.1.4. Autres modèles murins**

D'autres modèles murins ont été créés pour étudier la trisomie 21. Il s'agit par exemple des lignées : Ts1Cje (Sago et al., 1998), Tc1 (O'Doherty et al., 2005), Ts1Yu (Li et al., 2007) ou Ts1Yah (Pereira et al., 2009). Dans la plupart de ces modèles, le phénotype observé est moins sévère que celui induit par la lignée Ts65Dn. Ces lignées permettent de comparer les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biologiques, mais aussi d'estimer les déficits moteurs et cognitifs de cette pathologie.

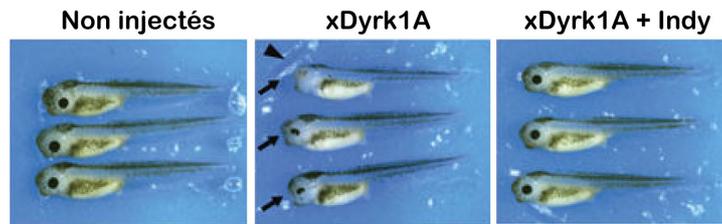
## **2.2. Les gènes localisés dans cette région**

Beaucoup de gènes localisés dans le chromosome 21 humain ont été surexprimés ou invalidés dans des modèles murins afin d'étudier les conséquences phénotypiques et moléculaires. C'est le cas par exemple de *DYRK1A* (*Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A*), *DSCR5* et *DSCR6*, trois gènes localisés dans la région DSCR. Il est important de noter que la fonction de la majorité des gènes de la région DSCR n'a pas été étudiée au cours du développement embryonnaire.

### **2.3.1. Dyrk1A**

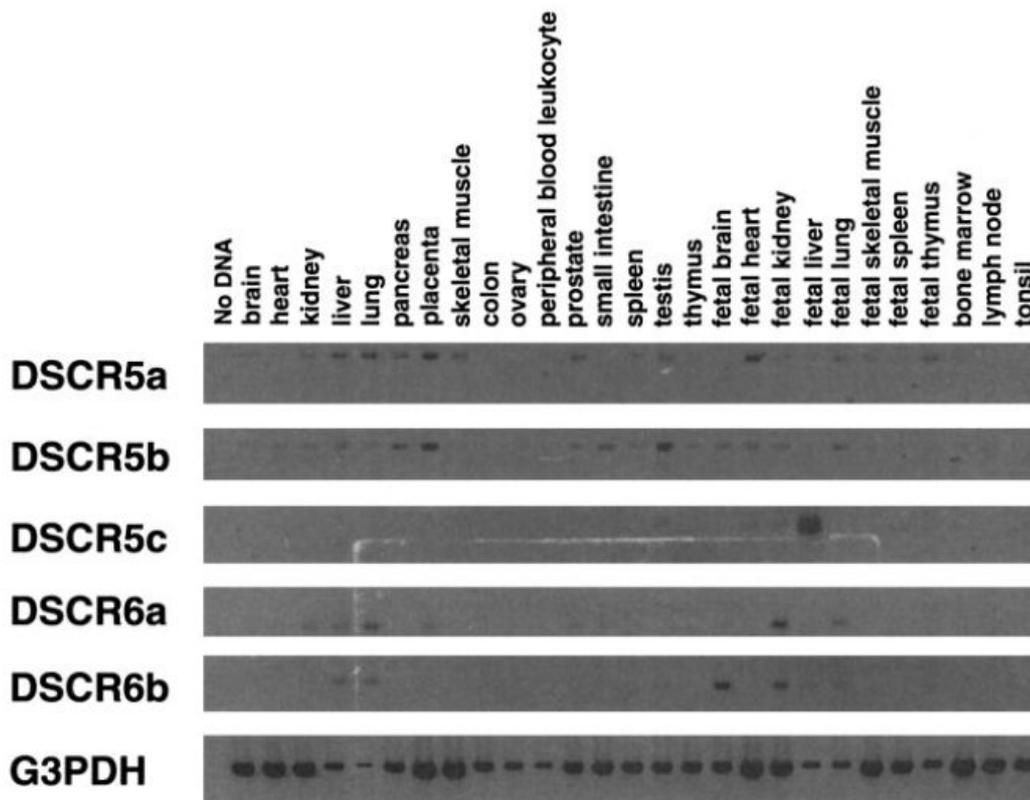
DYRK1A est une protéine appartenant à la famille des Dual-specificity tyrosine-Regulated Kinases (DYRK), capable d'induire la transcription de gènes via la phosphorylation de facteurs de transcription comme CREB (C-AMP Response Element-binding protein), NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) et STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) (Dierssen and de Lagrán, 2006). Cette protéine est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la survie cellulaire et dans la prolifération et différenciation neurale (Aranda et al., 2011; Chen et al., 2013).

Dans les années 1990, cette protéine a été étudiée chez la drosophile et les rongeurs et a été montrée comme étant impliquée dans le retard mental et la dégénérescence du Syndrome de Down. De plus, ces études ont montré que DYRK1A est essentielle pour la neurogenèse post-embryonnaire (Guimerá et al., 1996; Kentrup et al., 1996; Tejedor et al., 1995). Chez l'Homme, DYRK1A est exprimée de façon ubiquitaire



**Figure 18 – La surexpression de xDyrk1A induit des problèmes antérieurs.** (A gauche) embryons contrôle non injectés. (Au milieu) Les embryons ont été injectés avec 500 pg de xDyrk1A dans les deux blastomères dorsaux au stade 8 cellules. Les flèches indiquent les défauts au niveau de la tête ou des yeux. (A droite) Les embryons injectés avec l'ARNm xDyrk1A ont été traités avec 2,5  $\mu$ M de proIndy. Les problèmes antérieurs ont été restaurés.

(D'après Ogawa et al., 2010)



**Figure 19 – Dscr5 et Dscr6 sont présents dans les tissus adultes et foetaux.** L'analyse de Northern Blot et des banques de MTC (Human Multiple Tissue cDNA panels) ont permis de détailler le profil des transcrits de *Dscr5* et *Dscr6* dans les différents tissus adultes et foetaux.

(Shibuya et al., 2000)

dans les tissus fœtaux et adultes, avec une forte expression dans le cerveau et dans le cœur (Guimerá et al., 1996; Hämmerle et al., 2003).

L'importance de ce gène a été renforcée par les études fonctionnelles et phénotypiques de modèles murins transgéniques ou de Knockout (KO). Le modèle KO homozygote (*Dyrk1a<sup>-/-</sup>*), créé par l'équipe de Fotaki, est létal au stade embryonnaire E14,5. Les souris hétérozygotes (*Dyrk1a<sup>+/-</sup>*) sont plus petites en taille et présentent une diminution de la taille du cerveau. Chez les deux lignées, les résultats montrent un défaut de développement du système nerveux central, une réduction du nombre de neuroblastes et une dérégulation de la différenciation neurale (Fotaki et al., 2002). D'autres études en utilisant différentes lignées de souris transgéniques ont montré que la surexpression de *Dyrk1a* seul est suffisante pour induire des altérations de la morphologie cérébrale, ainsi que des troubles neurologiques et moteurs comparables à ceux observés chez les patients atteints de trisomie 21 (Ahn et al., 2006; Altafaj et al., 2001, 2008; Branchi et al., 2004; Laguna et al., 2008; Martínez de Lagrán et al., 2004; Sebríe et al., 2008; Smith et al., 1997).

Les conséquences de la surexpression de *Dyrk1A* ont également été étudiées chez les embryons de *Xenopus laevis*. L'ARNm *xDyrk1a* (homologue de *Dyrk1a*) a été injecté dans les deux blastomères dorsaux au stade 8 cellules et les conséquences phénotypiques ont été analysées. Les résultats obtenus ont montré qu'au stade 40-41, les embryons présentent des problèmes antérieurs, notamment la tête et les yeux sont peu développés. De plus, ce phénotype peut être restauré par l'ajout d'un nouvel inhibiteur de *Dyrk1A*, proIndy (figure 18) (Ogawa et al., 2010).

### 2.3.2. DSCR5

DSCR5, aussi appelé PIG-P (phosphatidylinositol glucan, classe P), est un composant de la glycosylphosphatidylinositol-N-acétylglucosaminyltransférase (GPI-GnT) (Watanabe et al., 2000). Le GPI est un glycolipide qui permet l'ancrage de protéines aux membranes cellulaires.

L'équipe de Shibuya a montré que *DSCR5* est localisé dans la région DSCR et code pour une protéine transmembranaire. De plus, des analyses de Northern Blot chez l'Homme ont montré que l'ARNm *Dscr5* est présent dans plusieurs tissus adultes et fœtaux, comme le foie, le muscle squelettique, le cœur, le pancréas et les testicules (figure 19) (Shibuya et al., 2000; Togashi et al., 2000).

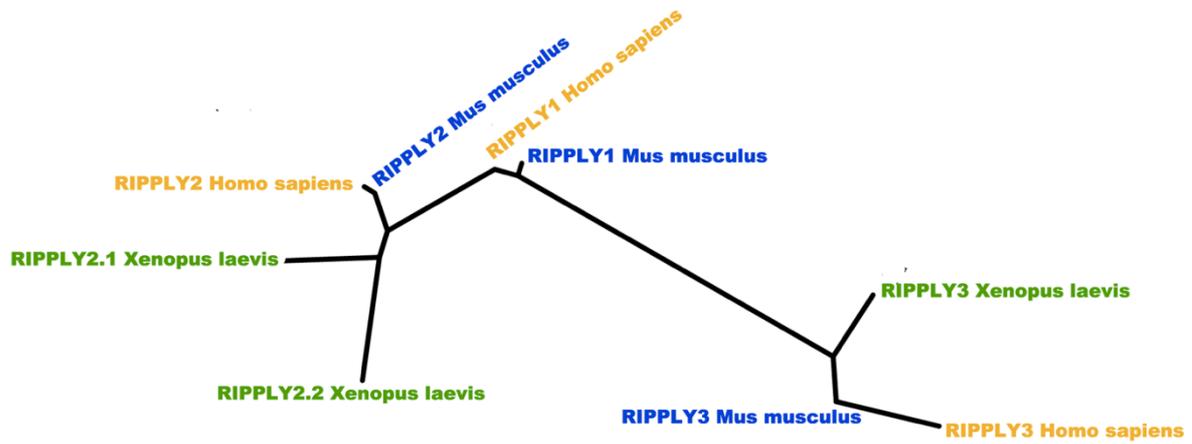


Chez la souris, la technique d'hybridation *in situ* a permis de montrer que l'homologue de *Dscr5* est principalement exprimé dans la langue au cours du développement embryonnaire. Avec ce résultat, les auteurs suggèrent que *Dscr5* pourrait être responsable de la physiologie de la malformation de la langue observée dans les patients atteints de trisomie 21 (Choi et al., 2001). De plus, des études menées chez la souris ont montré que le complexe de biosynthèse de GPI est essentiel pour le développement embryonnaire et surtout pour le maintien de l'homéostasie de la coagulation sanguine et la fonction neurologique (Almeida et al., 2006).

Chez le xénope et chez le poisson-zèbre, *Dscr5* participe au développement embryonnaire précoce. Comme j'ai décrit précédemment, les mouvements de convergence et extension au cours de la gastrulation participent à la mise en place des axes embryonnaires. Il a été montré que la voie de signalisation PCP, dans laquelle on retrouve Dishevelled, les GTPases et la cascade JNK (Jun N-terminal kinase), régule ces mouvements (Klein and Mlodzik, 2005). Notre équipe a montré que la perte de fonction ou la surexpression de *Dscr5* affecte les mouvements de convergence et extension, sans modifier le patron d'expression des gènes impliqués dans la régionalisation dorso-ventrale du mésoderme, comme *Chordin* et *Wnt8*. Ils ont également montré que DSCR5 module ces mouvements en passant par la voie de signalisation PCP et en régulant la stabilité de Dsh (Shao et al., 2009).

### 2.3.3. DSCR6

L'équipe de Shibuya a également montré que DSCR6 appartient à la région DSCR. Leur analyse informatique a montré qu'il existe 4 différents transcrits de DSCR6 : DSCR6a, DSCR6b, DSCR6c et DSCR6d, et qu'il n'y a pas de domaine conservé entre ces protéines. L'utilisation du logiciel PSORTII (Protein sorting signal and localization sites in amino acid sequences) a permis de prédire que DSCR6 aurait une localisation nucléaire. Des analyses de Northern blot et des banques de MTC (Human Multiple Tissue cDNA panels) ont montré que ces transcrits sont exprimés au cours du développement et chez l'adulte, notamment dans le rein et le cerveau, et dans une moindre quantité dans le foie et les poumons (figure 19) (Shibuya et al., 2000). Une autre étude a analysé l'expression de DSCR6 dans le cortex du cerveau des fœtus au début du 2<sup>ème</sup> trimestre de grossesse par Western Blot. Les résultats ont montré que *Dscr6* serait surexprimé dans les fœtus atteints de trisomie 21, en revanche, quand les résultats obtenus sont normalisés, il n'y a pas de différence par rapport aux fœtus contrôles. Les auteurs ont



**Figure 20 – Arbre phylogénétique des membres de la famille Ripply.** Les différents gènes *Ripply* chez l'Homme (jaune), la souris (bleu) et le xénope (vert).

```

Ripply 3 -----MKS-----YIGSR---VRQEQCKEYKGT DASITPTNDRDISI
Ripply 2.1 -----MEPNQQRSCASASS-----TSA----SGA
Ripply 2.2 mdninttidicgaasglpspgdsnskrlrhrkylpqrwkcepr-----gpa----rte
                                         :: .*                               :

Ripply 3      ECISSLALWRPWLLRAEDRELDVQQR-----SGEDNGDPRNTGPKGALGFQHPVRLYMPK
Ripply 2.1    SHSSHGPyWRPWHDAPGTHV-NVQNSPVVLQQFYSDNQSYMNDKGKLP AFQHPVKLFWPK
Ripply 2.2    tqrpgtlfwrpwlkshkp-----ktqahpyarglrenpgeqkpveynhpvr lfwpk
                                         .                :****:* **

Ripply 3      SKTSEYLQHMGRKVLASFPVQATIHFYNDSDSE-EEDEEMEFYNYQNC AANGVNSSRG
Ripply 2.1    SRCYDFMYQEAELLRHFPVQATISLYQETDSDSDSEEEEICD-N-----
Ripply 2.2    sklldntyqeaadllrnfpvqatislyndsesdtdneedssee-eq-----dsgfese--
                                         *: : : . .* ***** :*: : ... .*:: :

Ripply 3
Ripply 2.1    SNDDYSIQGGPKRNISHTGS
Ripply 2.2    -----
                -----

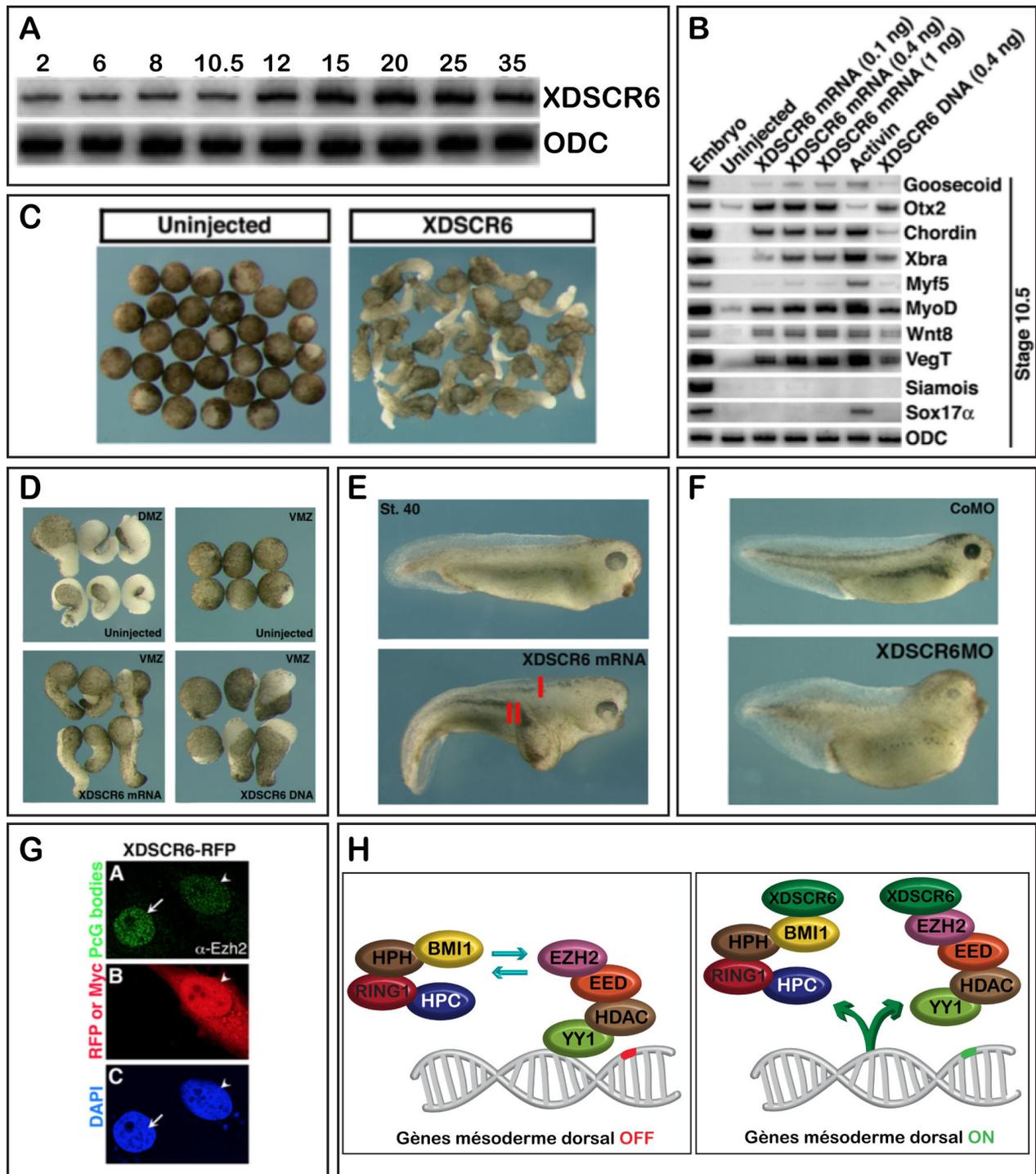
```

**Figure 21 – Comparaison des séquences primaires des différents membres de la famille RIPPLY d'amphibien.** Alignement de la séquence en acides aminés de RIPPLY3, RIPPLY2.1 et RIPPLY2.2 de *Xenopus laevis*. Les motifs WRPW (rectangle rouge) et FVQA (rectangle bleu) sont conservés parmi les 3 membres de cette famille.

ainsi proposé que ces résultats ne semblent pas être conclusifs et que *Dscr6* ne serait donc pas surexprimé le cerveau des fœtus analysés (Ferrando-Miguel et al., 2004).

DSCR6 est également appelé RIPPLY3 et appartient à la famille RIPPLY. Chez l'Homme et chez la souris, trois membres appartiennent à cette famille : Ripply1 (Groucho), Ripply2 et Ripply3 (DSCR6) ; alors que chez le xénope, on retrouve Ripply2.1 (Ledgerline ou Stripy), Ripply2.2 (Bowline) et Ripply3 (figure 20). Ces protéines partagent peu de régions d'homologie avec des domaines conservés. En revanche, deux motifs composés de seulement quelques acides aminés sont bien conservés : WRPW et FPVQ (figure 21). Le peptide FPVQ est localisé dans la région Ripply/BDLC (Bowline-DSCR-Ledgerline conserved region) qui est essentielle à l'interaction entre les membres de cette famille et les protéines à boîte-T au cours de la somitogenèse et du développement du pharynx (Hitachi et al., 2009; Kawamura et al., 2008; Kondow et al., 2007). Le motif WRPW se trouve dans la partie amino-terminale de tous les membres de la famille RIPPLY. Chez le xénope et le poisson-zèbre, ce motif permet le recrutement et l'interaction avec la protéine Groucho (Fisher et al., 1996; Paroush et al., 1994). Cette interaction va convertir le rôle activateur transcriptionnel de *Tbx6* (aussi appelé *Tbx24*) en un rôle de répresseur au cours de la somitogenèse (Kawamura et al., 2005, 2008; Kondow et al., 2007). Notre équipe a montré que ce motif joue également un rôle dans l'interaction de *XDSCR6* avec les membres de la famille polycomb lors de la mise en place des feuilletts et axes embryonnaires (Li et al., 2013).

En plus de l'étude de la fonction du gène *Dscr5*, mon équipe s'est également intéressée à la fonction de *Xdscr6* (un homologue de *Dscr6* humain) au cours du développement embryonnaire chez le xénope. L'étude du profil d'expression révèle que les transcrits de *Xdscr6* sont présents dès le début du développement jusqu'à l'organogenèse de manière constante, ce qui suggère que *Xdscr6* est un ARNm maternel (figure 22A). De plus, la signalisation Nodal, mais pas celle de Wnt, induit l'expression de *Xdscr6* dans l'ectoderme naïf. La surexpression de *Xdscr6* dans des explants de la calotte animale induit l'expression *Xnr1*, *Xnr2* et *Xnr6*, des gènes qui sont majoritairement exprimés dans la région dorsale. Ces résultats suggèrent que ce gène pourrait être impliqué dans le développement précoce. Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que la surexpression de *Xdscr6* dans les calottes animales induit l'expression des gènes MLC (myosin light chain), XCG1 (un gène marqueur de la glande adhésive) et de *Sox3* (un marqueur du neuroectoderme). Des expériences de RT-PCR montrent que cette surexpression de *Xdscr6* conduit également à l'expression de gènes du mésoderme tels que *Chordin*, *Xbra* ou *Wnt8* (figure 22B). De plus, cette surexpression



**Figure 22 – La fonction de XDSCR6 au cours du développement embryonnaire de l'amphibien. (A)** Profil d'expression de l'ARNm de *Xdscr6*. **(B)** Des analyses de RT-PCR montrent que la surexpression de *Xdscr6* modifie l'expression des gènes marqueurs du mésoderme dorsal et du tissu neural. **(C)** La surexpression de *Xdscr6* induit l'allongement des explants issus de la calotte animal. Ces explants sont au stade neurula. **(D)** La surexpression de *Xdscr6* induit la dorsalisation des tissus issus de la zone marginale ventral (ZMV). **(E)** La surexpression de *Xdscr6* induit la formation d'un double axe (II rouge). **(F)** L'injection d'un morpholino spécifique de *Xdscr6* induit la ventralisation des embryons. **(G)** Des analyses en culture cellulaire montrent que XDSCR6 interfère avec la localisation nucléaire de EZH2 et BMI1 au niveau des polycomb bodies. **(H)** Modèle de la fonction de XDSCR6 dans la répression transcriptionnelle

(D'après Li et al., 2013)

induit l'allongement de ces explants (figure 22C). Ces résultats suggèrent que XDSCR6 induit la formation du mésoderme dorsal et de tissu neural.

L'équipe a ensuite étudié les conséquences de la surexpression de *Xdscr6* au cours de la mise en place des axes embryonnaires. Des expériences réalisées sur les explants issus de la zone marginale ventrale montrent que XDSCR6 est capable de dorsaliser le mésoderme ventral au cours de la gastrulation (figure 22D). Au niveau phénotypique, la surexpression de *Xdscr6*, comme la forme humaine *Hdscr6*, ou encore la forme *AmphiSom* de l'amphioxus, dans la région ventrale de l'embryon conduit à la formation d'un axe surnuméraire (figure 22E). Ceci peut être expliqué par le fait que ces homologues contiennent tous le motif WRPW localisé dans leur région amino-terminale. En effet, les travaux de l'équipe ont montré que l'intégrité du motif WRPW est requise pour la capacité de XDSCR6 à induire un axe embryonnaire surnuméraire. De plus, la surexpression du motif myc-WRPW seul est suffisante pour induire ce phénotype.

L'étude de la perte de fonction de *Xdscr6* a également été réalisée en utilisant des sondes oligonucléotide de type Morpholino. Quand le Morpholino de *Xdscr6* est injecté dans la région dorsale, les embryons présentent des problèmes antérieurs, caractérisés notamment par une atrophie de la tête (figure 22F). Au niveau moléculaire, les gènes marqueurs du mésoderme dorsal, tels que *Chordin*, *Noggin* et *Goosecoid*, sont moins exprimés. Ainsi, *Xdscr6* est requis pour la formation du mésoderme dorsal et pour le développement antérieur.

Afin de comprendre les propriétés dorsalisantes de XDSCR6, l'équipe a recherché des potentiels partenaires protéiques. Elle a identifié 2 membres de la famille polycomb BMI-1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1) et EZH2 (enhancer of zeste homologue 2) comme étant des partenaires de XDSCR6. De plus, l'équipe a montré que le motif WRPW est requis pour cette interaction.

Des expériences d'immunodétection en culture cellulaire et de ChIP sur les embryons de xénope ont montré que XDSCR6 est capable de décrocher EZH2 et BMI-1 de la chromatine, empêchant ainsi leur activité répressive sur un gène marqueur du mésoderme dorsal – *Goosecoid* (figure 22 G et H). L'équipe a ainsi montré un nouvel mécanisme de dérégulation transcriptionnelle dans lequel les processus épigénétiques sont impliqués dans la formation du mésoderme dorsal et des axes embryonnaires de *Xenopus laevis* (Li et al., 2013).



# D. Les régulations épigénétiques au cours du développement embryonnaire

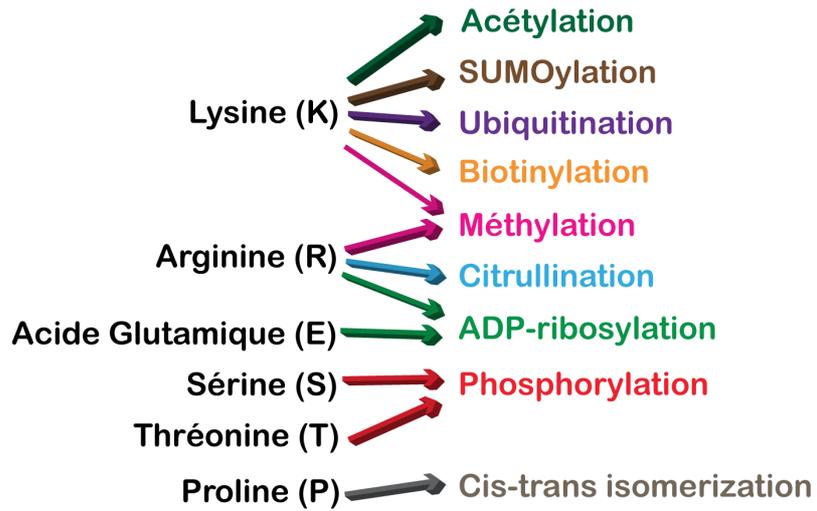
## 1. Généralités

Le terme « épigénétique » est apparu pour la première fois dans les années 40s initié par l'embryologiste Conrad Waddington, qui considéra que la modulation de l'expression des gènes construit le phénotype (Waddington, 2012).

L'épigénétique correspond à l'ensemble des changements de la structure et de la fonction de la chromatine. Ces changements sont transmissibles d'une cellule mère à une cellule fille et font intervenir, par exemple, la méthylation de l'ADN, la compaction de la chromatine rendant accessible ou non les gènes cibles pour la machinerie transcriptionnelle, ou les modifications post-traductionnelles des histones. L'ensemble de ces modifications engendre une accessibilité chromatinienne différente en fonction des marques épigénétiques. Ces marques induisent le changement de l'expression des gènes qui sont à la fois stables et héréditaires au cours des divisions cellulaires mais aussi modifiables et réversibles en fonction de l'environnement.

Au cours du développement embryonnaire, les cellules possèdent le même patrimoine génétique, mais elles ne sont pas identiques. Selon le type cellulaire, les gènes ne vont pas s'exprimer de la même manière. En effet, en plus de l'intervention des facteurs de transcription, l'expression génétique peut aussi être modulée par les différentes marques épigénétiques qui peuvent être soit activatrices, soit inhibitrices. Ainsi, l'étude de l'épigénétique au cours du développement embryonnaire est en enjeu central pour comprendre l'expression différentielle des gènes, le maintien et la transmission de leur expression.

Dans ce chapitre j'ai choisi de ne décrire que les processus qui s'inscrivent dans le cadre de ma problématique de thèse. Ainsi, j'ai pris les modifications des histones comme exemple de modifications épigénétiques.



**Figure 23 – Les modifications des histones.** Les différents acides aminés peuvent subir plusieurs modifications post-traductionnelles qui sont représentées avec les différentes couleurs.

(D'après Latham and Dent, 2007)

## 2. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications des histones constituent un ensemble de marques de la chromatine. Elles sont importantes pour réguler de la structure chromatinienne et l'activité des gènes. En effet, les modifications post-traductionnelles des histones peuvent changer la nature de l'interaction entre l'ADN et le nucléosome ou permettre le recrutement de protéines interagissant avec la chromatine. Il existe un grand nombre de modifications des histones impliquées dans différents processus cellulaires (figure 23), comme c'est le cas de la méthylation ou de l'acétylation. En général, l'acétylation des lysines est corrélée avec une chromatine « ouverte » et transcriptionnellement active tandis que la méthylation des lysines aura un effet inverse en fonction de la position et du nombre de résidus méthylés.

### 2.1. L'acétylation

Les histones peuvent être acétylées sur des résidus lysine spécifiques. Cette modification post-traductionnelle rend la chromatine plus flexible et facilite l'accessibilité aux différents facteurs de transcription. L'acétylation est ainsi associée à une transcription active. Il existe des histones acétyltases ou des histones désacétylases capables d'acétyler ou de désacétyler les lysines, respectivement (Sternier and Berger, 2000; Witt et al., 2009). La déacétylation des histones, provoque la condensation de la chromatine et restreint ainsi l'accès à l'ADN aux facteurs de transcription. Des analyses à l'échelle du génome chez la levure ont montré que les régions transcrites sont globalement hyperacétylées alors que les régions silencieuses sont plutôt hypoacétylées (Pokholok et al., 2005).

Au cours du développement embryonnaire du xénope, l'hyperacétylation des histones est requise pour la formation du mésoderme au moment de la gastrulation (Almouzni et al., 1994). Par exemple, récemment il a été montré que le déterminant maternel VegT joue un rôle dans l'acétylation de l'histone 3 sur les loci des gènes du mésendoderme. En effet, la surexpression de VegT augmente l'acétylation de H3K27 et H3K9 et la triméthylation de H3K4, alors que l'injection d'un morpholino spécifique de VegT diminue ces marques épigénétiques. Ainsi, VegT est nécessaire à l'établissement des marques actives des histones sur les régions des promoteurs des gènes du mésendoderme. Dans ce même article, les auteurs ont montré que Ascl1 (Achaete-scute homolog 1 is a protein), un facteur maternel essentiel à la formation du



mésendoderme, antagonise l'activité transcriptionnelle de VegT via la déacétylation de H3K27 et H3K9 au cours de l'induction du mésendoderme (Min et al., 2016).

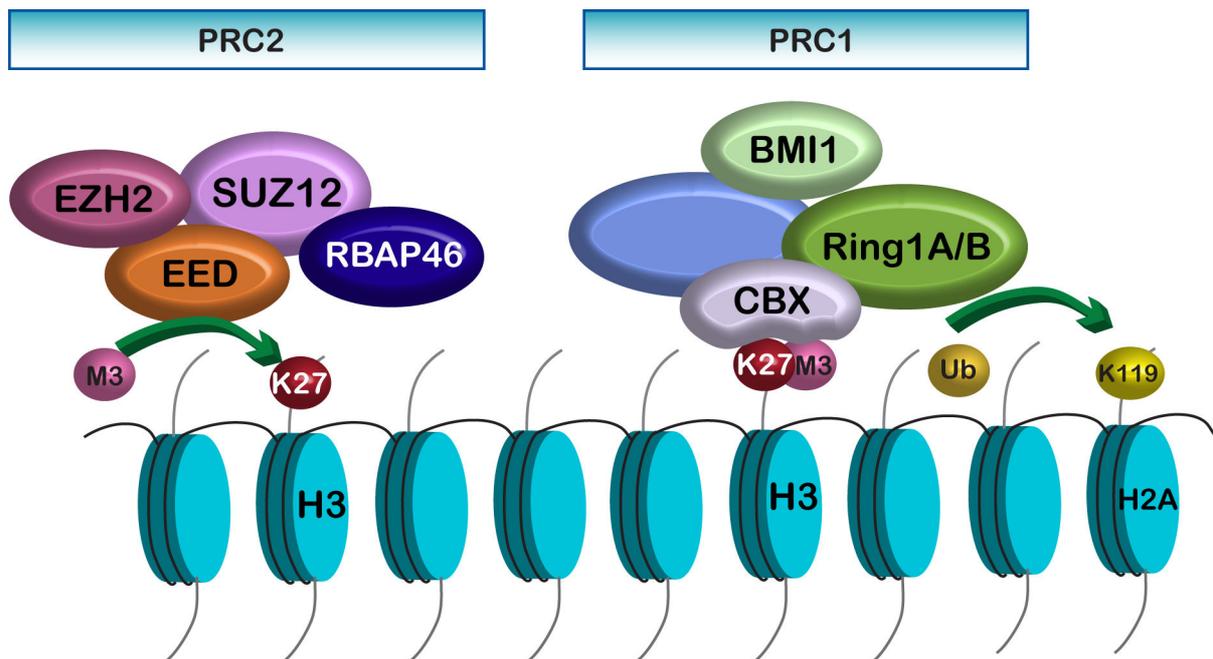
## 2.2. La méthylation

Les histones peuvent également être méthylées sur les résidus lysines ou arginines, principalement sur les extrémités amino-terminales des histones H3 et H4. Comme pour l'acétylation, la méthylation est une modification réversible qui fait intervenir l'action d'histones méthyltransférases et de l'histones déméthyltransférases (Agger et al., 2008; Sims et al., 2003). Selon l'acide aminé modifié, les histones méthyltransférases peuvent être classés en 2 groupes différents : les PRMT (proteine arginine methyltransferase) qui méthylent les résidus arginine, et les protéines à domaine SET (Suppressor of variegation 3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax) qui méthylent les résidus lysine. La méthylation des résidus arginine semble avoir un effet positif sur la transcription, alors que la méthylation de certains résidus lysine joue un rôle principalement dans la formation de l'hétérochromatine et donc dans la répression de la transcription (Zhang and Reinberg, 2001).

Chez le xénope, ces résidus sont également méthylés au cours du développement embryonnaire précoce. Par exemple, l'acquisition de la marque H3K4me3 corrèle avec l'activation de l'expression des gènes zygotiques, alors que la marque H3K27me3 est préférentiellement déposée plus tard dans le développement, probablement pour restreindre l'activité des régulateurs transcriptionnels de façon spatio-temporelle (Akkers et al., 2009).

## 3. Importance des polycombs

Le mode d'action des polycombs est requis pour différentes fonctions biologiques, comme la prolifération, le contrôle du cycle cellulaire ou le développement du système nerveux. Les polycombs sont associés au contrôle de nombreux gènes dont une grande partie code pour des régulateurs de la transcription et des protéines de signalisation qui sont souvent impliqués dans les processus du développement (Schwartz and Pirrotta, 2007). Par exemple, les polycombs interagissent avec les facteurs de transcription,



**Figure 24 – Les complexes Polycomb Repressive 1 et 2.** D'une manière générale, l'action des polycombs débute par le recrutement du complexe PRC2 au niveau de l'histone H3 pour di/triméthyliser le résidu lysine 27. Cette marque épigénétique participe au recrutement du complexe PRC1, qui lui à son tour va monoubiquitiner le résidu lysine 119 sur l'histone 2A. La présence de ces deux complexes PRCs induit la compaction de la chromatine et conduit à la répression transcriptionnelle des gènes cibles. (M : méthylation ; K : lysine ; Ub : ubiquitination ; H : histone).

(D'après Vissers et al., 2012 et Wassef and Margueron, 2017)

comme Sox2, Nanog et Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4) requis pour l'auto-renouveaulement et le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires murines (Lee et al., 2006).

Le groupe des protéines Polycomb est une des principales classes de modificateurs d'histone et code pour des facteurs qui contrôlent l'extinction de l'expression des gènes (« silencing »).

Les protéines polycomb ont des fonctions spécifiques dans le développement embryonnaire, dans les cellules souches pluripotentes et dans la reprogrammation des cellules somatiques dans un état pluripotent (Aloia et al., 2013). Ces protéines sont des facteurs épigénétiques très conservés au cours de l'évolution et ont été initialement découvertes chez la drosophile, comme étant des répresseurs des gènes homéotiques (Lewis, 1978). En effet, chez les embryons de drosophile, des mutations des membres de cette famille perturbent l'expression spatio-temporelle des gènes Hox et induisent des défauts de segmentation le long de l'axe antéro-postérieur (Ringrose and Paro, 2004). Ces résultats suggèrent que les protéines polycombs contrôlent la segmentation au cours du développement embryonnaire précoce de la drosophile. Ainsi, au cours du développement embryonnaire, les complexes polycomb maintiennent la répression de leurs gènes cibles. Par ailleurs, ce rôle répresseur sur les gènes du développement est très conservé chez les mammifères (Morey and Helin, 2010).

#### **4. Les complexes PRC1 et PRC2**

Les protéines Polycomb sont regroupées au sein de deux complexes principaux : Polycomb Repressive Complexe 1 et 2 (PRC1 et PRC2) (figure 24). Le complexe PRC1 catalyse la mono-ubiquitination de la lysine 119 sur l'histone H2A (H2A119ub) via RING1A et RING1B, tandis que le complexe PRC2 présente une activité méthyltransférase, notamment sur la di-/tri-méthylation de l'histone 3 sur la lysine 27 (H3K27me2/3) par l'action des sous-unités enzymatiques EZH1 et EZH2 (Kuzmichev et al., 2002; Margueron et al., 2008; Sawarkar and Paro, 2010; Schuettengruber and Cavalli, 2009; Simon and Kingston, 2009).



**Figure 25 – Représentation de la protéine BMI1.** BMI1 possède le domaine RING finger dans sa partie amino-terminale (N). Dans la région centrale de la protéine, se trouve le domaine Helix-Turn-Helix (HTH) qui permet les interactions protéine-ADN. Dans la région carboxy-terminale (C) se trouve le domaine PEST-Like. Ce domaine est impliqué dans la stabilité de BMI1. Dans cette protéine nous trouvons également deux motifs d'adressage au noyau : NLS1 et NLS2 (Nuclear Localization Signal).

(D'après Bhattacharya et al., 2015)

## 4.1. PRC1

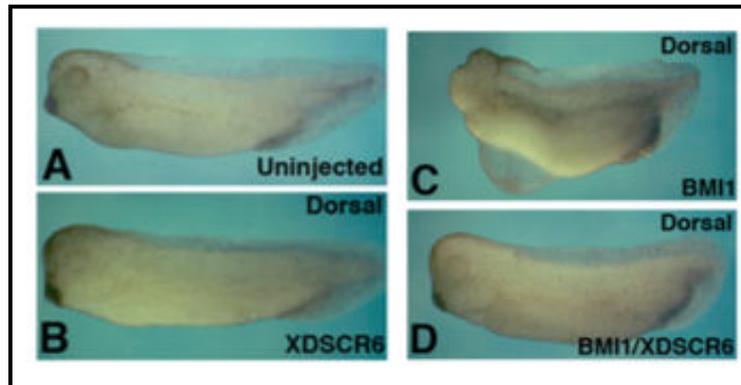
Chez la drosophile, quatre protéines constituent le cœur fonctionnel de ce complexe PRC1 : Polycomb (PC) qui reconnaît la marque H3K27me3, Posterior Sex Combs (PSC), Polyhomeotic (PH) et dRING (qui ubiquitine la lysine 119 de l'histone H2A) (Francis et al., 2001; Saurin et al., 2001). La mono-ubiquitination de H2AK119ub est une modification post-traductionnelle très importante pour la répression des gènes ciblés par les protéines polycomb. Chez les vertébrés, la composition du PRC1 est beaucoup plus complexe. Par exemple, on retrouve deux homologues de dRing chez les mammifères, Ring1A et Ring1B. Les homologues de dRing sont essentiels à l'activité principale de ce complexe (Gao et al., 2012; Luis et al., 2011). Les souris hétérozygotes pour Ring1A sont viables mais présentent des défauts de développement au niveau du squelette axial, notamment une antériorisation des vertèbres lombaires (del Mar Lorente et al., 2000), alors que le KO des souris Ring1B<sup>-/-</sup> provoque l'arrêt du développement embryonnaire très précocement et les embryons meurent aux alentours du 10<sup>ème</sup> jour de l'embryogénèse (de Napoles et al., 2004; Voncken et al., 2003). Dans le complexe PRC1 on retrouve également cinq homologues du gène PC, appelés Chromobox (Cbx) et BMI-1.

Plusieurs rôles du complexe PRC1 ont été répertoriés dans la littérature. La protéine Pc, par son chromodomaine, permet la liaison spécifique de PRC1 sur l'histone H3K27 préalablement triméthylée par PRC2 (Fischle et al., 2003). Certaines protéines avec le domaine RING (Ring1A et Ring1B) ont une activité E3UbiquitineLigase qui mono-ubiquitine l'histone H2A sur la lysine 119 (Cao et al., 2005; de Napoles et al., 2004; Wang et al., 2004). D'autres protéines polycomb contenant le domaine RING, comme BMI-1 par exemple, ont comme but de catalyser cette action d'ubiquitination (Buchwald et al., 2006; Li et al., 2006).

### 4.1.1. BMI1

Le gène *Bmi1* (figure 25) a été identifié pour la première fois comme un oncogène pouvant collaborer avec c-Myc chez les souris transgéniques E $\mu$ -myc au cours de la lymphomagénèse (van Lohuizen et al., 1991).

Au contraire d'EZH2, BMI1 ne possède aucune activité enzymatique, mais cette protéine semble stimuler l'activité E3 ubiquitine ligase de Ring1A/B qui permet la création de la marque répressive H2AK119ub (Cao et al., 2005).



**Figure 26 - BMI1 est impliquée dans la mise en place des axes embryonnaires.** (A) Embryons contrôle. (B) La surexpression de *Xdscr6* dans la région dorsale de l'embryon n'a pas d'effet sur la mise en place des axes embryonnaires. Les embryons sont normaux. (C) La surexpression de *Bmi1* dans la région dorsale induit la ventralisation de l'embryon. (D) Ce phénotype est restauré lors de la co-injection de *Xdscr6* avec *Bmi1*.

(D'après Li et al., 2013)

#### 4.1.1.1. BMI1 au cours du développement embryonnaire

Chez la souris BMI1 est très exprimée dans les cellules souches embryonnaires, dans le placenta, dans le thymus, dans le cœur, dans les testicules et dans le cerveau (van Lohuizen et al., 1991). La délétion de BMI1 n'est pas létale au niveau embryonnaire mais les souris *Bmi1*<sup>-/-</sup> présentent des anomalies neurologiques, hématopoïétiques et squelettiques, notamment dans l'axe antéropostérieur (van der Lugt et al., 1994).

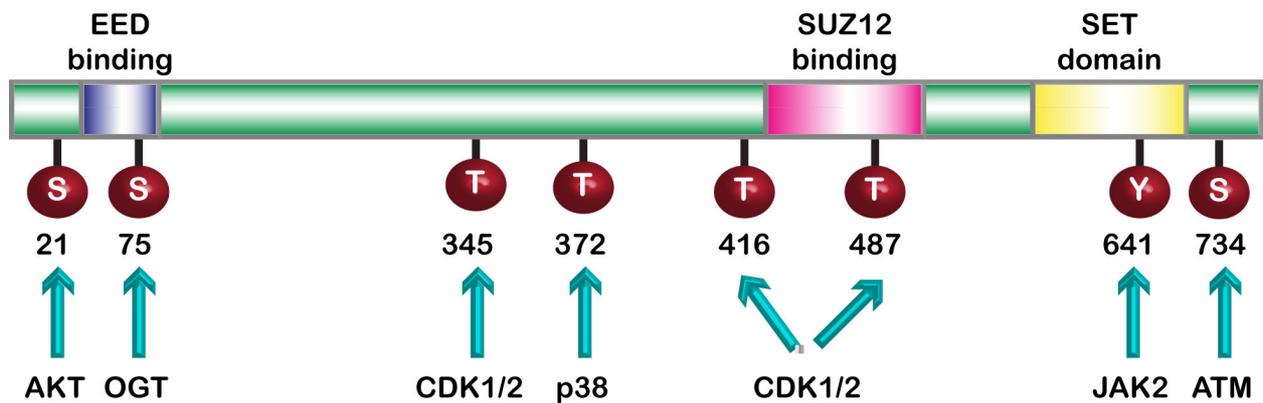
Chez le xénope, les transcrits de *XBmi1* sont détectés de manière abondante dès le début de la fécondation jusqu'à la gastrulation. Au stade gastrula, ils sont localisés essentiellement dans l'ectoderme dorsal et ventral. A des stades plus tardifs, *XBmi1* est restreint aux régions le plus antérieures de l'embryon (Reijnen et al., 1995). La surexpression de *XBmi1* induit des embryons avec des défauts antérieurs, notamment au niveau de la morphologie de la tête et la taille des yeux (Yoshitake et al., 1999). Ce phénotype peut être partiellement restauré avec la co-injection de *XBmi1* et *Xdscr6* (figure 26), comme décrit dans le chapitre II. Ces résultats démontrent que XDSCR6 empêche de XBMI1 de contacter l'ADN (Li et al., 2013).

## 4.2. PRC2

Le complexe PRC2 est composé de quatre sous-unités : SUZ12 (Suppressor of Zeste 12), EZH2 (Enhancer of Zeste 2), EED (Embryonic Ectoderm Development) et RbAP46/48 (Retinoblastoma Associated Protein) (Kuzmichev et al., 2002; Margueron and Reinberg, 2011). Des études récentes chez les mammifères ont identifié une nouvelle version du complexe PRC2 contenant EZH1, un homologue d'EZH2. EZH1 peut également induire la triméthylation de H3K27. Ainsi, EZH2 et EZH1 sont des méthyltransférases responsables de l'activité enzymatique de PRC2 (Margueron et al., 2008; Shen et al., 2008). D'autres cofacteurs sont nécessaires au bon fonctionnement de ce complexe, comme JARID2 (Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2) ou AEBP2 (Adipocyte enhancer)-binding protein 2), ils participent à la stimulation de l'activité méthyltransférase du complexe PRC2.

La triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27) est une marque épigénétique qui est associée à l'extinction de la transcription. C'est le complexe PRC2 (Polycomb repressive complex 2) qui possède cette activité de méthyltransférase.

Plusieurs études ont montré que le complexe PRC2 est essentiel au cours du développement embryonnaire. Par exemple, chez la souris, lorsque l'expression de



**Figure 27 – Représentation de la protéine EZH2.** La protéine EZH2 possède un site de liaison à EED dans sa région amino-terminale. Dans la région carboxy-terminale se trouvent le domaine de liaison à SUZ12 et le domaine catalytique SET. Les modifications post-traductionnelles d'EZH2 sont représentées en rouge. Cette protéine peut être phosphorylée sur S21, T345, T372, T416, T487, Y641 et S734 par les kinases indiquées en dessous. (S : sérine ; T : thréonine ; Y : tyrosine).

(D'après Yamaguchi and Hung, 2014)

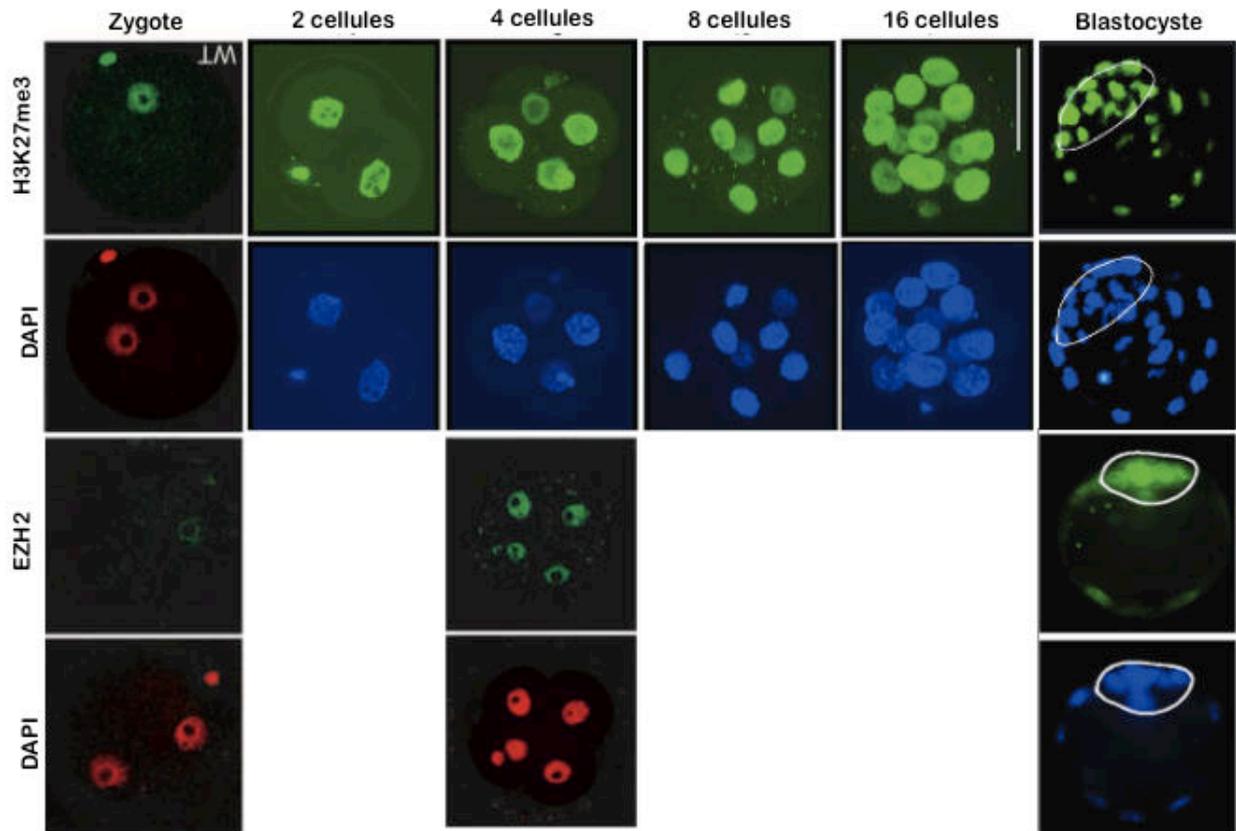
*Suz12*, *Eed* ou *Ezh2* est perturbée, les embryons présentent des défauts de gastrulation et une létalité pendant les stades post-implantatoires précoces (Faust et al., 1995; O'Carroll et al., 2001; Pasini et al., 2004). De même, chez les embryons de xénope, le complexe PRC2 régule aussi la formation du mésendoderme, le développement neural et des crêtes neurales. Par exemple, l'interaction entre EZH2 et le facteur de transcription Snail2 permet la spécification et la migration des crêtes neurales (Lim et al., 2011; Tien et al., 2015).

#### 4.2.1. EZH2

La sous-unité catalytique du complexe PRC2 est le produit du gène *Ezh2*. Grâce à son activité d'histone méthyltransférase, cette protéine est responsable de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3, via son domaine SET. La méthylation de l'histone H3, H3K27me3, va maintenir la chromatine sous forme condensée, empêchant ainsi la liaison des facteurs de transcriptions aux sites promoteurs de plusieurs gènes. Le domaine amino-terminal d'EZH2, composé des domaines protéiques WDB et SANT, sert de point d'ancrage pour ses partenaires du complexe PRC2 (EED, SUZ12 et RBAP48) (Cao and Zhang, 2004a, 2004b; Kuzmichev et al., 2004). Comme nous pouvons voir dans la figure 27, EZH2 présente des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation. Cette méthyltransférase peut être phosphorylée sur plusieurs résidus de sérine, tyrosine ou thréonine par différentes kinases. Par exemple, elle peut être phosphorylée sur le résidu tyrosine en position 641 par JAK2 (Janus kinase 2), ce qui permet l'interaction entre EZH2 et  $\beta$ -TrCP. La phosphorylation sur le résidu sérine en position 21 (S21) par AKT (protéine kinase B) induit l'inhibition de l'activité enzymatique sur H3K27me3 mais permet à EZH2 de méthyler et d'activer le facteur de transcription STAT3 (Yamaguchi and Hung, 2014).

##### 4.2.1.1. L'implication d'EZH2 au cours du développement embryonnaire de la souris

Dans les embryons de souris, O'Carroll et ses collaborateurs ont montré que les transcrits d'*Ezh2* sont détectés à partir de la fécondation jusqu'à la gastrulation (O'Carroll et al., 2001). Ces travaux n'ont pas analysé le profil des transcrits d'*Ezh2* au-delà du stade blastocyste. D'autres travaux ont analysé le profil spatio-temporel de la protéine EZH2 et sa marque épigénétique H3K27me3 ont montré qu'elles sont présentes



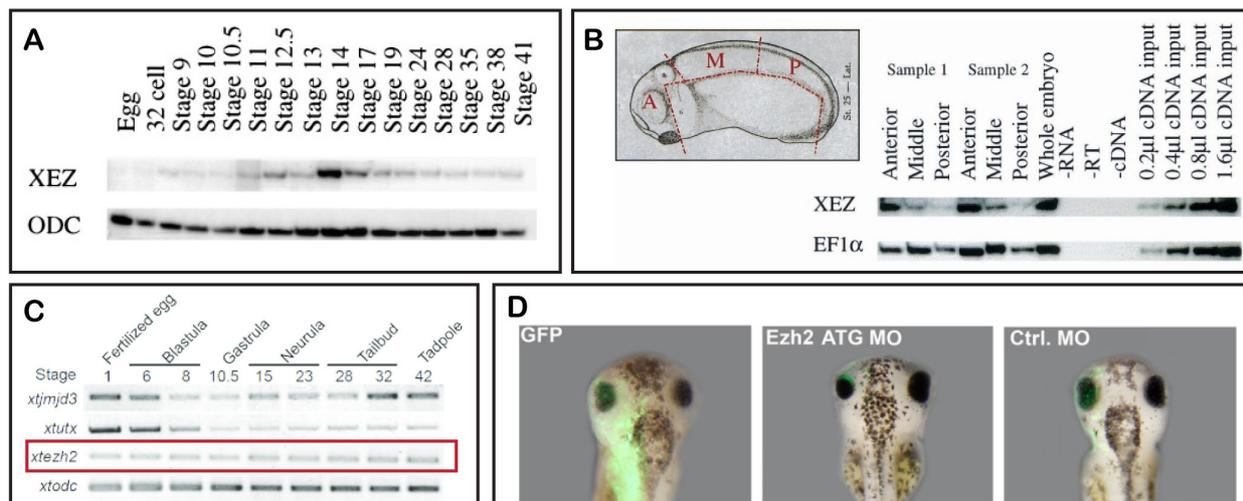
**Figure 28 – Profil d'expression spatio-temporel d'EZH2 et de H3K27me3 dans les embryons préimplantatoires de souris.** Des expériences d'immunodétection dans les embryons de souris ont été réalisées du stade zygote au stade blastocyste. La marque épigénétique H3K27me3 et la protéine EZH2 sont détectées dans les noyaux dès le début du développement jusqu'au stade blastocyste.

(D'après Erhardt et al., 2003 et Saha et al., 2013)

dans les noyaux de tous les blastomères du stade zygote au stade 16 cellules, puis au stade blastocyste on les retrouve majoritairement dans l'ICM (Inner Cell Mass) (figure 28) (Erhardt et al., 2003; Saha et al., 2013). A des stades plus tardifs, la protéine EZH2 est détectée dans les cellules du système nerveux, foie, cœur et tractus gastro-intestinal (Ningxia et al., 2011). Au cours du développement, l'inactivation d'Ezh2 conduit à la mort embryonnaire au stade E8,5. Ces embryons arrêtent de se développer après l'implantation (O'Carroll et al., 2001). Il a également été montré qu'EZH2 est essentielle à la ségrégation entre les premières cellules du trophoctoderme et les cellules pluripotentes de l'épiblaste (Erhardt et al., 2003). En effet, il a été montré que l'expression des marqueurs de pluripotence *Nanog*, *Sox2* et *Oct4* est diminuée lorsque l'expression d'Ezh2 est inhibée par l'injection d'un siRNA spécifique, suggérant ainsi qu'EZH2 est nécessaire pour le maintien de la pluripotence et est essentiel au développement embryonnaire préimplantatoire précoce (Huang et al., 2014).

#### 4.2.1.2. L'implication d'EZH2 au cours du développement embryonnaire de l'amphibien

Dans les embryons de xénope *Xezh2* a été identifié pour la première fois dans les années 2000. Ces travaux ont montré que *Xezh2* est détecté à partir du stade blastula tardif jusqu'au stade 41 (figure 29A). De plus, cette étude a montré que cette expression est restreinte à la partie antérieure de l'embryon. En effet, des expériences de RT-PCR sur des coupes de l'embryon au stade 25 ont montré que *Xezh2* est plus exprimé dans la région antérieure (figure 29B) (Barnett et al., 2001). En revanche, ces résultats ont été en désaccord avec trois autres études plus récentes. D'une part, des données de RT-PCR ont montré que *Xezh2* est détecté dès le stade zygote jusqu'au stade têtard de manière constante (figure 29C) (Kawaguchi et al., 2012; Tien et al., 2015). D'autre part, il a été montré par hybridation *in situ* que *Xezh2* est exprimé sur la totalité de l'axe antéro-postérieur et son expression ne serait donc pas restreinte exclusivement à la partie antérieure de l'embryon. Cette étude a également montré que les transcrits de *Xezh2* sont présents dans la moelle épinière présomptive au stade 19, puis, au stade 24, ils sont aussi détectés dans la région de la tête, y compris dans la vésicule optique. Au stade bourgeon caudal, l'expression de *Xezh2* persiste dans la région antérieure, notamment dans les arcs branchiaux, dans le mésencéphale et dans les yeux (Aldiri and Vetter, 2009; Tien et al., 2015). Dans l'œil, la protéine XEZH2 est enrichie dans les cellules progénitrices rétiniennes dans la région marginale ciliaire (Aldiri et al., 2013).



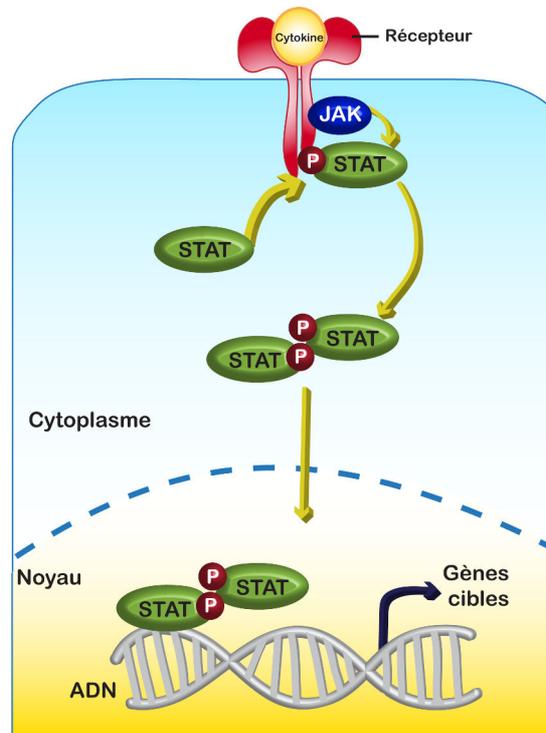
**Figure 29 – EZH2 au cours du développement embryonnaire de *Xenopus laevis*.** Les travaux de Barnett et ses collaborateurs sont représentés en A et B. **(A)** Des expériences de RT-PCR ont permis de dresser le profil d'expression temporel de Xezh2 dès le stage ovocyte jusqu'à l'organogenèse. **(B)** L'embryon a été découpé en 3 parties : l'antérieure (A), postérieure (P) et le milieu (M) et l'endoderme a été enlevé. Des analyses de RT-PCR ont ensuite été réalisées. **(C)** Profil d'expression temporel de Xezh2 analysé par RT-PCR Kawaguchi et ses collaborateurs. **(D)** (A gauche) Les embryons contrôle injectés avec la GFP. (Au milieu) Les embryons ont injectés avec le MO-Ezh2 du côté gauche. L'œil du côté injecté est plus petit. (A droite) Les embryons injectés avec le contrôle Morpholino.

(D'après Barnett et al., 2001; Kawaguchi et al., 2012 et Aldiri et al., 2013)

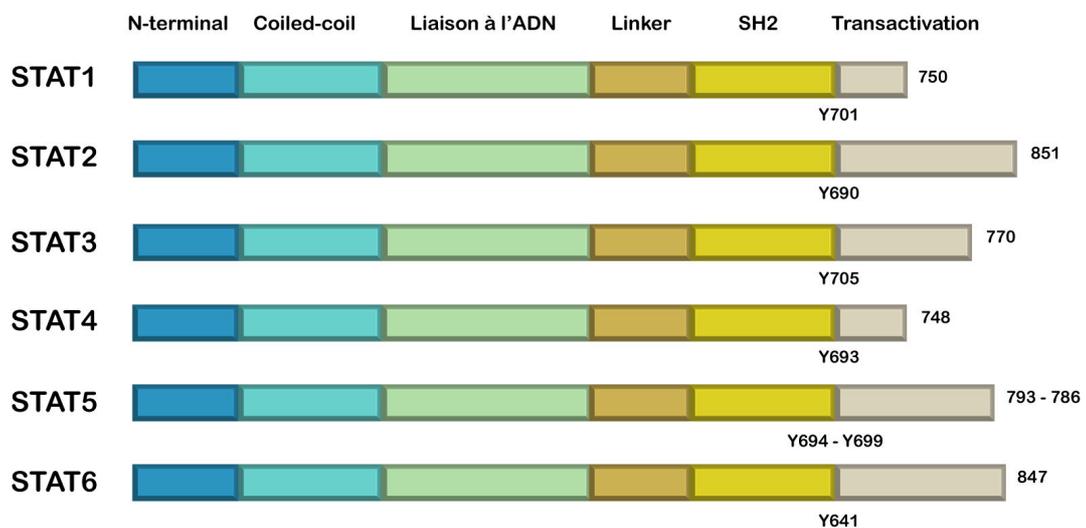
Actuellement existe peu de données sur la fonction de *Xezh2* *in vivo* chez l'amphibien. La surexpression de *Xezh2* a été analysée en injectant un ARNm (0,8 ng) dans les deux blastomères dorsaux au stade 4 cellules. Au stade têtard, aucun phénotype évident n'a été détecté. En revanche, des coupes de la partie antérieure de l'embryon ont montré un épaissement du plancher du mésencéphale, ce qui suggère que la surexpression de *Xezh2* pourrait affecter le développement neural (Barnett et al., 2001). L'inactivation de l'expression de *Xezh2* a également été étudiée en injectant des oligonucléotides morpholino spécifiques de *Xezh2* dans une cellule dorsale au stade 8 cellules. Au stade têtard, le diamètre de l'œil du côté injecté diminue de 15% (n=18), ce qui suggère que *Xezh2* est impliqué dans le développement de la rétine (figure 29D) (Aldiri et al., 2013).

Au niveau moléculaire, il a été montré que *Xezh2* est induit par *Noggin*. En effet, une étude sur des explants issus de la calotte animale dans lesquels l'ARNm codant pour *Noggin* a été injecté, a montré une augmentation de l'expression de *Xezh2*. De plus, lors de cette même étude, la surexpression de *Xezh2* inhibe l'expression d'*En-2* (marqueur de la jonction mésencéphale et le cerveau postérieur) et *Krox-20* (marqueur du cerveau postérieur). Les auteurs ont ainsi proposé que ces deux gènes pourraient être des gènes cibles de *Xezh2* et que *Xezh2* inhiberait la postériorisation des tissus (Barnett et al., 2001). Une autre étude a montré que *XEZH2* interagit avec le facteur de transcription *Snail2* au stade gastrula. Cette interaction permet le recrutement du complexe *PRC2* sur les gènes cibles de *Snail2* pour réguler le développement des crêtes neurales. Cette étude suggère qu'*EZH2* contrôle la migration des crêtes neurales (Tien et al., 2015).

L'ensemble de ces résultats montre que *EZH2* est impliquée dans le développement embryonnaire. D'autres études ont montré cette méthyltransférase est également impliquée dans des processus cancéreux. En effet, une étude menée dans les cellules tumorales humaines a été montré qu'en plus de son activité épigénétique, *EZH2* pourrait avoir plusieurs cibles autres que l'histone H3, comme c'est cas du facteur de transcription *STAT3*. *EZH2* se lie et méthyle *STAT3*, ce qui conduit à l'activation de ce facteur de transcription. Ceci favorise l'autorenouvellement des cellules souches de glioblastomes (Kim et al., 2013). Je détaillerai cette interaction dans le chapitre suivant.



**Figure 30 – Schéma simplifié de la voie de signalisation de JAK/STAT.** STAT est recrutée à la membrane par les JAK kinases au niveau du récepteur membranaire de la cellule pour être phosphorylée sur la tyrosine. Une fois phosphorylée, elle va former un dimère avec une autre protéine STAT. Ce dimère se transloque dans le noyau et contacte l'ADN sur des sites spécifiques pour réguler la transcription des gènes cibles. (P : phosphorylation) (D'après Harrison, 2012)



**Figure 31 – Schéma simplifié des protéines de la famille STAT.** Les sept membres de la famille STAT présentent des similitudes dans leurs structures protéiques. Le domaine amino-terminal permet l'interaction entre les deux dimères de STAT pour former un tétramère. Le domaine « coiled-coil » est nécessaire aux interactions protéiques. Le domaine de liaison à l'ADN se fixe directement sur les promoteurs de gènes au niveau des sites de fixation de STAT. Le domaine SH2 est nécessaire à la dimérisation de la protéine et est requis pour établir les interactions protéine-protéine. Cette dimérisation permet la liaison des STATs à l'ADN. Le domaine de transactivation est impliqué dans l'activation transcriptionnelle des gènes cibles des STATs. Les sites de phosphorylation sur le résidu tyrosine (Y) représentés en dessous de chaque protéine. Le site de phosphorylation sur un résidu sérine est localisé dans la partie carboxy-terminale. Cette phosphorylation améliore l'activité transcritptionnelle des protéines STATs. (Y : tyrosine).

(D'après Miklossy et al., 2013)

## E. Le facteur de transcription STAT3

### 1. La famille STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)

La famille des protéines STAT a été découverte dans les années 1990s. A cette époque, il avait été montré que des peptides spécifiques, notamment les interférons (IFN), étaient capables de se fixer à leurs récepteurs présents à la surface de la cellule pour entraîner la transcription d'un groupe de gènes. Les protéines de cette famille STAT ont été retrouvées chez plusieurs espèces dont la drosophile, le poisson-zèbre ou encore le xénope. Les gènes de la famille STAT codent pour des facteurs de transcription présents dans le cytoplasme en condition basale et qui sont activés transitoirement par des signaux extracellulaires, notamment par les récepteurs aux cytokines, aux hormones ou aux facteurs de croissance.

Dans les cellules, un récepteur localisé dans la membrane plasmique est stimulé suite à l'arrivée d'une cytokine. Ensuite, les tyrosine-kinases JAK (Janus kinases) en s'associant avec la sous-unité gp130 (signal transducer glycoprotein 130), s'activent par transphosphorylation. Une fois activées, les JAK kinases phosphorylent le récepteur dans sa région intra-cytoplasmique sur des résidus tyrosines. Le récepteur phosphorylé recrute alors les STAT qui sont à leur tour phosphorylées sur le résidu tyrosine par les JAK. Les STAT phosphorylées forment des homo ou hétérodimères et sont transloquées vers le noyau pour réguler l'expression de leurs gènes cibles (figure 30) (Harrison, 2012).

Les STATs ont une structure modulaire comprenant des domaines fonctionnels très conservés entre les protéines de cette famille. Ces domaines fonctionnels comprennent : i) un domaine amino-terminal (N-term), ii) un domaine coiled-coil, iii) un domaine de liaison à l'ADN, iv) un domaine linker, v) un domaine SH2 (Src Homology 2) et un domaine de transactivation (TAD) (figure 31) (Miklossy et al., 2013).



## **2. Implication des STATs au cours du développement embryonnaire**

La famille des gènes Stats comprend 7 membres chez les mammifères : *STAT1*, *STAT2*, *STAT3*, *STAT4*, *STAT5A*, *STAT5B* et *STAT6*. Chez le xénope, on retrouve trois homologues de ces gènes Stats: *stat1*, *stat3* et *stat5* (Nishinakamura et al., 1999; Pascal et al., 2001; Turpen et al., 2001). Au cours du développement embryonnaire de l'amphibien, la fonction respective de ces gènes n'a pas été entièrement élucidée.

### **2.1. STAT1**

La protéine STAT1 peut être activé par les tyrosines kinases, par des cytokines (IFN), par des récepteurs à tyrosine kinases (par exemple par EGF (Epidermal Growth Factor) ou FGF) ou par des protéines G (MIP-1 ou RANTES). Cette protéine peut être phosphorylée sur la tyrosine 701 et sur la sérine 727. Une fois activée, cette protéine régule la transcription de plusieurs gènes, y compris de *Stat1* lui-même. STAT1 régule l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire ou dans la réponse des agents pathogènes. Les souris déficientes pour *Stat1* (*Stat1<sup>-/-</sup>*) ne présentent pas d'anomalies physique particulières, en revanche elles sont très sensibles aux infections par des agents pathogènes microbiens et des virus (Meraz et al., 1996).

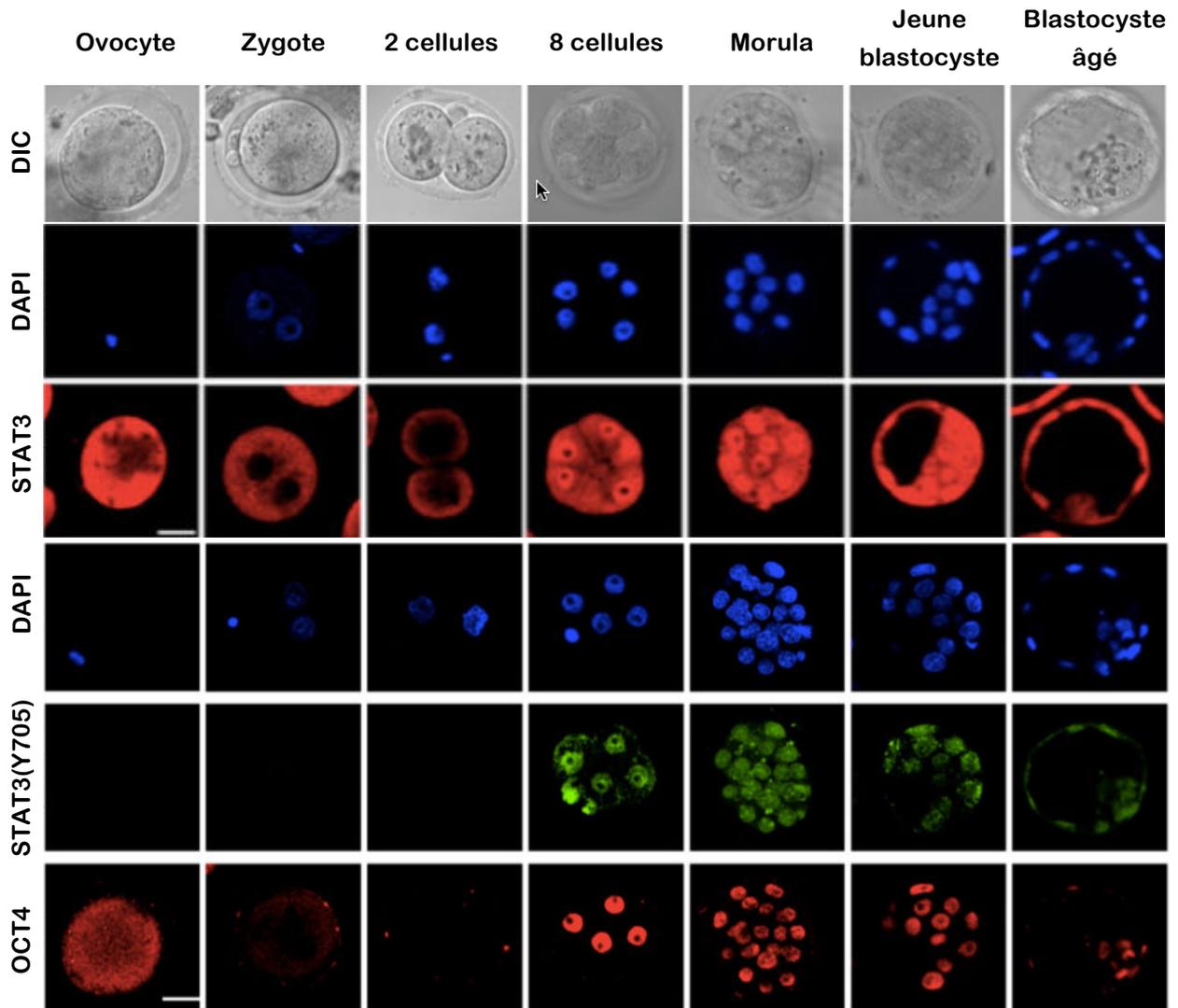
Au cours du développement embryonnaire de l'amphibien, *XStat1* est détecté de manière très abondante dès le stade ovocyte jusqu'à la transition blastuléenne, tandis qu'à partir du stade neurula, les niveaux d'ARN de *XStat1* semblent être plus faibles. Ces résultats ont été obtenus par des expériences de RT-PCR, sans qu'une quantification des transcrits de *XStat1* soit possible. Au cours de la neurulation et du stage bourgeon caudal, *XStat1* est détecté, par hybridation *in situ*, dans la région dorso-antérieure de l'embryon. En ce qui concerne la protéine, elle est traduite dès le début du développement et au cours de la segmentation. Chez l'amphibien, cette protéine est phosphorylée sur la tyrosine 701 au cours de la segmentation, suggérant ainsi qu'elle serait activée pendant cette fenêtre de temps (Turpen et al., 2001).



## 2.2. STAT5

La protéine STAT5 peut être activé par les tyrosines kinases (HTVL-1), par des cytokines (par exemple par des hormones de croissance ou IL-2) ou par des récepteurs à tyrosine kinases (par exemple par EGF ou PDGF). STAT5 peut être phosphorylée sur la tyrosine 699 et sur deux résidus sérine : S128 et S193. Chez les embryons de souris, il a été montré que STAT5b est essentielle à la croissance post-natale. Les souris déficientes pour *Stat5b* (*Stat5<sup>-/-</sup>*) ont des problèmes de développement des organes sexuels du mâle. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ce facteur de transcription est connu pour être activé en réponse à l'hormone de croissance dans les cellules de Leydig. De plus, ces souris présentent des problèmes de nanisme (Kanzaki and Morris, 1998). En ce qui concerne *Stat5a*, la déplétion de ce gène conduit à un mauvais fonctionnement mammaire (Liu et al., 1997).

Au cours du développement embryonnaire du xénope, *XStat5* présente une expression maternelle et zygotique. Au stade gastrula, cet ARN est distribué de manière ubiquitaire, alors qu'à partir du stage neurula, il se concentre dans la région antérieure de la future plaque neurale. Au stade bourgeon caudal, il est fortement détecté au niveau des yeux et de la glande adhésive, et à des doses plus faibles dans les structures dorsales de l'embryon comme les somites, la notochorde et le tube neural. Au niveau ventral, *XStat5* est également présent, notamment au niveau du VBI (Ventral Blood Island), la région où se développent les érythrocytes (Pascal et al., 2001). Chez l'amphibien, il a été montré que la dérégulation de cette protéine induit des défauts tardifs lors de l'érythropoïèse. En effet, *XStat5* fonctionne comme un répresseur au cours de l'érythropoïèse primitive, pour permettre le développement des cellules érythroïdes. Pendant cette période, *XStat5* antagonise les gènes qui inhibent le développement de ces cellules. Ensuite, pendant les étapes tardives de l'érythropoïèse, *XStat5* agit comme un activateur pour réguler la prolifération et la survie des érythrocytes définitifs (Schmerer et al., 2006).



**Figure 32 – Profil d'expression spatio-temporel de STAT3 et de STAT3 (Y705) dans les embryons préimplantatoires de souris.** Des expériences d'immunodétection dans les embryons de souris ont été réalisées du stade ovocyte jusqu'au stade blastocyste. La protéine STAT3 est présente dès le stade ovocyte. Sa forme activée sur la tyrosine 705 n'est détectée qu'à partir du stade 8 cellules. Oct4 est un gène cible de STAT3. Cette protéine est détectée dans le cytoplasme de l'ovocyte. Elle est observée dans les noyaux de l'embryon à nouveau à partir du stade 8 cellules.

(D'après Do et al., 2013)

## 2.3. STAT3

Le rôle de STAT3 lors de l'embryogenèse précoce commence à être élucidé. La plupart des travaux se sont focalisés sur la fonction de Stat3 principalement au cours du développement de la souris.

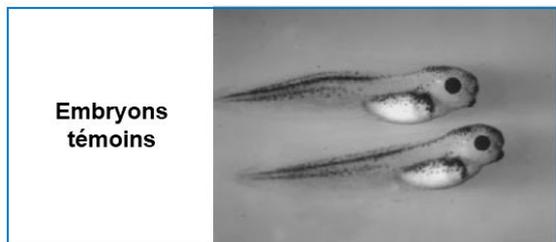
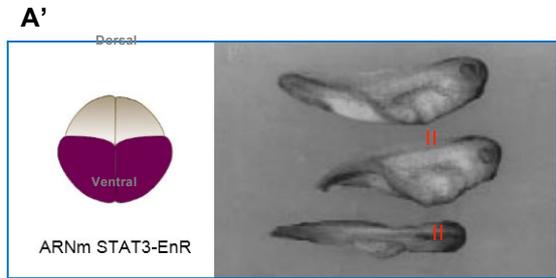
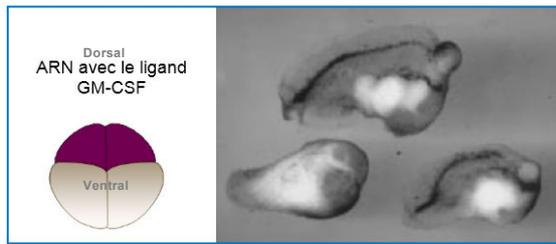
### 2.3.1. STAT3 au cours du développement embryonnaire de la souris

Chez la souris, l'ARN de *Stat3* est présent maternellement et est exprimé de manière ubiquitaire dans l'embryon ainsi que dans les tissus extraembryonnaires aux premiers stades de développement (Duncan et al., 1997). Dans les stades plus tardifs, *Stat3* est détecté dans tous les tissus comme la peau, le thymus et le système nerveux (Levy and Lee, 2002). La protéine STAT3 est présente dès le stade ovocyte dans le cytoplasme. Après la mise en place de la transcription zygotique cette protéine est localisée également dans le noyau. La forme activée de STAT3, STAT3-Y705, n'est détectée qu'à partir la transition blastuléenne (figure 32), suggérant ainsi STAT3 pourrait éventuellement jouer un rôle dès le début du développement précoce (Do et al., 2013). En effet, la déplétion du gène *Stat3* est létale pour l'embryon, juste après l'implantation du blastocyste. Les embryons meurent au stade E7.0 avec des défauts de gastrulation, notamment à cause de leur incapacité à former du mésoderme entre l'ectoderme et l'endoderme (Takeda et al., 1997). Une étude plus récente a montré que STAT3 régule directement l'expression d'*Oct4* et *Nanog* pour maintenir la pluripotence des cellules souches embryonnaires. Ainsi, STAT3 est impliquée dans le maintien de la pluripotence de ces cellules (Do et al., 2013).

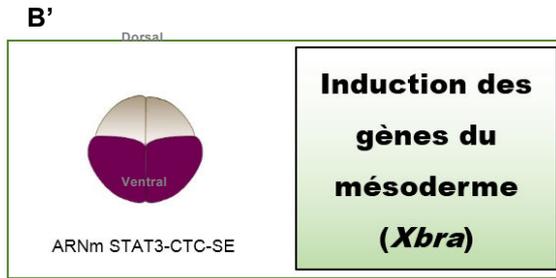
### 2.3.2. STAT3 au cours du développement embryonnaire de l'amphibien

Chez le xénope, il a été montré par RT-PCR quantitative que l'ARNm de *XStat3* est exclusivement présent dans l'hémisphère animal de l'embryon du stade 4 au stade 6 (Flachsova et al., 2013). Les travaux de Nishinakamura ont montré qu'au stade gastrula, cet ARNm est détecté, par hybridation *in situ*, principalement dans le neuroectoderme présomptif. En ce qui concerne la protéine STAT3, elle est présente dès le stade 1

## A Etude de Nishinakamura



## B Etude d'Ohkawara



**Figure 33 – Schéma simplifié des résultats obtenus durant les études de Nishinakamura et d'Ohkawara.** (A-B') en violet : blastomères injectés avec les constructions indiquées. (A gauche) Dans l'étude de Nishinakamura, (A) l'activation de STAT3, induite par l'injection d'une forme activée du récepteur gp130 (GM-CSF) dans les blastomères dorsaux, induit une forte ventralisation des embryons. (A') La conversion de STAT3 d'un activateur en un répresseur induite par l'injection de l'ARNm Stat3-EnR dans les blastomères ventraux, induit la formation d'un double axe (||) (A droite) Dans l'étude d'Ohkawara, (B) la perte de fonction de STAT3, induite par l'injection d'un morpholino spécifique de STAT3 dans les blastomères dorsaux, induit des problèmes de gastrulation et un axe antéro-postérieur raccourci. (B') L'injection d'une forme constitutivement active de STAT3 dans les blastomères ventraux induit l'expression des gènes du mésoderme.

(D'après Nishinakamura et al., 1999 et Ohkawara et al., 2004)

(ovocyte) jusqu'au stade 42 (stade larvaire), suggérant une contribution maternelle et zygotique (Nishinakamura et al., 1999). Une autre étude qui porte sur le rôle de STAT3 au cours de la mise en place des crêtes neurales, a montré, par immunodétection, que STAT3-Y705 est présente au niveau de l'ectoderme à la fin de la gastrulation et au cours de la neurulation chez le xénope. Cette étude s'est focalisée essentiellement sur le rôle de STAT3 dans la mise en place des crêtes neurales. Pour cette raison, les auteurs n'ont pas détaillé si STAT3-Y705 est présente également dans les deux autres feuillets embryonnaires (Nichane et al., 2010).

Toutes ces données montrent que STAT3 est exprimée et potentiellement active lors du développement précoce, mais sa cinétique d'expression et d'activité au cours du développement n'a pas été analysée en détail chez l'amphibien. Deux autres études ont analysé en partie les conséquences de la dérégulation de STAT3 au cours du développement embryonnaire.

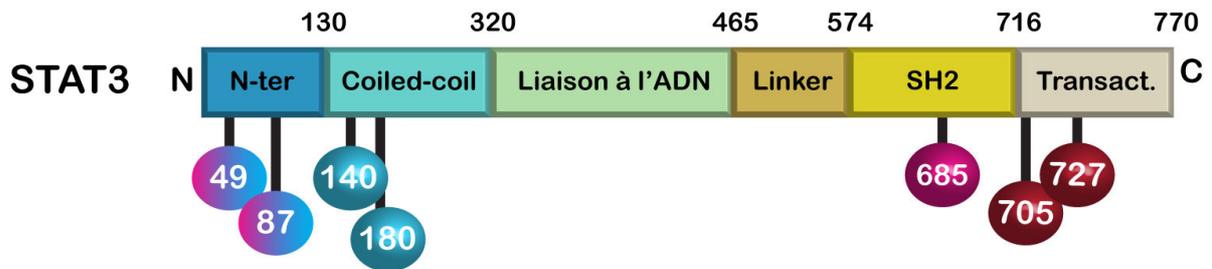
D'abord, les travaux de Nishinakamura portent sur l'étude du rôle des récepteurs Cytokines dans la régionalisation de l'axe dorso-ventral. Ils ont montré que l'injection d'une forme activée du récepteur activateur gp130 au stade 4 cellules dans les blastomères dorsaux, induit une forte ventralisation des embryons (figure 33A) et inhibe l'expression des marqueurs du mésoderme comme *Xnot* et *MyoD*. Par des essais luciférase, les auteurs ont montré que XSTAT3 est activée transcriptionnellement suite à la stimulation de gp130. L'injection d'une forme dominante négative de STAT3 (STAT3-EnR, où la région responsable des propriétés activatrices de la transcription a été remplacée par un domaine répresseur *Engrailed*) dans la partie ventrale de l'embryon induit la formation d'un axe embryonnaire surnuméraire (Figure 33A'). Ainsi, lorsque Stat3 est converti en un répresseur, les tissus injectés sont dorsalisés. L'ensemble de ces résultats suggère que STAT3 aurait une activité ventralisatrice. Comme j'ai décrit précédemment dans le premier chapitre, l'injection d'une forme dominante négative de BMP-4 induit la formation d'un double axe (Suzuki et al., 1994). Les auteurs ont montré que l'activation de gp130, et par conséquent de XSTAT3, n'a pas restauré ce phénotype. Ceci suggère que l'activité ventralisante de STAT3 est indépendante de la voie BMP. Les auteurs ont montré que la *Xwnt8* n'active pas XSTAT3. Ils ont ainsi proposé que la voie gp130/Xstat3 est indépendante de la signalisation Wnt. En revanche, ils ont suggéré que Xstat3 aurait un lien avec le facteur transducteur de signal Smad2. La surexpression ectopique de Smad2 induit la formation d'un axe surnuméraire, et ce phénotype est restauré par la co-injection avec les récepteurs de cytokines, ce qui suggère que l'activité dorsalisante de Smad2 est inhibée par l'activation de ces récepteurs et donc



l'activation de Xstat3. Les auteurs ont ainsi proposé que Xstat3 régule l'inhibition de la voie Smad2, et ceci pourrait expliquer les propriétés ventralisatrices de Xstat3. Les travaux de Nishinakamura ont ainsi proposé que l'activité ventralisatrice de Stat3 est indépendante de la voie BMP et que Stat3 fonctionne en inhibant notamment Smad2 (Nishinakamura et al., 1999).

D'autres travaux ont étudié l'implication de la voie STAT3 dans l'induction du mésoderme. D'abord, les travaux de Ohkawara ont montré que l'inhibition de NLK (Nemo-like kinase, qui inhibe la voie de signalisation Wnt) conduit à la formation d'embryons avec une gastrulation incomplète et un axe antéro-postérieur raccourci. Ils ont également montré que NLK interagit avec STAT3 et phosphoryle directement son résidu sérine localisé dans la partie carboxy-terminale. Ensuite, ils ont étudié le rôle de STAT3 dans l'induction du mésoderme. L'injection d'un morpholino spécifique de Xstat3 dans la région dorsale de l'embryon induit un phénotype similaire à celui obtenu lors de l'inhibition de NLK (gastrulation incomplète et axe antéro-postérieur raccourci) (figure 33B). L'expression des marqueurs mésodermiques *Xbra*,  *$\alpha$ -actin* et *Xnot* au niveau de la zone marginale dorsale est également inhibée. Les auteurs ont également utilisé trois formes dominantes négatives de STAT3 – les mutants simples STAT3-YF, STAT3-SA ou le double mutant STAT3-YFSA (dans ces mutants les acides aminés Y et S ont été remplacés par des acides aminés non phosphorylables). Ils ont montré que l'injection de ces formes induit la diminution de l'expression de *Xbra*. A l'inverse, l'utilisation d'un mutant constitutivement actif de STAT3, STAT3-CTC-SE (qui mime la dimérisation et la phosphorylation de STAT3) induit l'expression de *Xbra* (figure 33B'). Ces résultats suggèrent ainsi que la dimérisation et la phosphorylation de STAT3 sont requises pour l'induction du mésoderme et que STAT3 pourrait être importante pour la mise en place des feuillets embryonnaires primordiaux (Ohkawara et al., 2004).

Ces deux études réalisées avec les embryons de xénope, montrent que le maintien d'une protéine STAT3 fonctionnelle serait fondamental pour l'établissement du mésoderme et la mise en place de l'axe dorso-ventral.



**Figure 34 – Représentation des modifications post-traductionnelles de STAT3.**

Le facteur de transcription STAT3 est méthylé sur les résidus lysine 49, 87, 140 et 180 (bleu). Il est acétylé sur les résidus lysine 49, 87 et 685 (rose). Enfin, STAT3 est phosphorylée le domaine de transactivation (Transact.) sur ses résidus tyrosine 705 et sérine 727.

### **2.3.3. La régulation de Stat3**

La protéine STAT3 est régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, l'acétylation ou la méthylation (figure 34) permettant soit son activation soit son inhibition.

#### **2.3.3.1. La phosphorylation de STAT3**

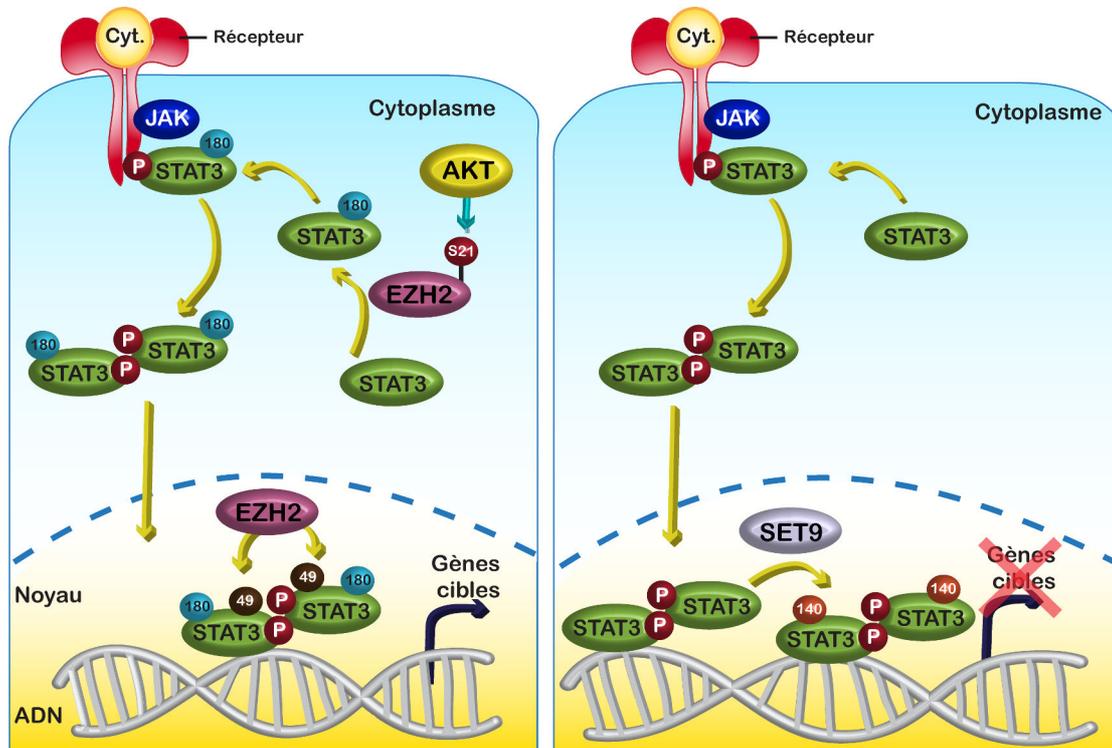
Comme j'ai décrit précédemment, STAT3 peut être phosphorylée sur les résidus tyrosine 705 (Y705) et sérine 727 (S727).

La phosphorylation sur Y705 est un prérequis pour son activation. En effet, il a été montré que cette phosphorylation est nécessaire pour la dimérisation de STAT3, pour son entrée dans le noyau et pour l'activation de ses gènes cibles. STAT3 peut être phosphorylée sur cette tyrosine en réponse à une stimulation par des récepteurs ayant activité tyrosine kinase (comme EGF ou PDGF (Platelet Derived Growth Factor) ou par Src ou JAK) (Dimri et al., 2017).

Outre la phosphorylation du résidu Y705, STAT3 subit également la phosphorylation sur le résidu S727 (S728 chez le xénope). Cette sérine peut être phosphorylée par des nombreuses kinases telles que MAPK (Mitogen Associated Protein Kinase), CDK5 (cyclin-dependent-like kinase 5), ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) ou encore JNK (c-Jun N-terminal kinases) (Dimri et al., 2017). Il a été montré que cette phosphorylation serait requise pour une activité transcriptionnelle maximale de STAT3 (Wen Z and Darnell JE Jr, 1997).

#### **2.3.3.2. L'acétylation de STAT3**

Des études ont montré que STAT3 interagit avec l'histone acétyltransférase p300/CREB-binding protein (CBP). Il a été montré dans des cellules humaines que p300 est requise pour l'activation des gènes cibles de STAT3. L'acétylation sur le résidu K685, localisé entre le domaine SH2 et le domaine de transactivation de STAT3, est nécessaire à la dimérisation de STAT3 et par conséquent à sa liaison à l'ADN (Yuan, 2005). Le co-activateur p300 peut également acétyler les résidus K49 et K87 localisés dans la partie amino-terminale de STAT3. Cette acétylation est requise pour maintenir une interaction



**Figure 35 – STAT3 est méthylée par EZH2 et SET9 sur les résidus lysine.** (A gauche) Le facteur de transcription STAT3 peut être méthylé par EZH2 sur le résidu lysine 180 (cercle bleu). Pour ce faire, EZH2 doit être préalablement phosphorylé sur le résidu sérine 21 par AKT. Cette méthylation de STAT3 participe à la phosphorylation de STAT3 sur le résidu tyrosine 705 (cercle rouge). EZH2 peut également méthylé STAT3 sur le résidu K49 (cercle marron). Cette méthylation a probablement lieu dans le noyau car les auteurs ont montré que la mutation de ce résidu ne change pas la liaison de STAT3 au promoteur de son gène cible SOCS3. (A droite) STAT3 peut être méthylé par la méthyltransférase SET9 sur le résidu K140 (cercle orange). Cette méthylation a lieu dans le noyau. (Cyt. : cytokines ; P : phosphorylation). (D'après Dasgupta et al., 2015; Kim et al., 2013 et Yang et al., 2010)

Mutants de STAT3	K140R	K49R	K180R
Auteurs	Yang et al. 2010	Dasgupta et al. 2015	Kim et al. 2013
Méthyltransférase	SET9	EZH2	EZH2
Phosphorylation Y705	↗	N.D.	↘
Expression des gènes cibles	↗	↘	↘
Interaction avec EZH2	N.D.	↘	↘
Activité transcriptionnelle de STAT3	N.D.	N.D.	↘

**Table 2 – Les conséquences des mutants ponctuels non méthylables de STAT3.** Les mutations ponctuelles de STAT3 sur les résidus lysine 140, 49 et 180 rendent cette protéine non méthylable sur ces résidus. Le résidu K140 est méthylé par SET9. La surexpression de STAT3-K140R provoque l'augmentation la phosphorylation sur la tyrosine 705 (Y705) et de l'expression des gènes cibles de STAT3. Ainsi, la méthylation sur le résidu K140 régule négativement l'activité de STAT3. Les résidus K49 et K180 sont méthylés par EZH2. Le mutant STAT3-K49R provoque la diminution de l'expression des gènes cibles et interagit moins avec EZH2. Des résultats similaires ont été observés pour le mutant STAT3-K180R. De plus, pour ce mutant, il a été montré que la phosphorylation sur Y705 et l'activité transcriptionnelle de STAT3 diminuent. Ainsi, la méthylation sur les résidus K49 et K180 régule positivement l'activité de STAT3. (N.D : non déterminé ; ↗: augmente ; ↘: diminue).

stable entre STAT3 et p300 et est essentielle pour l'activité transcriptionnelle de STAT3 (Ray et al., 2005).

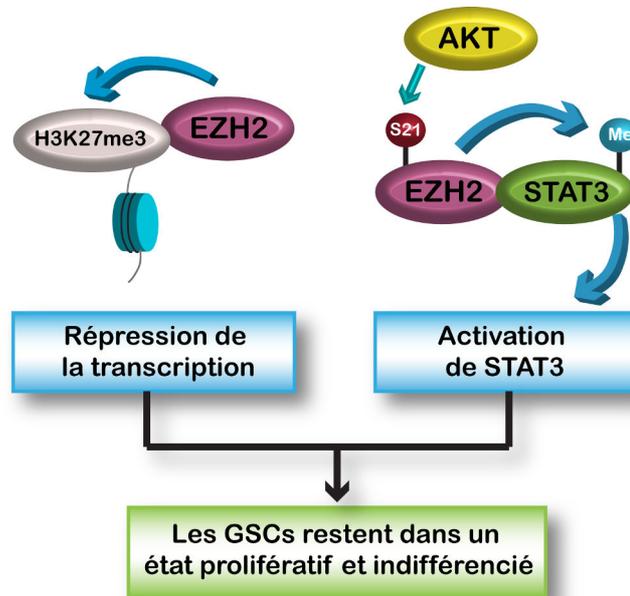
### 2.3.3.3. La méthylation de STAT3

STAT3 peut être méthylée sur plusieurs résidus lysines (K), par deux méthyltransférases différentes, par SET9 sur la lysine 140 et par EZH2 sur les lysines 180 et 49. Selon le résidu lysine méthylé, STAT3 peut activer ou inhiber la transcription de ses gènes cibles (figure 35).

L'équipe de G. Stark a montré que SET9 diméthyle STAT3 sur son résidu K140 en réponse à l'IL-6 et que la H3K4 déméthylase LSD1 (Lysine-Specific Demethylase) est responsable de sa déméthylation dans la lignée humaine A4 dérivée de cellules du cancer du côlon. Lorsque le résidu K140 est rendu non méthylable (par les mutations ponctuelles K140R ou K140A), la phosphorylation de STAT3 sur le résidu Y705 augmente. De plus, l'expression de certains gènes cibles de STAT3, comme *Socs-3* (*Supressor of cytokine-signaling 3*) par exemple, augmente également. Ceci suggère que la méthylation de STAT3 sur ce résidu conduit à une régulation négative de l'activité de STAT3. Cette modification transcriptionnelle a lieu dans le noyau, lorsque STAT3 est déjà fixé sur le promoteur de ses gènes cibles (Table 2). Lors de cette étude, ils ont également montré STAT3 est méthylée après la phosphorylation du résidu Y705. De plus, les auteurs ont proposé que la liaison à l'ADN et la phosphorylation du résidu S727 sont deux évènements indispensables à la méthylation du résidu K140 (Yang et al., 2010).

En plus de l'acétylation du site K49, l'équipe de G. Stark a montré que ce résidu pouvait également être diméthylé par la méthyltransférase EZH2 en réponse à l'IL-6, dans la lignée cellulaire humaine A4. Ils ont montré que la phosphorylation de STAT3 sur Y705 est requise pour cette diméthylation et qu'EZH2 se lie préférentiellement à STAT3 phosphorylée sur la tyrosine 705. Cette diméthylation du résidu K49 est nécessaire à l'expression des gènes cibles de STAT3 comme *Serpina*, *Bcl3* et *Socs-3*, car quand ce site est muté (K49R ou K49A), l'expression de ces gènes est diminuée (Table 2) (Dasgupta et al., 2015).

La fonction de la méthylation des résidus lysine de STAT3 a également été étudiée dans les cellules souches cancéreuses humaines de glioblastome (GSCs). Tout d'abord, l'équipe de J. Lee a montré que STAT3 interagit avec les membres du complexe PRC2,



**Figure 36 – Représentation schématique des deux fonctions d'EZH2 dans les GSCs.**

Dans les cellules souches de glioblastome (GSCs) la méthyltransférase EZH2 présente deux rôles différents : elle peut avoir une activité épigénétique et triméthylter les histones ou elle peut méthyle le facteur de transcription de STAT3. (Me : méthylation ; S21 : sérine 21)

(D'après Kim et al., 2013)

Mutants d'EZH2	S21A	S21D
<b>Fonction</b>	Perte de fonction	Gain de fonction
<b>Phosphorylation S21</b>	↘	↗
<b>Méthylation sur H3K27me3</b>	↗	N.D.
<b>Méthylation de STAT3 sur les résidus K</b>	↘	↗
<b>Phosphorylation de STAT3 sur Y705</b>	↘	N.D.
<b>Interaction avec EZH2</b>	↘	N.D.
<b>Activité transcriptionnelle de STAT3</b>	↘	↗
<b>Expression des gènes cibles de STAT3</b>	↘	↗

**Table 3 – Les conséquences des mutants ponctuels d'EZH2 sur le résidu sérine 21.** Le résidu S21 d'EZH2 est phosphorylé par AKT. La forme non phosphorylable d'EZH2 (EZH2-S21A) se comporte comme un mutant perte de fonction vis à vis de l'activité de STAT3, alors que le mutant EZH2-S21D est une forme constitutivement active. (N.D. : non déterminé ; ↗: augmente ; ↘: diminue).

comme EED, SUZ12 et EZH2. De plus, dans les GSCs, EZH2 régule positivement l'activité de STAT3 et triméthyle cette protéine sur le résidu K180. Afin d'étudier le rôle de cette méthylation, cette équipe a généré un mutant ponctuel de ce résidu, K180R, dans lequel la méthylation ne peut pas avoir lieu. Lorsque STAT3 n'est pas méthylée sur ce résidu, plusieurs événements sont affectés. D'abord on observe une diminution de l'interaction entre STAT3 et EZH2. L'activité transcriptionnelle de STAT3 et l'expression des gènes cibles de STAT3, *Socs-3* et *c-Myc* est inhibée. De plus, la phosphorylation sur la tyrosine 705 et la transcription de *Sox2* et *Nanog*, normalement induite par la signalisation STAT3, sont également diminuées (Table 2). Ainsi, EZH2 méthyle STAT3 sur le résidu K180 et cet événement est requis pour l'activation de ce facteur de transcription (Kim et al., 2013). Une autre étude menée dans des cellules humaines de glande mammaire a montré qu'AKT phosphoryle la protéine EZH2 sur le résidu Sérine 21 (S21). Dans cette étude, les auteurs ont également montré que cette phosphorylation entraîne une diminution de la triméthylation de l'histone H3K27 et mène à la dérégulation de certains gènes (Cha et al., 2005). Afin de comprendre comment EZH2 pourrait réguler positivement l'activité de STAT3, l'équipe de J. Lee a étudié les conséquences de l'inhibition d'AKT. Dans les GSCs, l'inhibition spécifique d'AKT par la perifosine conduit à la diminution de la phosphorylation de EZH2 sur le résidu S21, et à une diminution de la méthylation de STAT3 sur les résidus lysine et de la phosphorylation de STAT3 sur Y705. L'interaction entre STAT3 et EZH2 diminue également. En revanche, les niveaux de H3K27me3 augmentent. De plus, l'équipe a également étudié en détail le rôle de la phosphorylation d'EZH2 sur S21, en utilisant deux mutants ponctuels : S21A et S21D, permettant d'exprimer soit une forme non phosphorylable, soit une forme mimant une phosphorylation constitutive, respectivement (Table 3). Lorsque EZH2 n'est pas phosphorylée sur le résidu S21, l'interaction entre STAT3 et EZH2 est perdue et la méthylation, l'activité transcriptionnelle et l'expression des gènes cibles de STAT3 sont diminuées. En revanche, elles sont augmentées lorsque la phosphorylation sur S21 est constitutivement mimée. Ainsi, ces résultats montrent que AKT régule la signalisation de STAT3 via la phosphorylation d'EZH2 sur S21. Ceci entraîne la méthylation de STAT3 et son activation. Cette équipe a ainsi montré que la protéine EZH2 a deux rôles différents : elle peut trimétyler l'H3K27, ce qui entraîne la répression de certains gènes, ou alors EZH2 peut trimétyler et activer le facteur de transcription STAT3 (figure 36). Ils ont aussi montré que la phosphorylation du résidu S21 d'EZH2 est spécifiquement requise pour trimétyler uniquement le facteur de transcription STAT3 (Kim et al., 2013).

# Projet de thèse

La formation des trois feuillets embryonnaires primordiaux (ectoderme, mésoderme et endoderme) et leur régionalisation selon les axes (dorso-ventral et antéro-postérieur) sont des étapes décisives au cours du développement. Comme je vous ai décrit précédemment, ces processus exigent un contrôle strict de l'expression génique et de différentes voies de signalisation.

Notre équipe s'intéresse aux mécanismes cellulaires et moléculaires qui président à l'induction et l'établissement de ces axes et feuillets dans l'embryon de *Xenopus laevis*. Dans ce contexte, nous étudions l'implication de certains gènes homologues de ceux localisés dans la région DSCR, dont *Xdscr6*. En 2013, l'équipe a publié un article dans lequel ils ont montré que XDSCR6 est capable de modifier la nature des tissus embryonnaires ventraux en les induisant en tissu mésodermique dorsal et tissu neural. De plus, la surexpression de *Xdscr6*, dans la région ventrale de l'embryon conduit à la formation d'un axe surnuméraire. Cette activité dorsalisante de XDSCR6 repose sur sa capacité à interagir avec des protéines de la famille polycomb comme XEZH2 et XBMI1 via le motif WRPW. XDSCR6 est capable de les décrocher de la chromatine, empêchant ainsi leur activité répressive sur la transcription de certains gènes du mésoderme dorsal (Li et al., 2013).

EZH2 est une méthyltransferase qui appartient à la famille Polycomb. Dans les cellules cancéreuses humaines, il a été montré que cette protéine possède deux rôles différents : elle peut soit engendrer une répression transcriptionnelle via la triméthylation de H3K27, soit triméthyliser le facteur de transcription STAT3 pour induire son activation (Dasgupta et al., 2015; Kim et al., 2013). Chez l'amphibien, l'existence de ce complexe EZH2-STAT3 n'a jamais été étudiée. De plus, le rôle de l'activation de STAT3 au cours du développement embryonnaire précoce est peu décrit. Comme nous avons vu dans le chapitre E, à l'instar de la surexpression dans la région ventrale de *Xdscr6*, l'injection d'une forme mutante de XSTAT3, XSTAT3-EnR, dans laquelle Stat3 est converti en un répresseur, conduit à la formation d'un axe surnuméraire. A l'inverse, l'activation de XSTAT3 via l'activation du récepteur gp130 dans la région dorsale induit des défauts antérieurs (Nishinakamura et al., 1999). Un phénotype similaire a été observé lors de l'injection du morpholino ciblant *Xdscr6* (Li et al., 2013).

Lors de mon arrivée, des résultats préliminaires de GST-Pull Down suggéraient une interaction biochimique entre XSTAT3 et XDSCR6.

Compte tenu de toutes ces observations, DSCR6 pourrait donc être un modulateur transcriptionnel situé à l'interface entre des modificateurs chromatinien comme EZH2 et des facteurs de transcription comme STAT3, deux des acteurs majeurs au cours du développement embryonnaire. Ainsi, mon projet de thèse a consisté à étudier les interactions biochimiques et fonctionnelles entre XDSCR6 et ses partenaires au cours de la mise en place des axes embryonnaires de l'amphibien *Xenopus laevis*.

### **Objectif n°1 : Confirmer l'interaction physique entre XDSCR6 et XSTAT3 au cours du développement embryonnaire de l'amphibien**

Comme décrit ci-dessus, STAT3 et DSCR6 sont impliquées dans les événements précoces de mise en place des axes embryonnaires chez l'amphibien. De plus, des données préliminaires de l'équipe suggéraient que XDSCR6 pourrait interagir avec XSTAT3. Mon premier objectif était donc de confirmer si ces deux protéines pouvaient former un complexe chez l'amphibien, surtout au cours des étapes clés de la mise en place des axes embryonnaires. J'ai également cartographié le domaine de XSTAT3 qui permet l'interaction avec XDSCR6.

### **Objectif n°2 : Etude des interactions fonctionnelles entre XSTAT3 et XDSCR6**

Les données de la littérature montrent que la protéine XSTAT3 est présente dès l'ovogenèse et pendant tout le développement embryonnaire précoce chez le xénope (Nishinakamura et al., 1999). Il a également été montré que l'ARNm *XStat3* est enrichi au niveau de la calotte animale (Flachsova et al., 2013). Cependant, jusqu'à présent, le profil détaillé de la protéine XSTAT3 et de sa forme activée (XSTAT3-Y705) a été peu étudié chez l'amphibien.

Dans un premier temps, j'ai étudié le profil d'expression spatio-temporel endogène de XSTAT3 et de sa forme phosphorylée sur la tyrosine 705 (XSTAT3-Y705) à différents temps du développement embryonnaire. J'ai également analysé l'activité transcriptionnelle endogène de XSTAT3. L'ensemble des résultats obtenus m'a permis de détailler l'activité de XSTAT3 au cours du développement embryonnaire précoce.

Des résultats publiés par d'autres équipes ont montré que la surexpression d'une forme activée du récepteur activateur gp130, conduit à la formation d'embryons avec des défauts antérieurs. A l'inverse, la surexpression ventrale de Stat3-EnR, induit la formation d'un axe embryonnaire surnuméraire (Nishinakamura et al., 1999).

Afin de clarifier l'implication de STAT3 au cours du développement précoce chez l'amphibien, j'ai voulu d'abord étudier les conséquences phénotypiques et moléculaires de l'activation spécifique de XSTAT3 dans l'embryon. Pour cela, j'ai utilisé une forme constitutivement active de STAT3, XStat3C, qui mime la dimérisation, la phosphorylation sur les résidus Y705 et S727 et, par conséquent, l'activation de XSTAT3. Ensuite, j'ai co-exprimé cette construction de Xstat3C avec l'ARNm codant pour *Xdscr6* afin de déterminer si XDSCR6 et XSTAT3 pouvaient avoir des activités antagonistes ou synergiques au cours de la mise en place des axes embryonnaires.

Par la suite je me suis intéressée à étudier l'influence de XDSCR6 sur activité XSTAT3, afin de vérifier si XDSCR6 serait capable éventuellement de moduler cette activité, et si oui, quels étaient les mécanismes moléculaires mis en jeu. Les résultats obtenus dans cette partie ont permis de montrer un mécanisme innovateur dans lequel XDSCR6 régulerait négativement l'activité de XSTAT3 en interférant avec sa méthylation sur les résidus lysines.

### **Objectif n°3 : Etude de la contribution de la méthyltransférase XEZH2 dans le mécanisme de régulation de XDSCR6 sur l'activité de XSTAT3**

Comme j'ai décrit précédemment, il a été montré, dans plusieurs lignées cellulaires humaines, que STAT3 peut être méthylée par EZH2. Compte tenu de ces données, j'ai cherché à établir si l'action de DSCR6 sur la méthylation de STAT3 requiert l'activité d'EZH2. Dans un premier temps, j'ai étudié la contribution de cette méthyltransférase dans la mise en place des axes embryonnaires. Ensuite, j'ai étudié les éventuelles interactions physiques et fonctionnelles entre STAT3 et EZH2, afin de vérifier si EZH2 peut également moduler méthylation de STAT3 dans l'embryon de xénope.

L'ensemble de mes résultats a permis de montrer que XDSCR6 joue un rôle de modulateur négatif de l'activité du facteur de transcription XStat3 et le modificateur chromatinien XEzh2 au cours du développement embryonnaire. Nous avons ainsi caractérisé les régulations de XDSCR6 et XEZH2 sur l'activité de XSTAT3 lors de la mise en place des axes embryonnaires de *Xenopus laevis*.

# Résultats

Au cours de mon doctorat je me suis intéressée à étudier la fonction de XDSCR6 et de ses partenaires pendant le développement embryonnaire précoce de l'amphibien *Xenopus laevis*. Dans cette partie, je ferai un résumé des résultats obtenus. Ils seront détaillés dans l'article en préparation qui sera soumis très prochainement.

## 1. Présentation des résultats

### **Le rôle de XDSCR6 et de ses partenaires au cours du développement embryonnaire précoce de l'amphibien *Xenopus laevis***

L'étude des différents stades du développement et en particulier la formation des principaux feuilletts (ectoderme, mésoderme, endoderme) et axes (antéro-postérieur et dorso-ventral) est fondamentale pour comprendre comment un nouvel individu se forme à partir d'une seule cellule. La formation d'un embryon demande un contrôle génétique strict et bien précis de plusieurs voies de signalisation. La régulation anormale des gènes impliqués dans ces processus peut conduire à des malformations embryonnaires. Ainsi, l'étude des mécanismes de régulation géniques peut apporter des renseignements précieux pour comprendre le développement embryonnaire.

Mon équipe a décrit la fonction du XDSCR6 et de certains de ses partenaires au cours du développement embryonnaire précoce. Des données préliminaires suggéraient une éventuelle interaction entre XDSCR6 et XSTAT3. Mon projet de thèse a consisté à étudier les interactions physiques et fonctionnelles entre ces deux protéines au cours du développement embryonnaire précoce de l'amphibien.

Tout d'abord j'ai commencé par confirmer l'interaction entre XDSCR6 et XSTAT3. Mes résultats obtenus ont permis de montrer que ces deux protéines endogènes interagissent *in vivo* au cours des étapes clés de la mise en place des axes, surtout au pendant la gastrulation. De plus, j'ai également montré que XDSCR6 et XSTAT3 interagissent directement *in vitro*. En outre, mes études biochimiques ont permis de cartographier le domaine de XSTAT3 qui permet l'interaction avec XDSCR6, il s'agit de la

partie carboxy-terminale contenant le domaine SH2 et le domaine de transactivation. Ainsi, ces résultats montrent que XDSCR6 interagit physiquement avec XSTAT3.

Ensuite je me suis intéressée à étudier les interactions fonctionnelles entre ces deux protéines. J'ai d'abord commencé par caractériser les conséquences phénotypiques et moléculaires de l'activation spécifique de XSTAT3 dans l'embryon. Pour cela, j'ai surexprimé une forme mutante constitutivement active de XSTAT3, XSTAT3C, soit dans région ventrale soit dans la région dorsale de l'embryon. Dans la région ventrale, cette surexpression n'a aucun effet sur le destin des feuillets embryonnaires, tous les embryons se sont développés normalement. En revanche, la surexpression de XSTAT3C, dans la région dorsale de l'embryon, induit des malformations antérieures caractérisées par une diminution de la taille de la tête et/ou une absence partielle de l'œil et de la glande adhésive, l'élément le plus antéro-dorsal chez l'embryon. Ces résultats ont permis de montrer que l'activation de XSTAT3 affecte la mise en place des axes embryonnaires. Par la suite j'ai co-exprimé cette forme activée *Xtat3c* avec l'ARNm codant pour *Xdscr6*, afin d'identifier s'il existait des interactions fonctionnelles entre ces deux protéines. La co-injection de ces deux ARNm dans la région ventrale a permis de restaurer partiellement les doubles axes induits par XDSCR6. De plus, la co-injection de ces ARNm dans la région dorsale a également restauré partiellement les défauts antérieurs induits par l'activation de XSTAT3. L'ensemble de ces analyses phénotypiques montre que XDSCR6 et XSTAT3 présentent des propriétés antagonistes : XDSCR6 est impliquée dans la dorsalisation des tissus embryonnaires, alors que l'activité de XSTAT3 est associée à leur ventralisation. Il existe donc un antagonisme fonctionnel *in vivo* entre XDSCR6 et XSTAT3.

Par la suite, j'ai décrit l'activité de XSTAT3 au cours des étapes précoces du développement embryonnaire. J'ai montré que cette protéine est présente de manière constante tout le long du développement, depuis le début de la segmentation jusqu'à l'organogenèse. De plus, cette protéine commence à être activée (Y705) et transcriptionnellement active essentiellement au cours de la gastrulation. J'ai également montré que XSTAT3-Y705 est localisée dans les noyaux des trois feuillets embryonnaires pendant cette fenêtre de temps. Mes résultats suggèrent donc que XSTAT3 serait essentiellement active pendant la période où les principaux feuillets mésodermique et neural se mettent en place et se régionalisent selon l'axe dorso-ventral.

Compte tenu du fait que STAT3 soit un facteur de transcription et que XDSCR6 soit un potentiel antagoniste de XSTAT3, j'ai voulu comprendre si XDSCR6 pouvait réguler

l'activité de XSTAT3. La surexpression de *Xdscr6* conduit à la diminution de l'activité transcriptionnelle endogène de XSTAT3, ce qui suggère que XDSCR6 serait un inhibiteur de ce facteur de transcription.

L'activité de STAT3 repose grandement sur ses modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation et la méthylation. A l'heure actuelle, rien n'est connu sur la méthylation de STAT3 chez le xénope. Pour la première fois, j'ai montré que cette protéine peut être méthylée sur les résidus lysine au cours de la gastrulation. De plus, la surexpression de XDSCR6 ne change ni la localisation subcellulaire, ni la cinétique d'expression de XSTAT3-Y705. En revanche, le taux de méthylation de XSTAT3 sur les résidus lysine est fortement diminué. Ces résultats suggèrent que XDSCR6 inhiberait l'activité de XSTAT3 en interférant avec sa méthylation.

Il a été montré que STAT3 peut être méthylée sur des résidus lysine par 2 méthyltransférases soit par EZH2 sur la lysine 49 (K49) (Dasgupta et al., 2015) soit par SET9 sur la lysine 140 (K140) (Yang et al., 2010). Mon objectif était de comprendre si la modulation de la méthylation de STAT3 était impliquée dans la mise en place des axes. Pour cela, j'ai injecté dans l'embryon 2 formes mutantes non méthylables de STAT3. J'ai montré que la surexpression de *Stat3-K49R* diminue l'activité transcriptionnelle endogène de XSTAT3 et induit la formation d'un axe surnuméraire si injecté dans la région ventrale, ce qui mime la surexpression de XDSCR6. En revanche, la surexpression de STAT3-K140R n'a aucun effet dans la région ventrale, mais induit des défauts antérieurs si elle est surexprimée en dorsal. Ce phénotype est similaire à celui obtenu lors de l'activation de XSTAT3. L'ensemble de ces résultats montre que la modulation de la méthylation est impliquée dans la mise en place des axes embryonnaires et que la mutation du résidu lysine 49 (méthylé par EZH2) conduit à la formation d'embryons dorsalisés.

Compte tenu de ce résultat, j'ai cherché à établir si l'action de XDSCR6 sur la méthylation de STAT3 requiert l'activité d'EZH2. J'ai d'abord commencé par étudier le rôle de cette méthyltransférase dans la mise en place des axes. J'ai montré que la surexpression d'une forme mutante d'EZH2 déficiente pour son activité méthyltransférase (EZH2-H694L) aboutit à une diminution de l'activité transcriptionnelle et du taux de méthylation de XSTAT3 et à la formation d'un deuxième axe dans la région ventrale. De plus, ce phénotype est partiellement restauré lorsque l'ARNm codant pour cette forme mutante est co-injecté avec celui codant pour la forme constitutivement active XStat3C. Ces résultats suggèrent que l'activité méthyltransférase de XEZH2 serait nécessaire à la méthylation de STAT3 et à son activité transcriptionnelle dans l'embryon.

Un mécanisme similaire a également été décrit dans les cellules souches cancéreuses humaines. De plus, dans ces cellules, l'action positive d'EZH2 sur STAT3 requiert la phosphorylation spécifique d'EZH2 sur le résidu sérine 21, un résidu conservé chez les vertébrés. Lorsque ce résidu sérine est muté, l'interaction entre STAT3 et EZH2 est perdue et l'activité transcriptionnelle et la méthylation de STAT3 sont diminuées (Kim et al., 2013). Dans un premier temps, j'ai établi la cinétique de phosphorylation de XEZH2 sur S21 chez l'amphibien et j'ai montré que cette protéine devient phosphorylée sur ce résidu dans les trois feuilletts embryonnaires à la fin de la segmentation et au cours de la gastrulation, ce qui correspond à la cinétique d'activation de XSTAT3.

Deux formes mutantes de la sérine 21 dans EZH2 ont déjà été générées et étudiées : EZH2-S21A et EZH2-S21D, permettant d'exprimer soit une forme non phosphorylable, soit une forme mimant une phosphorylation constitutive, respectivement (Cha et al., 2005). Dans les cellules souches humaines de glioblastome, l'expression d'EZH2-S21A diminue la méthylation de STAT3, alors que EZH2-S21D l'augmente (Kim et al., 2013). Dans les embryons de xénope, j'ai montré que la surexpression de EZH2-S21A diminue l'activité transcriptionnelle de XSTAT3 et induit la formation d'un axe surnuméraire, ce qui mime la surexpression de XDSCR6 ou la perte de fonction de XSTAT3 sur le résidu K49. En revanche, la surexpression de EZH2-S21D dans la région dorsale de l'embryon induit des défauts antérieurs dans l'embryon. Ce phénotype est similaire à celui observé lors de l'activation de XSTAT3. L'ensemble de ces résultats suggère que la méthyltransférase de XEZH2 module l'activité de XSTAT3 dans la formation des axes embryonnaires.

Mes travaux ont permis de caractériser les interactions fonctionnelles et moléculaires établies entre XDSCR6, XSTAT3 et XEZH2 lors de la mise en place des axes embryonnaires chez l'amphibien.

## 2. Publication en cours

**The *Xenopus* homologue of Down syndrome critical region protein 6 (XDSCR6) negatively regulates XSTAT3 transcriptional activity by interfering with its lysine-methylation during embryonic patterning.**

Mafalda Loreti<sup>1</sup>, De-Li Shi<sup>1\*</sup> and Clémence Carron<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Biologie du développement, Institut de Biologie Paris Seine (LBD-IBPS), 75005 Paris, France.

\*Authors for correspondence

Tel: 33 1 44 27 27 72

Fax: 33 1 44 27 34 45

Email: [clemence.carron\\_homo@upmc.fr](mailto:clemence.carron_homo@upmc.fr); [de-li.shi@upmc.fr](mailto:de-li.shi@upmc.fr)

## Summary

The embryonic axis and primordial germ layers formation are complex inductive processes demanding the tight integration of several signaling pathways, transcription factors activity and epigenetic marks deposition. Here we demonstrate that XDSCR6, a mesoderm and embryonic axis inducer, interacts directly with the transcription factor XSTAT3 *in vitro* and *in vivo* and regulates negatively its transcriptional activity. XSTAT3 is expressed at constant level during all stages of development and is mainly activated during gastrulation. XSTAT3 constitutive activation in the dorsal region of the embryos leads to tissues ventralization. Moreover, XSTAT3 and XDSCR6 exhibit antagonistic activities regarding embryonic axis formation *in vivo*. We further show that XDSCR6 interferes with lysine-methylation of XSTAT3 leading to the down-regulation of its transcriptional activity. The subtle lysine-methylation status of XSTAT3 is crucial to its ventralizing properties. Furthermore, we show that XSTAT3 interacts with XEZH2 *in vivo* and that optimal XSTAT3 transcriptional activity required EZH2 lysine-methyltransferase activity. In a previous study, we have demonstrated that XDSCR6 interacts with XEZH2 and negatively modulates its epigenetic repressive functions on dorsal mesoderm genes. Based on this study and our previous observations, we propose that XDSCR6, during embryonic development, functions as a multifunctional regulator localized at the interface between transcription factor and epigenetic regulator.

## Introduction

The formation of embryonic axes is a complex inductive process mediated by several maternal and zygotic signals like Wnt, TGF $\beta$ , BMP or FGF signaling. Antero-posterior and dorso-ventral patterning of mesoderm and ectoderm during gastrulation is largely mediated by factors secreted by the Spemann's organizer who are mainly antagonists for BMP and Wnt signals (De Robertis et al., 2000; De Robertis and Kuroda, 2004; Niehrs, 2004). More recently, other mechanisms have been implicating the role of transcriptional repression and derepression during specification of embryonic axes. The forkhead-related transcription factor FoxD3, associated with TLE/Groucho transcriptional corepressor, functions as a transcriptional repressor to maintain the expression of Nodal-related genes and thus induce dorsal mesoderm formation (Yaklichkin et al., 2007). Moreover, several evidences have pointed out that correct deposition of epigenetic marks is also critical for germ layer induction and embryonic patterning (Akkers et al., 2009; Schneider et al., 2011; Li et al., 2013). Altogether, these findings highlight the need of a correct integration of signaling pathways, transcriptional activity and epigenetic regulation within the embryo in order to obtain a harmonious axis patterning (Carron and Shi, 2016).

The Signal transducers and activators of transcription (STAT) family of proteins are major players during cell differentiation and embryonic development (Ihle et al., 2001, Stark et al., 2017). Amongst STAT family, STAT3 activity is crucial during early mouse embryonic development to maintain cells in a pluripotent state (Niwa et al. 1998; Burdon et al. 2002, Do et al., 2013). In *Xenopus*, XSTAT3 activity is implicated in mesoderm induction and axis specification (Nishinakamura et al., 1999; Ohkawara et al. 2004). Activation of XSTAT3 in dorsal region of *Xenopus* embryo leads to ventralization of dorsal structures while ventral overexpression of a dominant-negative form, XSTAT3-EnR, induces axis duplication (Nishinakamura et al., 1999). Moreover, STAT3 is activated inappropriately in a wide range of human cancers (Carpenter et al., 2014). The transcriptional activity of STAT proteins is tightly regulated by several post-translational modifications. STAT proteins are normally inactive within the cytoplasm and become activated by tyrosine phosphorylation upon cytokines and growth factors signals. STATs dimerization through reciprocal SH2-phospho-tyrosine interactions leads to their accumulation into the nucleus where they activate their target genes. Several studies showed that STAT3

activity is also regulated by several post-translational modifications on lysine residues like acetylation, poly- or mono-ubiquitination (Yuan et al., 2005; Dasgupta et al., 2014; Ray et al., 2014). More recently, STAT3 lysine methylation has been shown to play also a crucial role for regulating its transcriptional activity. These modifications are essentially mediated by two methyltransferases, SET9 (SET domain containing lysine methyltransferase 9) and EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) (Yang et al., 2010; Kim et al., 2013; Dasgupta et al., 2015).

EZH2 methyltransferase is a member of polycomb group protein (PcG) which participates to the transcriptional repression mediated by the PCR2 complex. In this context, the EZH2 methyltransferase activity targets lysine residues on the N-terminal tail of Histone 3 generating the repressive epigenetic mark H3K27me3. EZH2 function is involved in several biological processes including differentiation, maintaining cell identity, proliferation and stem-cell plasticity (Margueron et al., 2011). Numerous studies show that EZH2 also plays a critical role in cancer initiation, progression and metastasis, as well as in cancer stem cell biology (Völkel et al., 2015). Until recently, the reported roles of EZH2 have been essentially attributed to its ability to drive transcriptional repression via the H3K27me3 deposition. However, in mammal cells, several emerging evidences showed that EZH2 directly interacts with, methylates and regulates several transcription factors including GATA4 (He et al. 2012), RORa (Lee et al., 2012; Xu et al., 2012) and STAT3 (Stark et al. 2011; Yang et al., 2010; Kim et al., 2013; Dasgupta et al., 2014; Dasgupta et al., 2015).

In a previous study, we have shown that XDSCR6 is an atypical mesoderm and embryonic axis inducer. The ability of XDSCR6 to induce a secondary axis when expressed ventrally was attributed to its dorsal mesoderm-inducing and dorsalizing activity during gastrulation. Indeed, ventral overexpression of XDSCR6 is able to dorsalize ventral mesoderm through ectopic induction of dorsoanterior genes and down-regulation of ventral genes including *Wnt8* and *Xvent1*. Moreover, XDSCR6 can induce the expression of several *Xnr* genes, independently of nodal signaling and Wnt/b-catenin signaling. We have shown that XDSCR6 triggers the formation of mesoderm and embryonic axis through derepression of polycomb group (PcG) proteins. XDSCR6 disrupts the formation of PcG bodies and releases PcG proteins, like XEZH2, from chromatin allowing dorsal mesoderm gene transcription (Li et al., 2013).

Here, we report that XDSCR6 and XSTAT3 physically interact and exert antagonistic activities regarding axis formation in *Xenopus* embryos. We show that during

development, XSTAT3 is expressed at constant level but is transcriptionally active essentially during gastrulation. Ectopic activation of XSTAT3 in dorsal region of embryos leads to strong anterior defects suggesting that XSTAT3 exhibits ventralization properties during early development. We also show that, like in mammal cells, XSTAT3 interacts with and is methylated by XEZH2 on lysine residues *in vivo*. XDSCR6 overexpression strongly decreases XSTAT3 endogenous transcriptional activity by interfering with its methylation on lysine residues. Furthermore, we demonstrate that negative regulation of XSTAT3 lysine-methylation in ventral part of the embryos leads to axis duplication. Our results highlight a new mechanism of XSTAT3 transcriptional regulation by XDSCR6 and EZH2 in *Xenopus* embryo. Moreover, we propose that XDSCR6, during gastrulation, could act as a multifunctional transcriptional regulator localized at the interface between transcription factor and epigenetic regulator.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Embryos manipulations**

Adults *Xenopus laevis* females were injected with 600 IU of human chorionic gonadotropin (Sigma) hormone and oocytes were artificially fertilized. Eggs were dejellied with 2% cystein hydrochloride (pH 7.8) and embryos were staged according to Nieuwkoop and Faber (Nieuwkoop and Faber, 1967).

### **Plasmid constructs**

*Myc-Xdscr6*, *myc-Xdscr6m*, *myc-XEzh2* and *myc-Ezh2-H694L* were described previously (Li et al., 2013; Barnet et al., 2005; Hernandez-Munoz et al., 2005). *Myc-Xstat3-C* was a generous gift from Pr. Shibuya (Ohkawara et al., 2004). The *myc-XSTAT3-DC*, cloned in pCS2, corresponds to a deletion carboxy-terminal deletion of the last 352 amino acids. The *myc-STAT3-DM* is deleted from amino acid 419 to 770 due to a *Not1/Stu1* digestion and was cloned in pCS2 vector. *Flag-Stat3-K49R* and *flag-Stat3-K140R* (Addgene) were cloned after a *Xho1/Sal1* digestion and insertion into the dephosphorylated *Xho1* site in the pCS2+ vector. *Myc-Ezh2-S21A* and *Myc-Ezh2-S21D* (Cha et al., 2005) were a generous gift from Pr. Hung and were cloned into the *BamH1/Xho1* sites in pCS2+ vector. Capped mRNAs were synthesized by *in vitro* transcription using appropriate RNA polymerases as previously described (Djiane et al., 2000).

### **GST pull-down, co-immunoprecipitation and western blot analysis**

GST-EZH2 and GST-XDSCR6 were described previously (Li et al., 2013). Synthetic mRNAs encoding epitope-tagged proteins (1.1 ng) were injected into xenopus embryos and lysates were incubated with glutathione-agarose-bound GST fusion proteins overnight at 4°C. Bound proteins were subjected to western blot analysis. The experiment was also performed with *in vitro* translated proteins using the TNT Coupled Reticulocyte Lysate

System (Promega). Co-immunoprecipitation was performed from embryonic extracts as previously described (Carron et al., 2003). The rabbit polyclonal antibody against XDSCR6 was generated by Eurogentec against the DNQSHMNDKKGKPPSF peptide and the antibody specificity was evaluated by ELISA by the manufacturer and western blot analysis (Fig. S1). For western blot analysis, the antibodies were used at the following dilutions: rabbit anti-STAT3 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-STAT3-Y705 (1:2000 Cell Signaling); rabbit anti-EZH2 (1:750 abcam); mouse anti-myc (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). After incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies anti-rabbit (1:10000; Jackson ImmunoResearch Laboratories) or anti-mouse (1:10000; Beckman Coulter), bands were visualized using the Western Lighting Plus-ECL (PerkinElmer Inc.).

## Immunostaining experiments

For paraffin embedding, embryos were collected from stage 7 until stage 11 and fixed in paraformaldehyde 4% overnight at 4°C. Sectioned samples (10 µm) were dehydrated with successive xylene and ethanol baths, unmasked by heating in citrate 10 mM solution and permeabilized with methanol at -20°C for 10 minutes. After 1h of incubation in blocking buffer (0.3% Triton X-100 in 2.5% normal goat serum (Vector)), embryos were incubated overnight with rabbit anti-STAT3-Y705 (1:50; Cell Signaling), rabbit anti-STAT3 (1:100; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-EZH2 (1:250; Abcam), rabbit anti-EZH2-S21 (1:100; Bethyle Laboratories Inc.), rabbit anti-Xdscr6 (1:50; Eurogentec) or mouse anti-myc (1:100; Santa Cruz Biotechnology). CY3 anti-rabbit (1:600; Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:300; Interchim), Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG (1:300; Interchim) were used as secondary antibody. Finally, nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 1.5 mg/ml) for 8 minutes, the samples were washed in PBS, mounted in Mowiol. Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope and quantification was performed using ImageJ software. The corrected cellular fluorescence (TCCF) was obtained as described in Rachael et al. 2013 and statistical analysis were done using GraphPad Prism 6.

## Luciferase assay

The pTATA-TK-Luc-4xM67 luciferase reporter plasmid DNA (Besser et al., 1999) was injected at 150 pg, combined with 20 pg pRL-TK vector (Promega), with synthetic mRNAs in the animal pole region at the 2-cell stage. The Luciferase and Renilla activities were measured at indicated stages of development on five embryos using the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) as already described (Cao et al., 2012). All the experiments were carried out in duplicates using different batches of embryos and the data were analyzed using Student's-t-test.

## **Results**

### **XDSCR6 and XSTAT3 exhibit antagonistic effects *in vivo***

Previous studies showed that dorsal activation of Stat3-mediated cytokine signaling results in a ventralization of *Xenopus* embryos while the injection of a dominant negative form of Xstat3 (Xstat3-EnR) generates an ectopic axis when injected into ventral blastomeres at 4-cell stage (Nishinakamura et al., 1999). In order to confirm the consequences of a specific STAT3 activation during early development and test if XDSCR6 could regulate XSTA3 activity, mRNA encoding a point-mutated version of XSTAT3, *Xtat3C*, mimicking a constitutive activation of STAT3 (Bromberg et al., 1999), was injected into the two dorsal blastomeres at 4-cell stage. At tadpoles stage, 46% of the injected embryos exhibit several anterior defects characterized by several features ranging from small head (23% of the cases), the absence of eye (10% of the cases) or a total absence of head structures (8% of the cases) confirming that STAT3 activation ventralizes the dorsal structures (Fig. 1A and 1B). Co-injection of *Xdscr6* (0.1ng) with *Xtat3C* (1ng) results in a strong decrease in the proportion of ventralized embryos suggesting that XDSCR6 dorsal overexpression can partially restore the anterior defects induced by XSTAT3 activation (Fig. 1A, B). Conversely, ventral injection of *Xdscr6* mRNA (0.1ng) induced secondary axis in 68% of injected embryos whereas ventral co-injection of *Xdscr6* mRNA (0.1ng) with *Xtat3C* mRNA (1ng) reduces the percentage of double axis to 29% (Fig. 1C,D). Thus, altogether, these results suggest that activation of XSTAT3 leads to anterior defects and that XDSCR6 and XSTAT3 have antagonistic activities *in vivo*.

### **XDSCR6 physically interacts with XSTAT3 *in vitro* and *in vivo***

In order to explain the antagonistic properties observed between XDSCR6 and XSTAT3, we tested if these two proteins were able to physically interact. First, GST pull-down experiments were carried out. *Xenopus* embryos were injected at 2-cell stage with synthetic mRNA encoding the full size myc-XSTAT3-WT and embryonic extracts were prepared at the late gastrula stage. The result indicated that myc-XSTAT3-WT specifically bound to GST-XDSCR6 (Fig. 2B). GST pull-down carried in the same conditions using deleted forms of XSTAT3, Myc-XSTAT3-DC or Myc-STAT3-DM showed that XSTAT3 carboxy-terminus domain is necessary and sufficient to sustain the interaction with GST-XDSCR6

(Fig. 2A,B). Moreover, GST pull-down using *in vitro* translated proteins further demonstrated a direct interaction between GST-XDSCR6 and myc-XSTAT3-WT (Fig. 2C). More importantly, we performed co-immunoprecipitation from embryonic extracts obtained from embryos at 11.5 stage using specific antibodies against XDSCR6 and STAT3 and showed that endogenous proteins interact together (Fig. 2D; Fig. S1). Altogether, these results strongly suggest that a physical interaction occurs *in vivo* between XDSCR6 and XSTAT3 during *Xenopus* early development.

## **XSTAT3 is mainly activated during gastrulation**

Few data regarding XSTAT3 regulation and function during early *Xenopus* development are currently available. Thus, we first performed a spatio-temporal analysis of XSTAT3 endogenous expression and activation by analyzing its phosphorylation on tyrosine 705 (Y705). Western blot analysis of embryonic extracts showed that XSTAT3 is expressed at constant level from fertilization to organogenesis. However, XSTAT3 becomes phosphorylated on Y705 only at the end of stage 8 and stays strongly phosphorylated essentially during gastrulation (Fig. 3A). Immunodetection experiments performed on embryo sections revealed that endogenous XSTAT3 is detected in the cytoplasm and the nucleus of animal cells at stage 7 and then detected in all three germ layers from stage 9 and during all gastrulation (Fig. 3B; Fig. S2). The activated form STAT3-Y705 is only detected in the nuclei of cells in the three germs layers after the mid-blastula transition and during gastrulation (Fig. 3B; Fig. S2). We then studied the endogenous STAT3 transcriptional activity. Two cell-stage embryos were injected with 150pg of reporter vector pTATA-TK-Luc-4xM67 containing Stat-binding sites (Besser et al. 1999). Injected and control embryos were lysed at different stages and embryonic extracts were submitted to luciferase assay. Our results showed that endogenous XSTAT3 transcriptional activity is first detected at stage 9 and during gastrulation (Fig. 3C). Taken together, these results showed that XSTAT3 is expressed and transcriptionally active mainly during a specific time window corresponding to gastrulation.

## **XDSCR6 negatively regulates XSTAT3 transcriptional activity and lysine-methylation**

Since we have shown that XDSCR6 and XSTAT3 physically and functionally interact, we then tested if XDSCR6 could modulate XSTAT3 transcriptional activity *in vivo*. To do so, embryos were injected 150pg of reporter vector pTATA-TK-Luc-4xM67 or co-injected pTATA-TK-Luc-4xM67 with either the wild type *Xdscr6* mRNA (500pg) or the loss of function mutant *xdscr6m* mRNA (500pg) (Li et al., 2013). Embryos were cultured until stage 10.5, lysed and submitted to luciferase assay. XDSCR6 expression strongly decreases XSTAT3 endogenous activity whereas XDSCR6m does not (Fig. 4A). This decrease of XSTAT3 activity is not correlated with a change regarding XSTAT3 expression, phosphorylation on Y705 or to an abnormal sub-cellular localization of XSTAT3-Y705 (Fig. 4B,D). We then tested if XSTAT3 could be methylated on lysine residues during development and if so, the consequence of XDSCR6 overexpression. Embryos at stage 11.5 were submitted to an immunoprecipitation with an antibody specific of Pan-methylated lysine followed by a western blot analysis with an anti-STAT3 antibody. Our results clearly show that XSTAT3 is indeed methylated on lysine residues during gastrulation. Moreover, XDSCR6 expression strongly reduces this methylation (Fig. 4E,F). Thus, our observations suggest that XDSCR6 could negatively modulate endogenous XSTAT3 activity by interfering with its methylation on lysine residues.

To support the fact that regulation of STAT3 lysine-methylation is indeed implicated in embryonic axis formation, we analyzed the consequence of the overexpression of a point-mutated form of STAT3, STAT3K49R. In this mutant, the specific methylation on lysine 49, normally mediated by EZH2 methyltransferase, does not occur resulting in a loss of function of STAT3 transcriptional activity (Dasgupta et al., 2015). Embryos at 4-cell stage were injected in the ventro-vegetal region with 1ng of *Stat3-k49r* mRNA. At tadpole stage, 42% of injected embryos exhibit a double axis formation (Fig. 4G,H). The embryos formed a secondary axis with essentially trunk and posterior region, a phenotype reminiscent of the XDSCR6-induced axis. This phenotype is also correlated with the decrease of XSTAT3 endogenous transcriptional activity (Fig. 4J). STAT3-K49R did not induce any embryonic defect when overexpressed dorsally (Fig 4G,I). On the contrary, the dorsal expression of another lysine-mutated form of STAT3, STAT3-K140R, resulting in a gain of function of STAT3 transcriptional activity (Yang et al., 2010), induces strong anterior defects comparable to the ones we obtained with STAT3C injection (Fig. 1; Fig. 4G,I). STAT3-K140R ventral expression leads to no particular phenotype (Fig. 4G).

Taken together, these results suggest that XDSCR6 negatively interferes with XSTAT3 transcriptional activity by modulating its methylation on lysine residues and that the subtle status of methylated lysine of STAT3 is crucial to a correct axis formation.

## **EZH2 methyltransferase activity is required for optimal XSTAT3 activity *in vivo***

Our data show that methylation of K49 in STAT3 is implicated in modulating XSTAT3 activity and trigger axis formation when expressed ventrally. Since K49 is a specific substrate of EZH2 methyltransferase, we tested if EZH2 could interact and methylate STAT3 in *Xenopus* embryos. First, embryos at 2-cell stage were injected with synthetic mRNA encoding myc-XSTAT3-WT or the two deleted forms XSTAT3-DC and STAT3-DM and embryonic extracts were prepared at the late gastrula stage for GST pull-down experiments. Our results indicated that myc-XSTAT3-WT specifically bound to GST-XEZH2 by its carboxy-terminus domain (Fig. S3A). GST-pull down using *in vitro* translated proteins further demonstrated a direct interaction between XSTAT3 and GST-XEZH2 (Fig. S3B). Moreover, we also showed by co-immunoprecipitation that XEZH2 and XSTAT3 interact *in vivo* (Fig. S3C). We then tested if the modulation of XEZH2 methyltransferase activity could be implicated in axis formation by injecting the synthetic mRNA *ezh2-h694l* encoding an enzymatic-defective form of EZH2 in the ventro-vegetal region of 4-cell stage embryos. Overexpression of EZH2-H694L results in axis duplication in 70% of the cases and this duplication is decreased to 37% by co-injection of *ezh2-h694h* with *stat3C* mRNA (Figure 5A, B). Moreover, loss of EZH2 enzymatic activity leads also to a decrease in STAT3 transcriptional activity and endogenous lysine-methylation (Fig 5 C-E).

It has been shown that phosphorylation of EZH2 by AKT on Serine 21 is a molecular switch that facilitates STAT3 specific methylation on lysine residues (Kim et al., 2013). In order to test if lysine-methylation of STAT3 during axis formation is indeed related this specific EZH2 methyltransferase activity, we first determine if EZH2 is expressed and phosphorylated on Serine 21 during *Xenopus* development. Immunodetection experiments performed on embryo sections at different stages showed that XEZH2 is detected as soon as stage 7 and that S21 phosphorylation become detectable from late blastula stage and during all gastrulation stage (Fig. 5 F). We then tested the consequence of the modulation of S21 phosphorylation on axis formation by expressing either the phosphomimetic constitutive active form of EZH2, EZH2S21D, or the non-phosphorylatable form EZH2S21A

(Cha et al., 2005). Four-cell stage embryos were injected dorsally or ventrally with 1ng of synthetic mRNA encoding EZH2S21D or EZH2S21A. Dorsal injection of *ezh2s21d* mRNA result in dorso-anterior defects while *ezh2s21a* mRNA-injected embryos exhibit no phenotype (Fig. 5G). On the contrary, ventral expression of EZH2S21A resulted in axis duplication in 80% of the cases while EZH2S21D had almost no effect (Fig. 5 H). Altogether these results suggest that XEZH2 is able to methylate XSTAT3 on lysine residue and modulate XSTAT3 transcriptional activity during *Xenopus* gastrulation.

## **Discussion**

This study reveals a novel mode of XSTAT3 regulation by XDSCR6 during early embryonic development. We show that XDSCR6, by interacting with XSTAT3, can negatively regulate its transcriptional activity by modulating its lysine methylation. Regulation of XSTAT3 methylation modulates its ventralizing properties. Our results suggest that, in *Xenopus* embryo, XDSCR6 could be a transcriptional regulator localized at the interface between epigenetic modulators and transcription factors.

### **XSTAT3 is mainly active during xenopus gastrulation and exhibits ventralization properties**

In this work, we showed that XSTAT3 is expressed at constant level during all stages of development, first exclusively in the ectodermic cap until stage 7 and later in all three germ layers. These results are consistent with the observations acquired from single cells analysis performed from 8-cells to 32-cells stage *Xenopus* embryos showing at first a specific animal regionalization of *Stat3* mRNA at these early stages (Flachsova et al., 2013). We observed that XSTAT3 is phosphorylated and transcriptionally active from late stage 8 and during all gastrulation. Moreover, our experiments showed that constitutive activation of XSTAT3 in the dorsal region of the embryos leads to strong anterior defects suggesting that XSTAT3 is indeed implicated in axis patterning during early stages of development. We also observed a re-activation of XSTAT3 later during development from late neurula stages and during organogenesis (Fig 3 and data not shown). This activation could be linked to other transcriptional functions of XSTAT3 during organogenesis. Indeed, it has been shown that XSTAT3 acts as an essential FGF-

transducing signal and promote the maintenance of neural crest cells in a proliferative and undifferentiated state during neurulation (Nichane et al., 2010).

## Implication of XDSCR6 in XSTAT3 regulation during axis specification

In a previous study, we have shown that XDSCR6 is an atypical mesoderm and embryonic axis inducer. XDSCR6 triggers the formation of dorsal mesoderm and embryonic axis through derepression of polycomb group (PcG) proteins. In that context, XDSCR6 disrupts the formation of PcG bodies, releases PcG proteins, like XEZH2, from chromatin and allows dorsal mesoderm gene transcription like *goosecoïd*. Moreover, XDSCR6 can also down-regulate ventral mesoderm genes expression including *Wnt8* and *Xvent1* at gastrula stage (Li et al., 2013).

In this present work, we show that XDSCR6 negatively regulates XSTAT3 transcriptional activity during gastrulation. Over-activation of XSTAT3 by expressing the constitutive form, STAT3C, in the dorsal region of the embryo results in strong anterior defects suggesting that ectopic activation of XSTAT3 could result in ventralization. These results are also in accordance with previous observations showing that activation of STAT3 by cytokine receptor gp130 ventralizes *Xenopus* embryos (Nishinakamura et al. 1999). This phenotype is rescued by XDSCR6 co-expression suggesting that the dorsalizing properties of XDSCR6 are able to counteract the ventralizing ones of XSTAT3 by interfering with XSTAT3 transcriptional properties. Conversely, ventral axis-induction triggered by XDSCR6 is impaired by XSTAT3 activation showing that XSTAT3 is also able to interfere with the dorsalizing properties of XDSCR6. Since it has been shown that dorsal XSTAT3 activation by overexpression of the gp130 receptor, leads to embryonic ventralization by upregulation of *Xvent1* and *Xvent2* expression at the expense of *goosecoïd* and *chordin* expression, we propose that XDSCR6 could interfere with the ventral patterning set up established by XSTAT3 leading to downregulation of ventral genes expression and activation of dorsal genes.

## **XDSCR6 negatively regulates XSTAT3 transcriptional activity by modulating its lysine methylation during embryonic development**

We have shown that XDSCR6 negatively regulates XSTAT3 transcriptional activity by interfering with its lysine methylation. Several evidences show that STAT3 lysine methylation plays a crucial role for the regulation of its transcriptional activity. Indeed, in human cells, depending on which lysine residue is targeted, methylation could either promote or inactivate STAT3 transcriptional activity (Yang et al., 2010; Kim et al., 2013; Dasgupta et al., 2014; Dasgupta et al., 2015). Here, we show that *in vivo*, during embryonic development, the subtle status of XSTAT3 methylation is also crucial and can either promote or inhibit its transcriptional properties leading to embryonic ventralization or dorsalization respectively. In human glioblastoma cells, EZH2 can directly bind and methylate STAT3 to sustain its transcriptional activity (Kim et al., 2013). Here we show that, during *Xenopus* early development, XEZH2 is indeed implicated in XSTAT3 lysine methylation and transcriptional regulation. Moreover, specific modulation of methyltransferase activity of EZH2 upon XSTAT3 has consequences on tissue patterning. Altogether our observations suggest a model in which during embryonic development, the epigenetic and transcriptional regulations could be integrated at the level of XDSCR6 and XEZH2 to modulate axis patterning (Figure 6).

## **XDSCR6, a regulator at the cross-road between epigenetic and transcriptional control?**

Our study shows that XDSCR6 physically and functionally interacts with XSTAT3. We have shown that the WRPW motif of XDSCR6 is required for the negative effect of XDSCR6 on XSTAT3 activity. Indeed, the loss of function mutant XDSCR6m, in which the motif WRPW is mutated into WRSG, even still able to interact with XSTAT3 (data not shown), cannot repress its transcriptional activity. On the contrary, it has been previously shown that the integrity of the WRPW motif is crucial for the physical interaction between XDSCR6 and XEZH2. Thus, we propose that XDSCR6 by interacting with XEZH2 and XSTAT3 could prevent the methylation of XSTAT3 by XEZH2 and thus leading to XSTAT3 transcriptional activity downregulation (Figure 6). How XDSCR6 could interfere with XEZH2 enzymatic activity is still unclear. By two-hybrid screen and GST-pull down experiments, we have

isolated JARID2, a crucial EZH2 regulator, as a XDSCR6 interactor (C.C, unpublished results). It could be possible that XDSCR6 by interacting with JARID2 modifies EZH2 methyltransferase activity and thus interfere with XSTAT3 methylation. This hypothesis has to be tested in a future study.

Taken together, our experiments suggest that during development, XDSCR6 could be a bifunctional negative regulator of XEZH2 acting both on its epigenetic and transcriptional functions. Our findings are quite interesting especially since EZH2 and STAT3 are overexpressed and/or overactivated in several cancers in humans (Stark et al., 2011; Völkel et al., 2015; Carpenter et al., 2014). The identification of a new negative regulator of both proteins could open several leads regarding anti-cancer therapeutics.

## **Acknowledgements**

We thank Drs H. Shibuya, MC Hung, M van Lohuizen for reagents; the imaging facility at IFR83 (University Pierre et Marie Curie) for help with confocal image acquisition; and Dr. J.F. Riou, E. Mouchel-Viehl for helpful discussion and technical advice.

## **Author contributions**

M.L., C.C. and D-L.S. designed and performed the experiments, analysed the results and wrote the manuscript.

## **Funding**

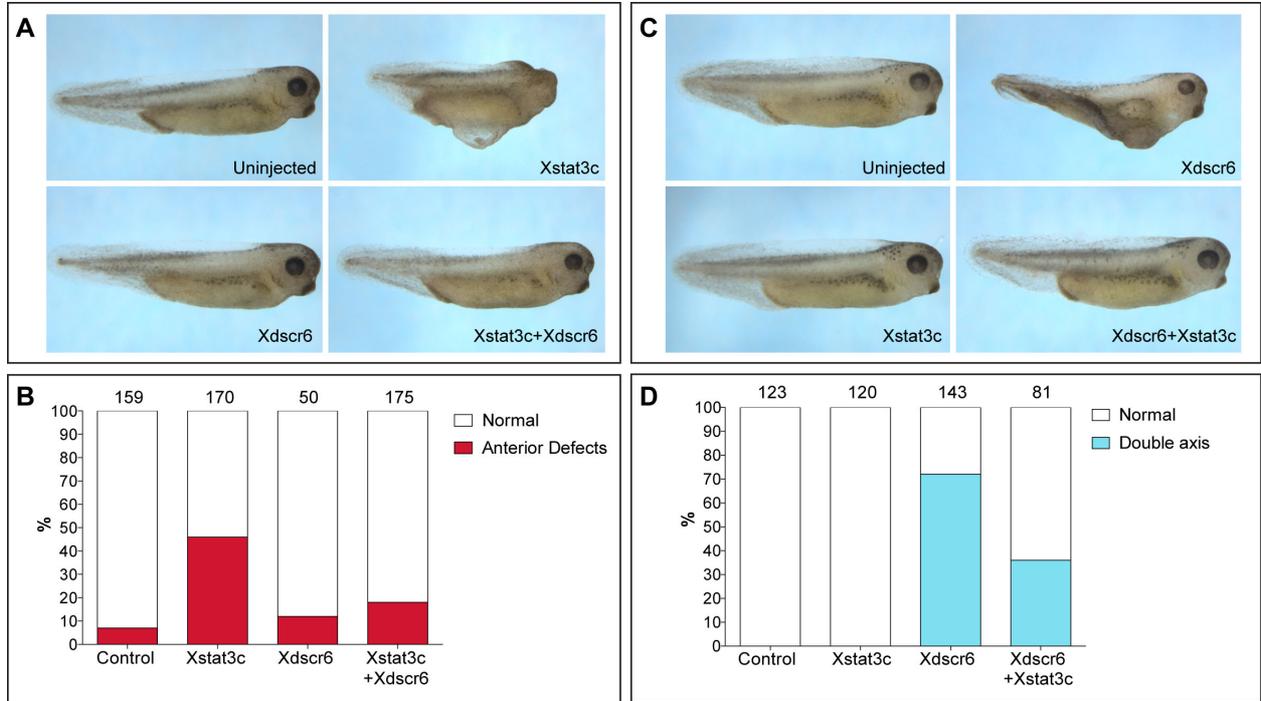
This work was supported by the French National Centre for Scientific Research (CNRS); the Université Pierre et Marie Curie and the Gefluc. M.L. was a recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## References

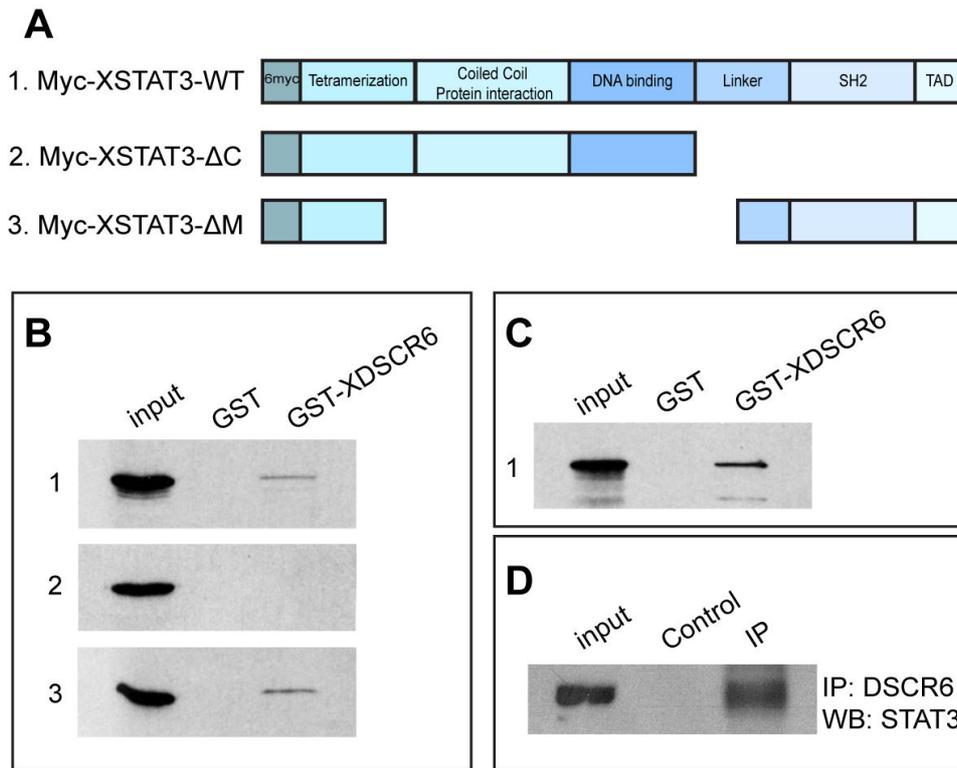
- Akkers, R.C., van Heeringen, S.J., Jacobi, U.G., Janssen-Megens, E.M., François, K.-J., Stunnenberg, H.G. and Veenstra, G.J.C.** (2009). A hierarchy of H3K4me3 and H3K27me3 acquisition in spatial gene regulation in xenopus embryos. *Dev. Cell* **17**, 425-434.
- Besser, D., Bromberg, J.F., Darnell, J.E. and Hanafusa, H.** (1999). A single amino acid substitution in the v-Eyk intracellular domain results in activation of Stat3 and enhances cellular transformation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1401-1409.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M., Devgan, G., Zhao, Y., Pestrell, R.G., Albanese, C. and Darnell, J.E.** (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* **98**, 295-303.
- Burdon, T., Smith, A. and Savatier, P.** (2002). Signaling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *TRENDS in Cell Biol.* **12**, 432-438.
- Carpenter, R.L. and Lo, H.W.** (2014). STAT3 target genes relevant to human cancers. *Cancers* **6**, 897-925.
- Carron, C. and Shi, D.L.** (2016). Specification of anteroposterior axis by combinatorial signaling during Xenopus development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **5**, 150-168.
- Cao, J. M., Li, S. Q., Zhang, H. W. and Shi, D. L.** (2012). High mobility group B proteins regulate mesoderm formation and dorsoventral patterning during zebrafish and Xenopus early development. *Mech. Dev.* **129**, 263-274.
- Dasgupta, M., Unal, H., Willard, B., Yang, J., Karnik, S.S. and Stark, G.R.** (2014). Critical role for lysine 685 in gene expression mediated by transcription factor unphosphorylated STAT3. *J. Biol. Chem.* **289**, 30763-30771.
- Dasgupta, M., Kam Tai Dermawan, J., Willard, B. and Stark, G.R.** (2015). STAT3-driven transcription depends upon the dimethylation of K49 by EZH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 3985-3990.
- De Robertis, E. M., Larrain, J., Oelgeschlager, M. and Wessely, O.** (2000). The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nat. Rev. Genet.* **1**, 171-181.
- 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.
- Djiane, A., Riou, J. F., Umbhauer, M., Boucaut, J. C. and Shi, D. L.** (2000). Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* **127**, 3091-3100.
- He, A., Shen, X., Ma, Q., Cao, J., von Gise, A., Zhou, P., Wang, G., Marquez, V.E., Orkin, S.H. and Pu, W.T.** (2012). PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. *Genes Dev.* **26**, 37-42.
- Hernández-Muñoz, I., Taghavi, P., Kuijl, C., Neefjes, J. and van Lohuizen, M.** (2005). Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1. *Mol. Cell Biol.* **25**, 11047-11058.
- Ihle, J.N.** (2001). The Stat family in cytokine signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **13**, 211-217.
- Kim, E., Kin, M., Woo, D-H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y.T., Kim, H., Rhee, J., Nakano, I., Lee, C., Joo, K.M., Rich, J.N., Nam, D-H. and Lee, J.** (2013). Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell* **23**, 839-852.
- Lee, S.T., Li, Z., Wu, Z., Aau, M., Guan, P., Murthy Karuturi, R.K., Liou, Y.C. and Yu, Q.** (2011). Context-specific regulation of NF-KB target gene expression by EZH2 in breast cancers. *Mol. Cell* **43**, 798-810.

- Li, H.Y., Grifone, R., Saquet, A., Carron, C. and Shi, D.L.** (2013). The *Xenopus* homologue of Down syndrome critical region protein 6 drives dorsoanterior gene expression and embryonic axis formation by antagonizing polycomb group proteins. *Development* **140**, 4903-4913.
- Margueron, R. and Reinberg, R.** (2011). The polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**, 343-349.
- Nichane, M., Ren, X. and Bellefroid, E.** (2010). Self-regulation of Stat3 activity coordinates cell cycle progression and neural crest specification. *EMBO J* **29**, 55-67.
- Niehrs, C.** (2004). Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer. *Nat. Rev. Genet.* **5** 425-434.
- Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Matsuda, T., Ariizumi, T., Heike, T., Asashima, M. and Yokota, T.** (1999). Activation of Stat3 by cytokine receptor gp130 ventralizes *Xenopus* embryos independent of BMP-4. *Dev. Biol.* **216**, 481-490.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. and Smith, A.** (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* **12**, 2048-2060.
- Ohkawara, B., Shirakabe, K., Hyodo-Miura, J., Matsuo, R., Ueno, N., Matsumoto, K. and Shibuya, H.** (2004). Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF- $\beta$ -mediated mesoderm induction. *Genes Dev* **18**, 381-386.
- Ray, S., Zhao, Y., Jamaluddin, M., Edeh, C.B., Lee, C. and Brasier, A.R.** (2014). Inducible STAT3 NH2 terminal mono-ubiquitination promotes BRD4 complex formation to regulate apoptosis. *Cell. Sign.* **26**, 1445-1455.
- Schneider, T.D., Arteaga-Salas, J.M., Mentele, E., David, R., Nicetto, D., Imhof, A. and Rupp, R.A.W.** (2011). Stage-specific histone modification profiles reveal global transitions in the *xenopus* embryonic epigenome. *PlosOne* **6**, e22548.
- Stark, G.R., Wang, Y. and Lu, T.** (2011). Lysine methylation of promoter-bound transcription factors and relevance to cancer. *Cell Res.* **21**, 375-380.
- Stark, G.R., Cheon, H. and Wang, Y.** (2017). Responses to cytokines and interferons that depend upon JAKs and STATs. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* doi:10.1101/cshperspect.a028555.
- Thisse, C. and Thisse, B.** (1999). Antivin, a novel and divergent member of the TGF- $\beta$  superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development* **126**, 229-240.
- Vinh Do, D., Ueda, J., Messerschmidt, D.M., Lorthongpanich, C., Zhou, Y., Feng, B., Guo, G., Lin, P.J., Hossain, M.Z., Zhang, W., Moh, A., Wu, Q., Robson, P., Ng, H.H., Poellinger, L., Knowles, B.B., Solter, D. and Fu, X.Y.** (2013). A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes Dev* **27**, 1378-1390.
- Völkel, P., Dupret, B., Le Bourhis, X. and Angrand P.O.** (2015). Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics. *Am. J. Transl. Res.* **7**, 175-193.
- Yaklichkin, S., Steiner, A.B., Lu, Q. and Kessler, D.S.** (2007). FoxD3 and Grg4 physically interact to repress transcription and induce mesoderm in *Xenopus*. *J. Biol. Chem.* **282**, 2548-2557.
- Yang, J., Huang, J., Dasgupta, M., Sears, N., Miyagi, M., Wang, B., Chance, M.R., Chen, X., Du, Y., Wang, Y., An, L., Wang, Q., Lu, T., Zhang, X., Wang, Z. and Stark, G.** (2010). Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 21499-21504.
- Yuan, Z, Guan, Y, Chatterjee, D. and Chin, Y.E.** (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* **307**, 269-273.
- Xu, K., Wu, Z.J., Groner, A.C., He, H.H., Cai, C., Lis, R.T., Wu, X., Stack, E.C., Loda, M., Lui, T., Xu, Han., Cato, L., Thornton, J.E., Gregory, R.I., Morrissey, C., Vessella, R.L., Montironi, R., Magi-Galluzzi, C., Kantoff, P.W., Balk, S.P., Liu, X.S. and Brown, M.** (2012). EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is polycomb-independent. *Science* **338**, 1465-1469.

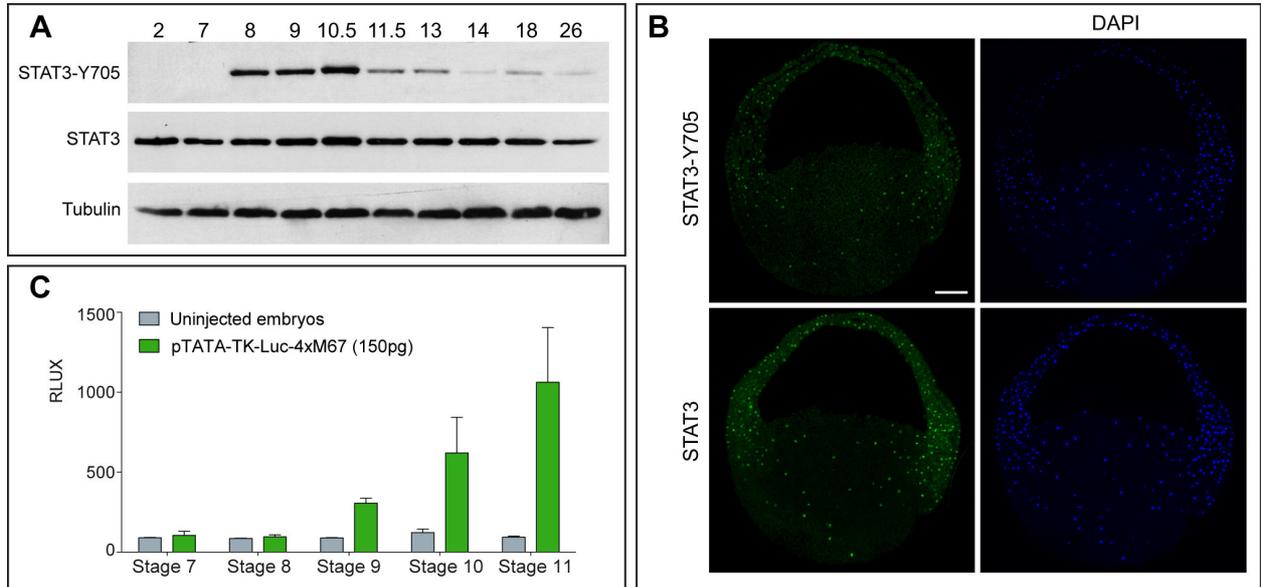
# Figures



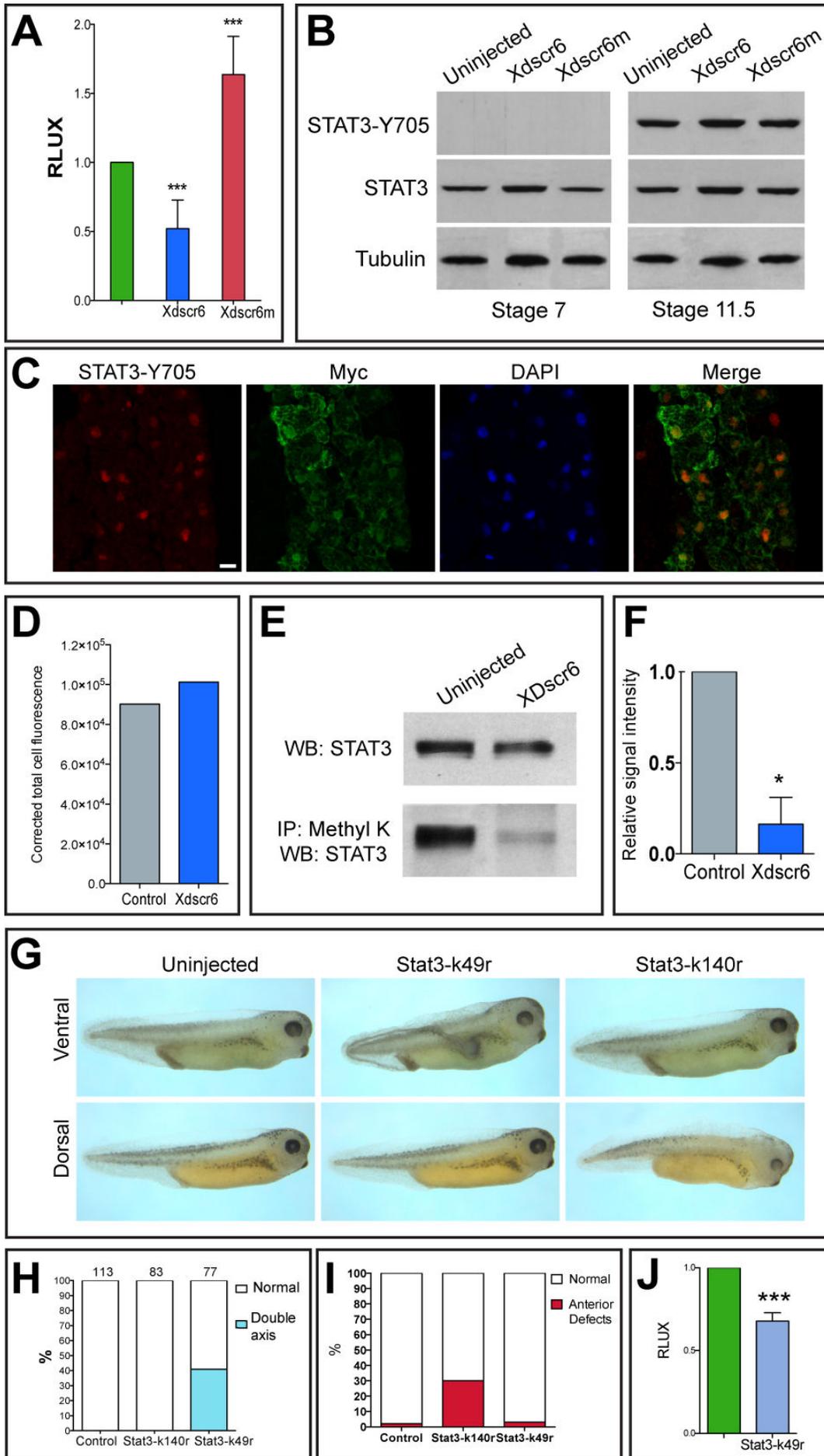
**Figure 1.** XDSCR6 and XSTAT3 exhibit antagonistic activities *in vivo*. (A, B) *Xstat3c* mRNA dorsal microinjection results in anterior deficiencies rescued by co-injected with *Xdscr6* mRNA. (C, D) *Xdscr6* mRNA ventral injection results in second axis induction partially rescued by co-injection with *Xstat3c* mRNA.



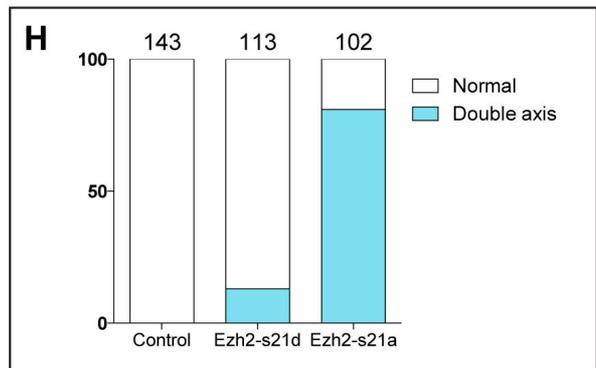
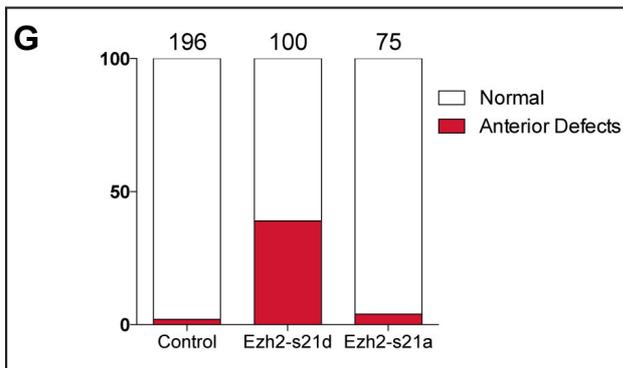
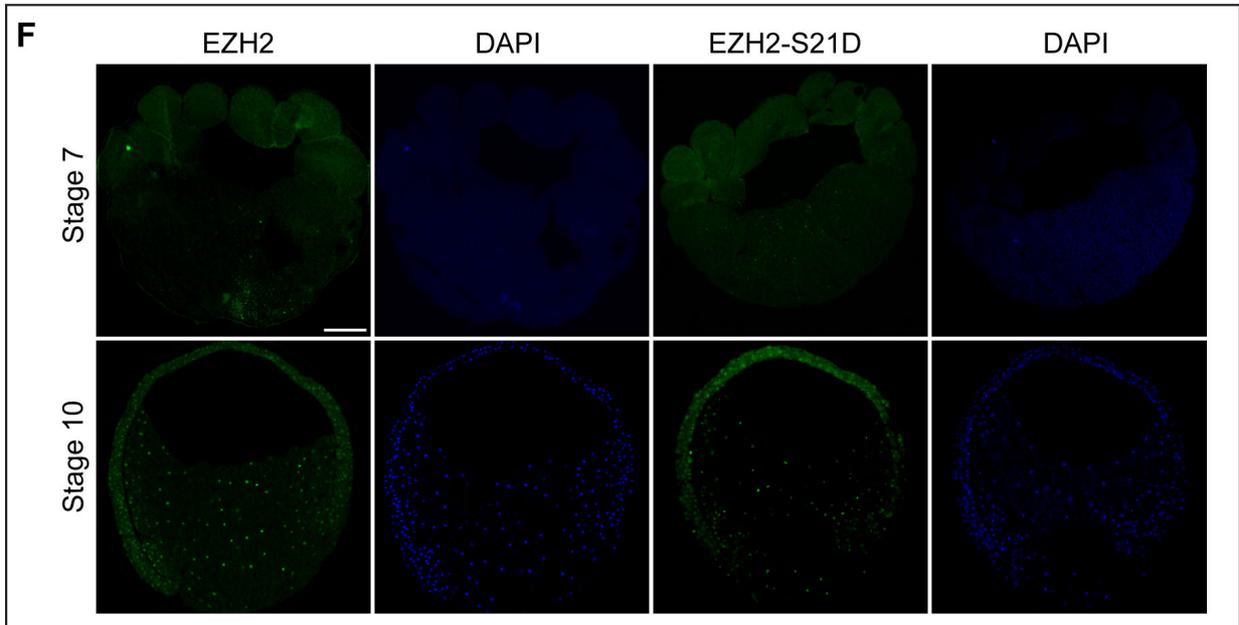
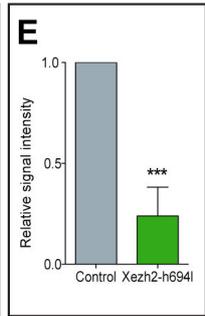
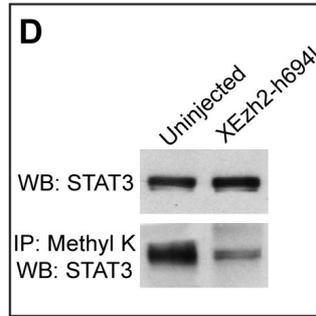
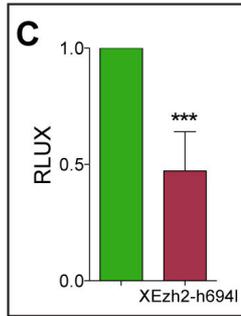
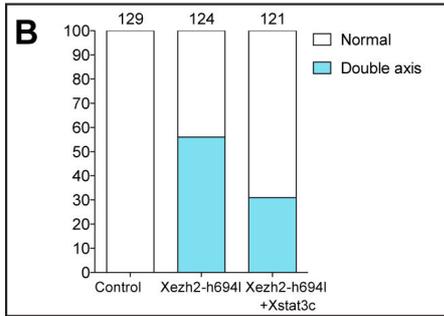
**Figure 2.** XDSCR6 and XSTAT3 physically interact *in vitro* and *in vivo*. (A) Schematic representation of different XSTAT3 constructs. (B) GST pull-down of embryonically expressed myc-XSTAT3-WT, myc-XSTAT3-DC and myc-XSTAT3-DM by GST-XDSCR6. (C) GST pull-down of *in vitro* translated myc-XSTAT3-WT by GST-XDSCR6. (D) Immunoprecipitation of endogenous XSTAT3 by anti-XDSCR6 antibody in stage 11.5 embryos.



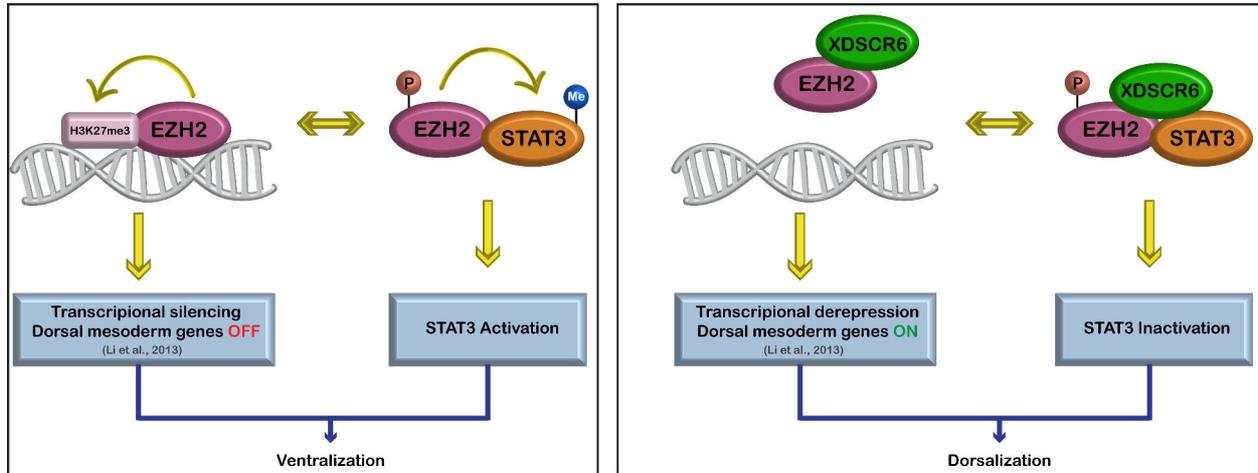
**Figure 3.** XSTAT3 is mainly activated during gastrulation. (A) Western blot analysis of XSTAT3 expression and XSTAT3 phosphorylation on tyrosine 705 (XSTAT3-Y705) from stage 2 to 26. (B) Confocal microscopic analysis of immunodetection experiments for XSTAT3 and XSTAT3-Y705 on embryonic section at stage 10.5. Scale bar 100µm. (C) Luciferase reporter assay at indicated stages of development after injection of pTATA-TK-Luc-4xM67 reporter containing Stat-binding sites. Values are presented as mean +/- S.D. from two independent experiments.



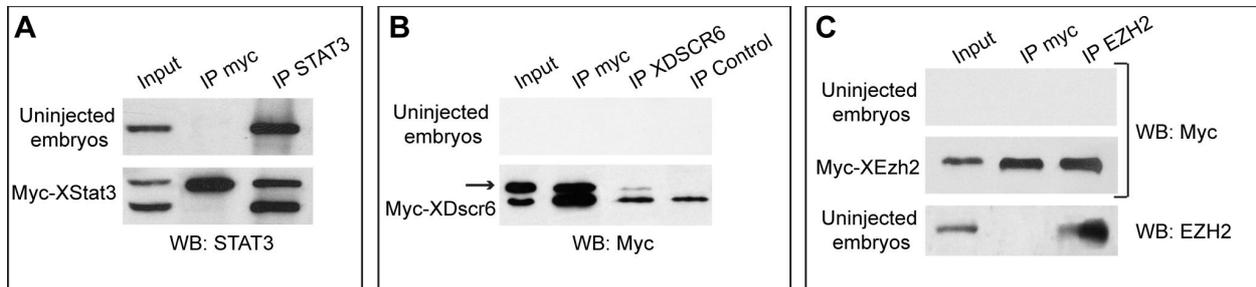
**Figure 4.** XDSCR6 negatively regulates XSTAT3 by modulating lysine-methylation. (A) Luciferase assay using pTATA-TK-Luc-4xM67 reporter in control, *Xdscr6* mRNA- or *Xdscr6m* mRNA-injected embryos at 10.5 stage. Values are presented as mean +/- S.D. from three independent experiments (\*\**p* < 0.0001; Student's t-test). (B) Western blot analysis of stage 10.5 embryonic extracts for XSTAT3 expression and XSTAT3-Y705 in control, *Xdscr6* mRNA- or *Xdscr6m* mRNA-injected embryos. (C) Immunodetection with anti-STAT3-Y705 and anti-myc antibodies in embryos injected with *Xdscr6-myc* mRNA. Scale bar 10  $\mu$ m. (D). Quantification of nuclear fluorescence intensity for STAT3-Y705 nuclear staining comparing control and *Xdscr6-myc* expressing embryos (*p* > 0.05; Student's t-test). (E) Immunoprecipitation from stage 10.5 embryonic extract with Pan-methyl-lysine antibody (Methyl K) followed by western blot analysis with anti-STAT3 antibody in uninjected (left line) and *Xdscr6-myc* mRNA injected embryos (right line). (F) Quantification of signals obtained after immunoprecipitation with Pan-methyl-lysine antibody followed by a western blot analysis with anti-STAT3 from three independent experiments (\* *p* < 0.05; Student's t-test). (G) Ventral injection of *Stat3-K49R* mRNA results in axis duplication while dorsal injection has no effect. On the contrary, dorsal injection of *Stat3-K140R* mRNA leads to anterior defects while ventral injection has no effect. (H, I) Statistical analysis of phenotypes after ventral (H) or dorsal (I) injection. Numbers at the top of each column indicate total embryos scored from three independent experiments using different batches of embryos. (J) Luciferase assay using pTATA-TK-Luc-4xM67 reporter in control, in uninjected and *stat3-K49R* mRNA-injected embryos at 10.5 stage. Values are presented as mean +/- SEM from three independent experiments, (\*\**p* < 0.0001; Student's t-test).



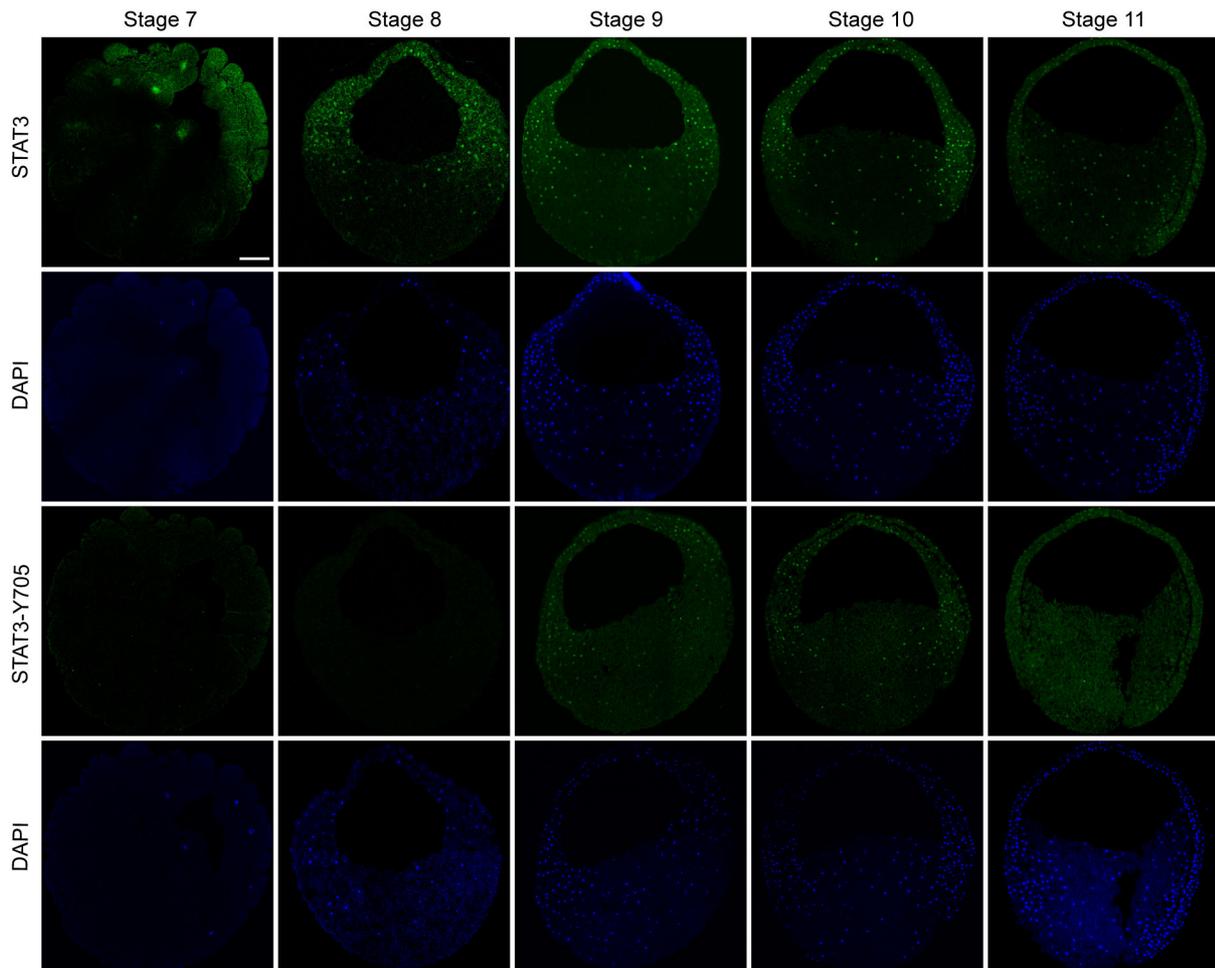
**Figure 5.** EZH2 methyltransferase activity is required for XSTAT3 activity *in vivo*. (A) Ventral overexpression of XEZH2-H694L leads to axis duplication and is rescued by *Xstat3-c* mRNA co-injection. (B) Statistical analysis of phenotypes after ventral injection of *Xstat3c* mRNA alone or in combination with *Xezh2-h694l* mRNA. Numbers at the top of each column indicate total embryos scored from three independent experiments using different batches of embryos. (C) Luciferase assay using pTATA-TK-Luc-4xM67 reporter in control and or *Xezh2-h694l* mRNA-injected embryos at 10.5 stage. Values are presented as mean +/- SEM from three independent experiments (\*\**p* < 0.0001; Student's t-test). (D) Immunoprecipitation from stage 10.5 embryonic extract with Pan-methyl-lysine antibody (Methyl K) followed by a western blot analysis with anti-STAT3 antibody in uninjected (left line) and *Xezh2-h694l* mRNA injected embryos (right line). (E) Quantification of signals obtained after immunoprecipitation with Pan-methyl-lysine antibody followed by western blot analysis with anti-STAT3 from three independent experiments (\*\**p* < 0.0001; Student's t-test). (F) Immunodetection experiments with anti-EZH2 and anti-EZH2-S21 antibodies on stage 7 and stage 10 embryos. (G, H) Statistical analysis of phenotypes of uninjected, *ezh2-s21d-* and *ezh2-s21a-*mRNA injected embryos at two-cell stage in dorsal (G) or in ventral side (H). Numbers at the top of each column indicate total embryos scored from three independent experiments using different batches of embryos.



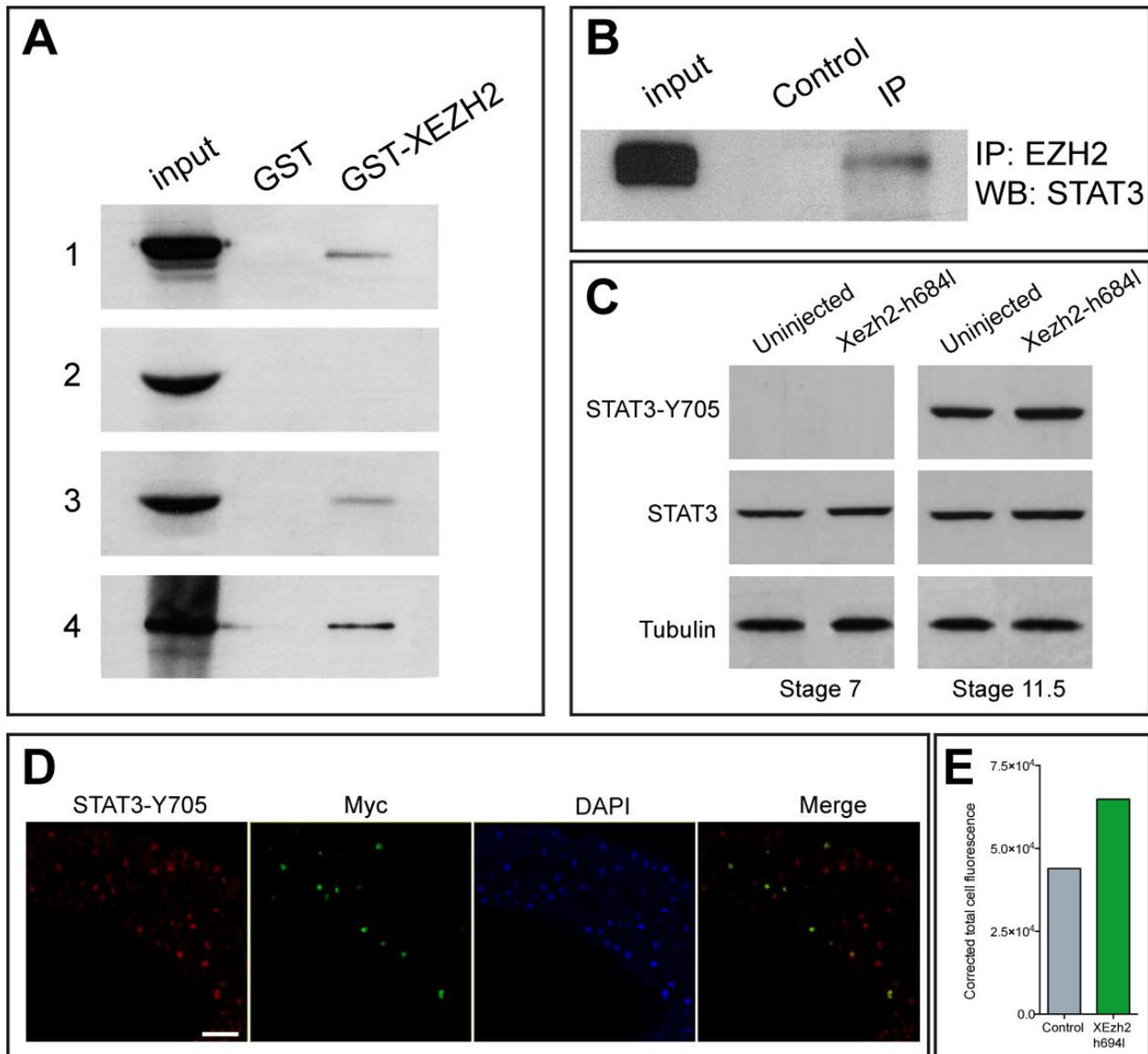
**Figure 6.** A proposed model for XDSCR6 function during *Xenopus* gastrulation. By directly interacting with EZH2 and XSTAT3, XDSCR6 can participate either to transcriptional depression (Li et al., 2013) but also interfere with the lysine-methylation of XSTAT3 mediated by EZH2. These two combined activities of DSCR6 participate to activation of dorsal mesoderm genes and inactivation of the ventralizing activity of XSTAT3 leading to tissue dorsalization.



**Figure S1.** Antibodies specificity. (A) Two-cell stage embryos were injected with 1ng of *myc-stat3*-WT mRNA. At gastrula stage, uninjected (upper panel) and injected embryos (lower panel) were lysed and embryonic extracts were submitted to immunoprecipitation with anti-myc or anti-STAT3 antibodies and analysed by western blotting using anti-STAT3 antibody. The expected band for endogenous STAT3 and *myc*-STAT3-WT are detected specifically at 84 kDa and 94 kDa respectively. (B) Two-cell stage embryos were injected with 500pg of *myc-xdscr6* mRNA. At gastrula stage, uninjected (upper panel) and injected embryos (lower panel) were lysed and embryonic extracts were submitted to immunoprecipitation with anti-myc or anti-XDSCR6 antibodies and analysed by western blotting using anti-myc antibody. The expected band for *myc*-XDSCR6 is detected specifically at 24 kDa. (C) Two-cell stage embryos were injected with 1ng of *myc-XEzh2* mRNA. At gastrula stage, uninjected (upper panel) and injected embryos (lower panel) were lysed and embryonic extracts were submitted to immunoprecipitation with anti-myc antibody and analysed by western blotting using anti-myc antibody. The expected band for endogenous *myc*-XEZH2 is detected specifically at 92 kDa. In parallel, embryonic extracts from uninjected embryos were submitted to immunoprecipitation with anti-EZH2 antibody and analysed by western blot with anti-EZH2 antibody. In these conditions, the endogenous XEZH2 is detected specifically at 82 kDa.



**Figure S2.** XSTAT3 and XSTAT3-Y705 expression profile. Immunodetection experiments were performed from stage 7 to stage 11 with anti-STAT3 and anti-STAT3-Y705 antibodies on embryonic sections. STAT3 expression is limited to ectodermic cells at stage 7 and becomes widely expressed at stage 8. STAT3-Y705 is detected later, at stage 9, exclusively in nuclei. Scale bar 100µm.



**Figure S3.** (A, B) XEZH2 and XSTAT3 physically interact. (A) GST-pull down of embryonically expressed myc-XSTAT3-WT (1), myc-XSTAT3-DC (2), myc-XSTAT3-DM (3) and *in vitro* transcribed myc-XSTAT3-WT (4) by GST-XDSCR6. (B) Immunoprecipitation of endogenous XSTAT3 by anti-EZH2 antibody in stage 11.5 embryos. (C-E) Overexpression of either wild type XEZH2 or methylase defective EZH2-H694L mutant does not change STAT3 expression, phosphorylation on Y705 and subcellular localization. (C) Western blot analysis at stage 7 and 10.5 of embryonic extracts for XSTAT3 expression and XSTAT3-Y705 in control and *ezh2-h694l* mRNA-injected embryos. (D) Immunodetection with anti-STAT3-Y705 and anti-myc antibodies in embryos injected with *ezh2-h694l* mRNA. Scale bar 50µm. (E) Quantification of nuclear fluorescence intensity after anti-STAT3-Y705 staining comparing control and EZH2-H694L-myc expressing embryos ( $p > 0.05$ ; Student's t-test).



# Discussion

Mon projet de thèse portait sur l'étude des interactions biochimiques et fonctionnelles entre XDSCR6 et ses partenaires au cours du développement précoce de l'amphibien *Xenopus laevis*. Nous avons montré que XDSCR6 inhibe l'activité transcriptionnelle de XSTAT3 en interférant avec la méthylation de ses résidus lysine, un mécanisme qui n'a jamais été mis en évidence au cours du développement embryonnaire chez l'amphibien. De plus, nos résultats suggèrent que XDSCR6, XSTAT3 et XEZH2 soient impliquées dans un même processus de régulation génique lors de la formation axes embryonnaires.

## A. La fonction de XDSCR6, XSTAT3 et XEZH2 au cours du développement embryonnaire d'amphibien

### 1. XSTAT3 est active au cours de la gastrulation

Nos résultats de profil d'expression spatio-temporel montrent que XSTAT3 est présente de manière constante pendant les quatre premières phases du développement embryonnaire précoce d'amphibien : segmentation, gastrulation, neurulation et organogenèse. Ces résultats sont en accord avec les données publiés par Nishinakamura (Nishinakamura et al., 1999). Etant donné que la transition blastuléenne a lieu au stade 8 chez l'amphibien, ces résultats suggèrent qu'il y aurait une contribution maternelle et zygotique dans la production de la protéine STAT3.

En revanche, la cinétique de la forme phosphorylée de XSTAT3 sur la tyrosine 705 n'avait jamais été étudiée chez l'amphibien. Nous avons pu montrer qu'elle n'est détectée qu'à partir de la fin de la segmentation et tout de long de la gastrulation. Dans l'embryon murin, STAT3 est présente dans l'ovocyte et pendant tous les premiers stades de division, alors que STAT3-Y705 n'est détectée qu'à partir du stade 4-8 cellules.



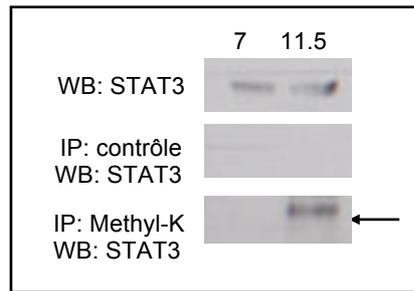
On constate chez ces deux espèces, que STAT3 est phosphorylée sur la tyrosine 705 dans les deux cas après la transition blastuléenne (chez la souris elle a lieu au stade 2 cellules et chez l'amphibien au stade 8). Ceci suggère que l'activité de STAT3 n'interviendrait donc qu'après la mise des transcriptions zygotiques.

Nous avons montré que pendant la segmentation, XSTAT3 endogène est localisée au niveau de l'hémisphère animal de l'embryon, puis durant la gastrulation elle est observée majoritairement dans l'ectoderme et dans le mésoderme. Par ailleurs, il a déjà été montré que l'ARNm de *XStat3* est présent exclusivement dans l'hémisphère animal de l'embryon pendant la segmentation (Flachsova et al., 2013). Nos résultats sont en accord avec ces observations.

De plus, nous avons montré que la forme phosphorylée de XSTAT3 sur la tyrosine 705 n'est détectée par immunohistochimie qu'à partir du stade 9 confirmant ainsi nos résultats de Western blot. Au niveau subcellulaire, XSTAT3-Y705 est spécifiquement présente dans les noyaux.

Nous avons également montré que l'activité transcriptionnelle de XSTAT3 est détectable à partir du stade 9 et est maintenue pendant toute la gastrulation. Ces données sont parfaitement en accord avec nos résultats obtenus par Western blot et par immunohistochimie. En conclusion, nous avons montré qu'au cours de la gastrulation XSTAT3 est activée et transcriptionnellement active.

Les protéines de la famille STAT présentent de grandes similarités structurales. Il est donc légitime de s'interroger sur la spécificité de l'activité transcriptionnelle observée dans nos expériences, d'autant plus que des données de la littérature ont montré que, chez l'amphibien, les ARNm de *Stat1* et *Stat5* sont aussi détectés pendant la segmentation et la gastrulation. Des analyses par Western blot, à partir d'extraits embryonnaires de xénope, ont montré que la forme phosphorylée sur la tyrosine de STAT1 est présente dès l'ovogénèse et pendant la première partie de la segmentation (jusqu'au stade 8) (Turpen et al., 2001). L'absence d'activité de notre construction reportrice avant le stade 8 nous permet de proposer que l'activité transcriptionnelle observée ne serait donc pas celle de STAT1. L'hypothèse d'une activation induite par la protéine STAT5 est aussi peu probable car chez l'amphibien des expériences antérieures ont montré que la dérégulation de cette protéine induit des défauts tardifs lors de l'érythropoïèse (Schmerer et al., 2006). Ces données nous suggèrent que l'activité transcriptionnelle que nous avons observée serait bien spécifique de XSTAT3.



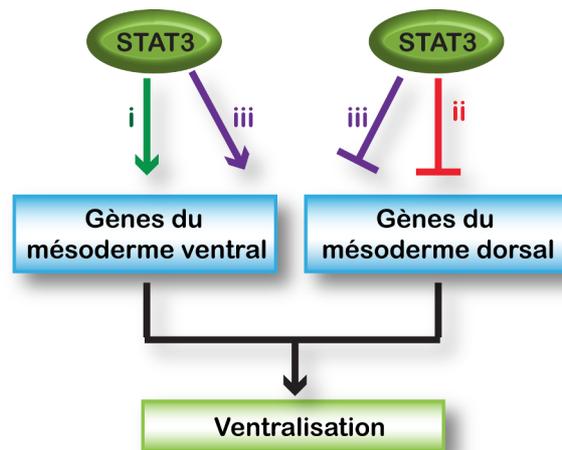
**Figure 37 – La protéine XSTAT3 est méthylée au cours de la gastrulation.** Des expériences d'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-Pan-Methyl-Lysine (Methyl K) ont été réalisées à partir d'extraits embryonnaires au stade 7 et au stade 11,5. Elles ont été suivies d'un Western-blot avec l'anticorps anti-STAT3. L'IP contrôle correspond à l'immunoprécipitation sans anticorps. La flèche indique la bande correspondante à XSTAT3.

Outre la phosphorylation, nos résultats ont montré que XSTAT3 peut également être méthylée sur les résidus lysine. J'ai montré que cette méthylation a lieu au cours de la gastrulation, notamment au stade 11,5. Nous avons voulu vérifier également si cette protéine pouvait être méthylée au cours de la segmentation, afin d'établir une cinétique de méthylation. Mes résultats préliminaires suggèrent qu'au stade 7 la protéine XSTAT3 ne serait pas méthylée sur les résidus lysine (figure 37). Ainsi, peut-être que la méthylation aurait lieu au moment où XSTAT3 devient activée et transcriptionnellement active, c'est-à-dire après la transition blastuléenne. Pour confirmer ces résultats, je dois refaire cette même expérience. Malheureusement par manque de temps et surtout de matériel (actuellement l'anticorps anti-pan-methyl-lysine utilisé dans mes expériences antérieures n'est plus disponible) je n'ai pas pu répéter cette expérience.

## **2. L'activation de XSTAT3 conduit à des malformations antérieures**

Nous avons montré que l'activation anormale de XSTAT3 dans la région dorsale de l'embryon induit des malformations antérieures. Un phénotype similaire a été obtenu lors de l'activation du récepteur gp130 (Nishinakamura et al., 1999). Ainsi, nos résultats sont cohérents avec l'article publié par Nishinakamura et appuient donc l'idée d'une fonction de XSTAT3 dans la ventralisation. Il nous reste à vérifier comment XSTAT3 est capable de ventraliser les tissus.

Il est largement connu que l'axe dorso-ventral est organisé par l'activité de BMP4 et la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. Les travaux de Nishinakamura en 1999 ont montré que l'activité de XSTAT3 est indépendante de BMP4 et de Xwnt-8. Il serait tout de même intéressant de confirmer que l'activité de STAT3 est indépendante de la voie Wnt, car une étude menée dans les embryons de poisson-zèbre a montré que STAT3 serait un cible transcriptionnel de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Lin et al., 2011). Cette information suggère que Stat3 aurait un lien avec cette voie de signalisation. Toujours dans l'article publié par Nishinakamura en 1999, les auteurs ont proposé que la signalisation de XSTAT3 antagonise la voie de Smad2. SMAD2 est une protéine qui est activée par l'Activine, Vg1 ou Nodal (Schohl and Fagotto, 2002). Il serait donc intéressant de vérifier si l'activation de XSTAT3 inhibe l'activité dorsalisante de ces trois facteurs. Ceci pourrait expliquer les propriétés ventralisantes de ce facteur de transcription. Plusieurs questions peuvent ainsi surgir (figure 38) :



**Figure 38 – Hypothèses pour les propriétés ventralisantes de XSTAT3.** Trois hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer les propriétés ventralisantes de XSTAT3. En vert : i) XSTAT3 activerait l'expression des gènes du mésoderme ventral. En rouge : ii) XSTAT3 inhiberait l'expression des gènes du mésoderme dorsal. En violet : iii) XSTAT3 pourrait activer et inhiber les gènes du mésoderme ventral et dorsal respectivement.

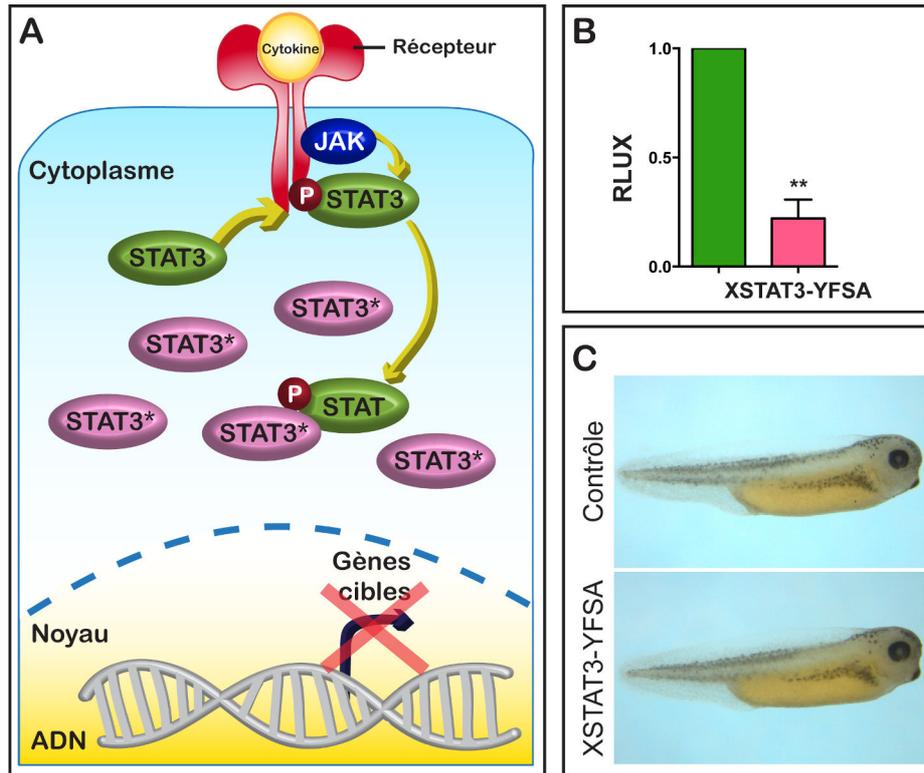
- i) Est-ce que XSTAT3 active la transcription des gènes du mésoderme ventral et c'est pour cette raison que les embryons sont ventralisés ?
- ii) Est-ce que dans la région ventrale XSTAT3 participe à l'inhibition des gènes capables d'induire des tissus dorsaux ?
- iii) Est-ce que dans la région ventrale, XSTAT3 peut inhiber l'expression des gènes du mésoderme dorsal et activer les gènes du mésoderme ventral ?

Les travaux de Nishinakamura ont également montré que lorsque XSTAT3 est converti en un répresseur dans la région ventrale, il y a formation d'un axe surnuméraire. De plus, des expériences de RT-PCR ont montré que la surexpression de ce mutant peut soit induire l'expression de *Chordin* qui est normalement éteinte dans la région ventrale, soit inhiber l'expression de *Xvent* qui est normalement exprimé dans cette même région. Ceci nous suggère deux hypothèses possibles. Soit, dans la région ventrale, XSTAT3 serait capable à la fois d'inhiber les gènes du mésoderme dorsale et d'induire l'expression des gènes du mésoderme ventrale. Soit ce mutant entre en compétition avec XSTAT3 endogène en occupant les sites de liaison normalement occupés par XSTAT3 et la modulation de l'expression de *Xvent* et *Chordin* seront le résultat d'un effet indirect de la répression d'un facteur intermédiaire. Des expériences sont en cours pour vérifier cette hypothèse. En effet, nous avons surexprimé XStat3C dans la région de la calotte animale et nous avons découpé les explants au stade blastula. Des expériences de RT-qPCR seront ensuite réalisées au stade gastrula en utilisant les marqueurs du mésoderme dorsal (*Goosecoid*, *Chordin*), ventral (*Xwnt8*, *Ventx1/2*) ou du tissu neural (*Otx2*). Des expériences d'hybridation *in situ* sur l'embryon entier, préalablement injecté dans les régions dorsale ou ventrale avec les ARNm *Xstat3c* ou *Xstat3-k49r*, pourront également être réalisées afin de vérifier les conséquences de l'expression spatiale de ces gènes marqueurs. Les résultats obtenus nous permettront de caractériser le type de tissus induits par STAT3 et les gènes dont l'expression serait modulée positivement ou négativement.



### **3. Identification des gènes cibles de XSTAT3 *in vivo* au cours du développement embryonnaire**

Tous nos essais de luciférase ont été faits avec un promoteur composite comprenant quatre éléments de réponse aux protéines STAT placé en amont d'un promoteur minimal et du gène rapporteur luciférase. Il serait intéressant d'identifier les gènes cibles endogènes de XSTAT3 au cours du développement embryonnaire du xénope. Il a été montré que STAT3 joue un rôle crucial pour le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (ESC) (Boeuf et al., 1997). En effet, STAT3 régule directement l'expression de *Oct4* et *Nanog* en se liant à leur promoteur afin de maintenir l'état pluripotent et l'auto-renouvellement des ESC de souris (Do et al., 2013). Chez le xénope, l'orthologue de *Nanog* n'a jamais été détecté. En revanche, il a été publié que chez l'amphibien les facteurs de la famille *Ventx* ont des fonctions similaires à celles de *Nanog* chez la souris. Au cours du développement embryonnaire du xénope, l'activité de *ventx1/2* contrôle le passage de l'état indifférencié à l'état différencié, comme *Nanog* chez la souris (Scerbo et al., 2012). De plus, des données issues de Xenbase montrent que ces gènes sont exprimés uniquement à partir du stade 8, moment où STAT3 devient transcriptionnellement active. Ainsi, *ventx1/2* est un candidat possible pour être un gène cible de XSTAT3. En ce qui concerne *Oct4*, chez le xénope trois gènes homologues de ce gène ont été décrits : *Xoct25*, *Xoct60* et *Xoct91*, formant le groupe *XIPouV*. Ces gènes sont exprimés spécifiquement dans les tissus ectodermique et mésodermique au cours de la segmentation et de la gastrulation. Ce profil d'expression est similaire à celui de XSTAT3 que j'ai décrit précédemment. Parmi les gènes du groupe *XoctV*, *Xoct91* est le seul capable de restaurer la capacité d'auto-renouvellement des ESC chez la souris, présentant ainsi la même propriété d'auto-renouvellement que *mOct4* de souris (Morrison and Brickman, 2006). De plus, des informations prises du site Xenbase montrent que *Xoct25* et *Xoct60* sont exprimés avant la transition blastuléenne, alors que *Xoct91* commence à être exprimé seulement après la transition blastuléenne, c'est-à-dire au même moment où STAT3 devient transcriptionnellement active. Ainsi, comme pour *ventx1/2*, *Xoct91* serait un gène cible envisageable pour XSTAT3. Le gène *Socs-3* pourrait aussi être envisagé comme un gène cible. En effet, il est largement connu que *Socs-3*, un gène conservé parmi les vertébrés, est un gène cible de STAT3. Dans les embryons de *Xenopus tropicalis*, il a été montré que 3 sites de liaison des STAT sont localisés dans le promoteur proximal de *SOCS-3* (Kuliyev et al., 2005).



**Figure 39 – Les conséquences de la surexpression de XSTAT3-YFSA au cours du développement embryonnaire. (A)** La forme non phosphorylable de STAT3 (STAT3\* = STAT3-YFSA, en rose) forme des hétérodimères avec STAT3-Y705 endogène. Le mutant STAT3-YFSA séquestre la protéine STAT3 endogène dans le cytoplasme, empêchant ainsi son entrée dans le noyau. Par conséquent, l'activité transcriptionnelle de STAT3 diminue. **(B)** Des essais luciférase ont été réalisés sur des embryons injectés avec le rapporteur pTATA-TK-Luc-4xM67 (vert) et/ou avec l'ARNm de *XStat3-yfsa* (rose) (\*\*p-value = 0,0004). **(C)** La surexpression de l'ARNm *XStat3-yfsa* (1 ng) dans la région ventrale de l'embryon n'induit pas de phénotype. (P : phosphorylation)

#### **4. L'inactivation XSTAT3, en modulant négativement sa phosphorylation, ne semble pas jouer un rôle dans la mise en place des axes embryonnaires**

Les travaux d'Ohkawara ont montré que la surexpression dans la région dorsale d'un morpholino spécifique de XStat3 induit des problèmes de gastrulation et un axe antéro-postérieur raccourci (Ohkawara et al., 2004). Afin d'étudier les conséquences de la perte de fonction de STAT3 dans l'embryon, nous avons utilisé le double mutant STAT3-YF-SA utilisé par Ohkawara dans les embryons de xénope. Pour rappel, le double mutant STAT3-YF-SA est une forme dominante négative sur la phosphorylation de STAT3 dans lequel les acides aminés tyrosine et sérine ont été remplacés par des acides aminés non phosphorylables. Il a été montré que la transfection de la construction STAT-YF dans les cellules rénales embryonnaires humaines, induit la diminution de l'activité transcriptionnelle de STAT3. Par ailleurs, dans ces travaux, les auteurs ont également montré que ce mutant est capable de former des hétérodimères avec STAT3 endogène. En revanche, ils ne sont pas capables d'être transloqués dans le noyau ni de se lier à l'ADN (figure 39A) (Mohr et al., 2013). Nos analyses de luciférase dans les embryons de xénope ont montré que la surexpression du double mutant XSTAT3-YF-SA induit la diminution de l'activité transcriptionnelle endogène de XSTAT3 (figure 39B). La surexpression de ce mutant dans la région ventrale ou dorsale n'induit aucun phénotype, tous les embryons étaient normaux (figure 39C). Ces résultats suggèrent que ce double mutant ne semble pas se comporter comme un répresseur de XSTAT3, mais plutôt comme une forme inactivée de XSTAT3. Ainsi, au cours du développement embryonnaire, l'inactivation de XSTAT3 ne semble pas être impliquée dans la mise en place des axes.

Mutants de XSTAT3	EnR	YFSA	K49R
<b>Fonction</b>	Répresseur	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Pas de phosphorylation</li> <li>❖ Pas de dimérisation</li> <li>❖ Séquestre STAT3 endogène dans le cytoplasme</li> </ul>	Pas de méthylation sur K49
<b>Activité transcriptionnelle</b>	N.D.	↘	↘
<b>Phénotype</b>	Double axe	Pas de phénotype	Double axe
<b>Gènes marqueurs du mésoderme dorsal</b>	↗	N.D.	N.D.
<b>Gènes marqueurs du mésoderme ventral</b>	↘	N.D.	N.D.

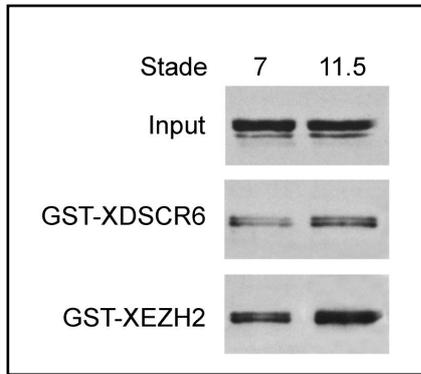
**Table 4 – Les conséquences de la surexpression des formes mutantes de XSTAT3 dans l’embryon de xénope.** Tableau récapitulatif résumant les conséquences de la surexpression des différents mutants de XSTAT3. Dans les travaux de Nishinakamura l’activité transcriptionnelle de STAT3 dans les embryons injectés avec *Stat3-EnR* n’a pas été analysée. (N.D : non déterminé ; ↗: augmente ; ↘: diminue).

## **5. XSTAT3 est méthylée sur les résidus lysine au cours de la gastrulation et la modulation de cette méthylation est impliquée dans la mise en place des axes embryonnaires**

Afin d'évaluer l'implication de la méthylation sur les résidus lysine dans l'activité de XSTAT3 au cours du développement, nous avons étudié les conséquences de la surexpression des mutants STAT3-K49R et STAT3-K140R décrits par G. Stark et ses collaborateurs. Nos résultats ont montré que la surexpression de ces deux formes non méthylables de STAT3, dans les régions ventrale ou dorsale affecte la mise en place des axes embryonnaires du xénope.

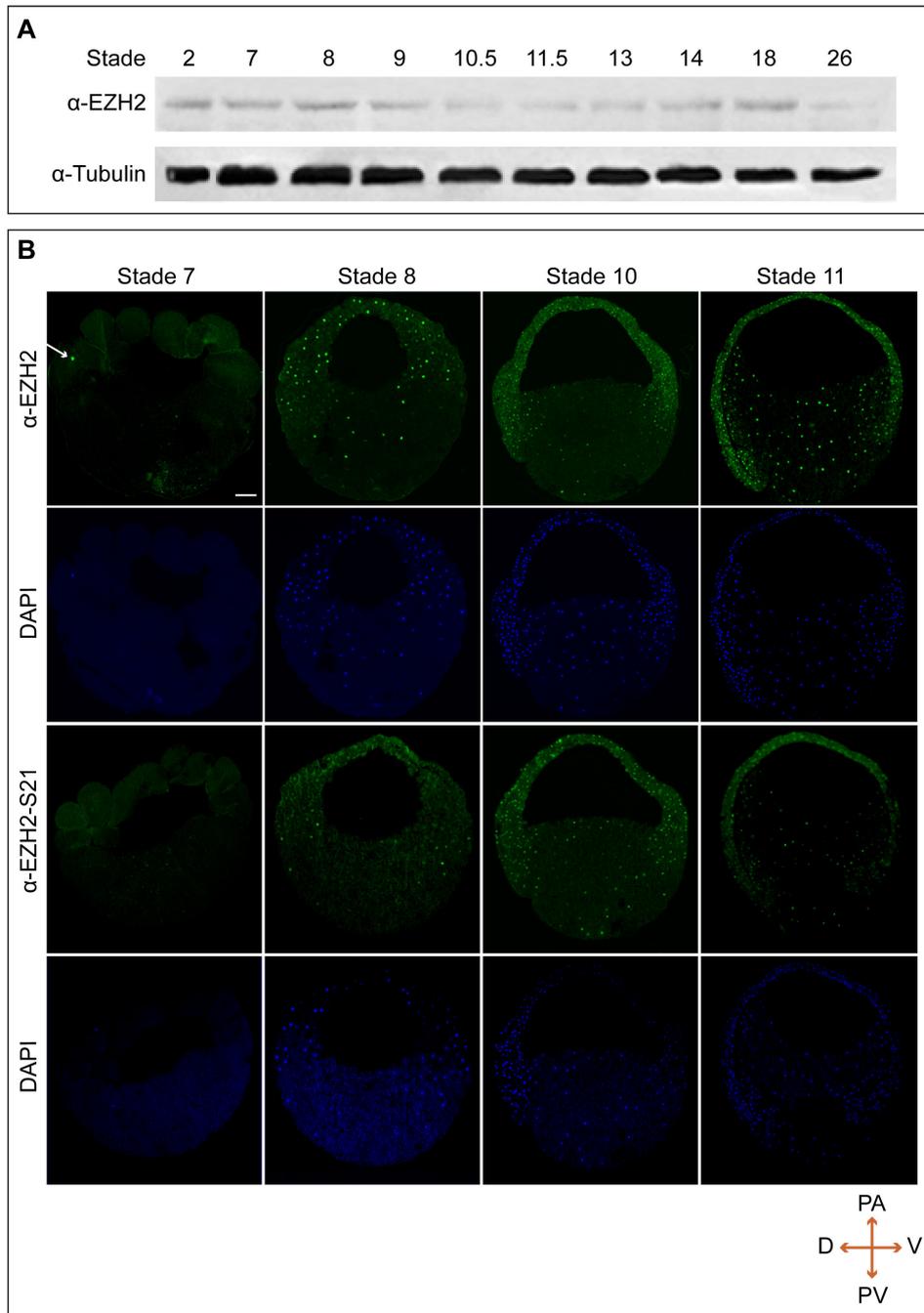
La mutation ponctuelle sur le résidu K49, méthylé par EZH2, induit la diminution de l'activité transcriptionnelle endogène de XSTAT3, suggérant ainsi que ce mutant agit comme une perte de fonction de XSTAT3. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature dans la mesure où il a été montré que la méthylation de ce résidu régule positivement l'activité transcriptionnelle XSTAT3 (Dasgupta et al., 2015; Yang et al., 2010). De plus, l'expression ventrale du mutant Stat3-k49r conduit à la formation d'un axe embryonnaire surnuméraire, rappelant le phénotype obtenu lors de l'injection de STAT3-EnR. Ainsi, le résidu K49 serait important pour l'activité transcriptionnelle de XSTAT3 et pour la mise en place des axes embryonnaires. Inversement, la surexpression dorsale de la forme STAT3-K140R, normalement méthylée par SET9, induit des défauts antérieurs comparables à ceux obtenus lors de la surexpression de la forme constitutivement active de XSTAT3 (XSTAT3C). Ceci peut s'expliquer par le fait que la mutation de ce résidu régule positivement l'activité de STAT3, comme cela a été observé dans les cellules humaines (Yang et al., 2010). Des essais luciférase sont en cours afin de vérifier si dans les embryons de xénope, cette forme peut également réguler positivement l'activité transcriptionnelle endogène de XSTAT3.

L'ensemble de ces résultats montre que lorsque le résidu K49 est muté, XSTAT3 semblerait se comporter comme STAT3-EnR lors de la mise en place des axes embryonnaires. De plus, ces résultats suggèrent que, au contraire de la phosphorylation, la méthylation est une modification post-traductionnelle modulant la mise en place des axes embryonnaires (Table 4). Ainsi, nos travaux *in vivo* ont montré que la modulation fine des modifications post-traductionnelles de XSTAT3 est impliquée dans le contrôle de son activité et dans la mise en place des axes.



**Figure 40 – XSTAT3 interagit avec XDSCR6 et XEZH2 au cours de la segmentation et au cours de la gastrulation.**

Des expériences de GST-pull down suivies d'un Western-Blot anti-STAT3 ont été réalisées à partir d'extraits d'embryons non injectés. Ces embryons ont été pris aux stades 7 et 11,5. Ces résultats montrent que XSTAT3 interagit avec XDSCR6 et XEZH2 indépendamment de son état de phosphorylation sur la tyrosine 705 et de son activité transcriptionnelle.



**Figure 41 – Profil d'expression spatio-temporel de la protéine XEZH2 endogène. (A)** Des analyses de Western Blot sur des embryons pris du début de la segmentation jusqu'à l'organogenèse. **(B)** Des expériences d'immunodétection sur des coupes d'embryons au stade 7, 8, 10 et 11 en utilisant les anticorps anti-EZH2 et anti-EZH2-S21. Au stade 7, la flèche indique la position du noyau positif pour XEZH2. D'autres expériences ont montré qu'à ce stade XEZH2 est également détectée dans les noyaux de l'hémisphère végétatif et de la zone marginale. Barre d'échelle : 100 µm. (PA : pôle animal ; PV : pôle végétatif ; V : ventral ; D : dorsal).

## **6. XSTAT3 interagit directement avec XDSCR6 et XEZH2 via son domaine carboxy-terminal**

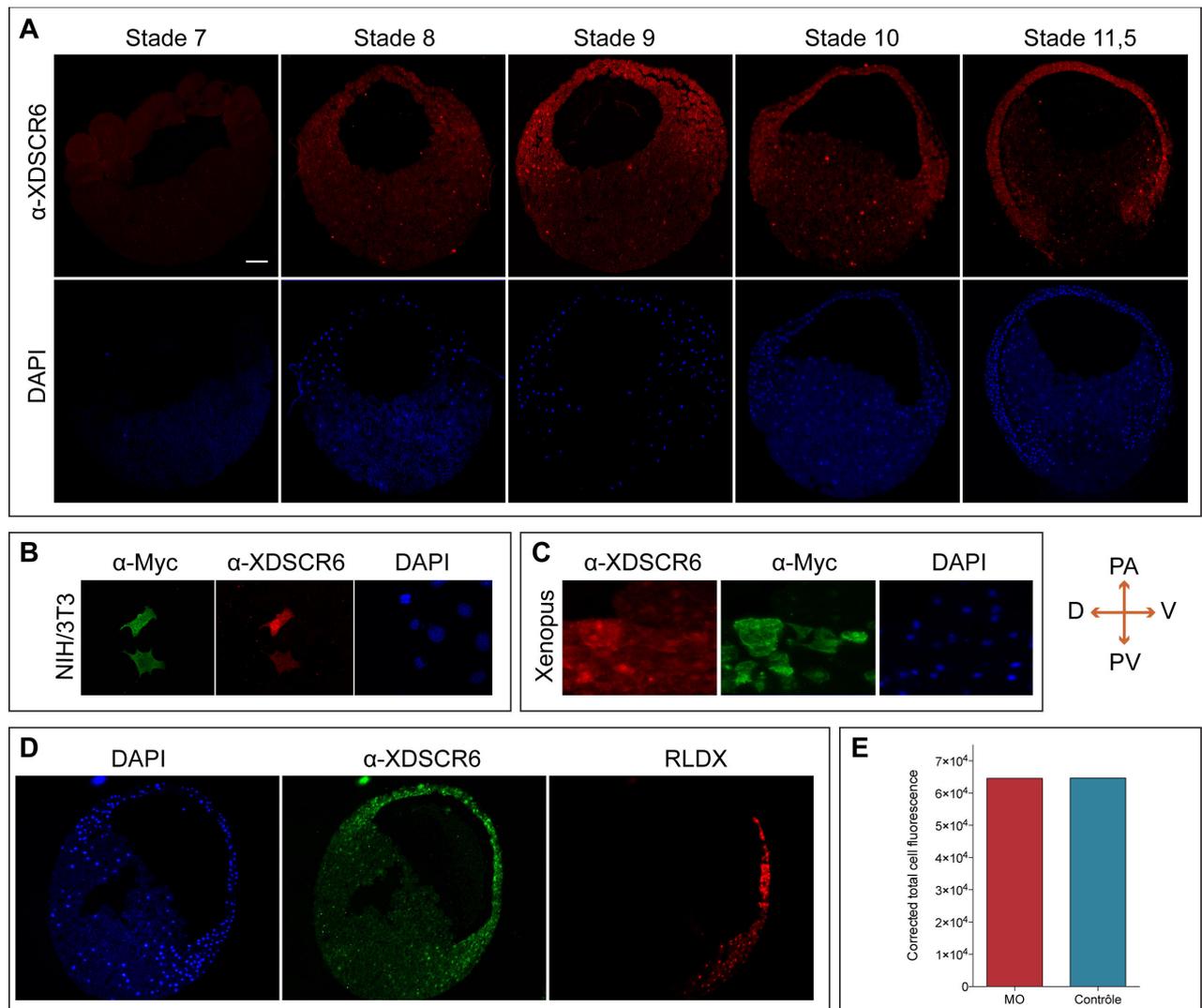
Un de nos objectifs était de confirmer l'interaction physique de XDSCR6 avec XSTAT3 et de caractériser le domaine permettant cette interaction. Nos résultats ont montré que XSTAT3, XDSCR6 et XEZH2 endogènes interagissent dans l'embryon au cours de la gastrulation. De plus, nos résultats ont montré que XDSCR6 et aussi XEZH2 interagissent directement avec XSTAT3 par la région carboxy-terminale de XSTAT3 contenant les domaines SH2 et TAD. Ce domaine SH2 est fondamental pour la phosphorylation, pour la dimérisation et pour l'activité transcriptionnelle des protéines STAT. Le domaine SH2 est privilégié pour l'interaction avec d'autres protéines, comme c'est le cas des kinases JAKs.

Nous avons également cherché à savoir si cette interaction pouvait avoir lieu avant la gastrulation, au stade 7 par exemple, au moment où STAT3 n'est pas encore activée ni transcriptionnellement active. Nos données de GST-pull down ont montré une interaction au stade 7 et au stade 11,5 (figure 40). Ces résultats suggèrent qu'indépendamment de l'activité de XSTAT3, XDSCR6 et XEZH2 sont capables d'interagir avec cette protéine. Ainsi, l'interaction de XSTAT3 avec ses deux partenaires n'est pas dépendante de son état de phosphorylation sur la tyrosine 705, ni de son activité transcriptionnelle. De plus, comme j'ai décrit précédemment, au stade 7 la protéine XSTAT3 ne semble pas être méthylée sur les résidus lysine. Ainsi, cette interaction ne semble pas non plus être dépendante de la méthylation de STAT3 sur les résidus lysine.

## **7. XEZH2 et XSTAT3 sont présentes dans les mêmes feuillets embryonnaires**

Le profil d'expression spatio-temporel de XSTAT3 a montré que cette protéine endogène est présente dans le cytoplasme et dans les noyaux des trois feuillets embryonnaires au cours de la gastrulation.

En ce qui concerne XEZH2, j'ai montré par Western Blot que cette protéine est détectée de manière constante tout le long du développement, dès le début de la segmentation jusqu'à l'organogenèse (figure 41A), comme XSTAT3. J'ai confirmé ces résultats par immunodétection. De plus, j'ai montré que XEZH2 est présente dans les trois



**Figure 42 – Profil d'expression spatio-temporel de la protéine XDSCR6 endogène et spécificité de l'anticorps anti-XDSCR6.** **(A)** Des expériences d'immunodétection sur des coupes d'embryons au stade 7, 8, 9, 10 et 11 en utilisant l'anticorps anti-XDSCR6. **(B)** Expériences d'immunodétection sur des cellules NIH/3T3 transfectées avec le plasmide codant pour 6-Myc-XDSCR6. **(C)** Expériences d'immunodétection sur des coupes d'embryons injectés avec l'ARNm de 6-myc-Xdscr6. Les anticorps anti-Myc et anti-XDSCR6 ont été utilisés en B et en C. **(D)** Expériences d'immunodétection sur des embryons injectés avec le Morpholino-Xdscr6 (MO). Le signal RLDX montre la région injectée. **(E)** Quantification de l'intensité de la fluorescence détectée sur le côté injecté (MO) et du côté non injecté (Contrôle) (p-value = 0,78). Barre d'échelle : 100  $\mu$ m. (PA : pôle animal ; PV : pôle végétatif ; V : ventral ; D : dorsal).

feuillet embryonnaire du stade 7 au stade 12. En ce qui concerne la forme phosphorylée sur le résidu S21, elle n'est détectée qu'à partir de la fin de la segmentation et au cours de la gastrulation (figure 41B). Cette cinétique d'activation correspond à celle observée pour XSTAT3. Ceci renforce l'hypothèse dans laquelle EZH2 devrait être spécifiquement phosphorylée sur le résidu S21 pour méthyle STAT3 et stimuler ainsi son activité transcriptionnelle.

J'ai également dressé le profil spatio-temporel de la protéine XDSCR6. Dans le commerce, il n'y a pas d'anticorps conçu pour reconnaître cette protéine chez l'amphibien. Dans un premier temps, nous avons testé un anticorps commercial conçu pour reconnaître la protéine humaine. Malgré tous mes essais sur les coupes d'embryons, nous n'avons pas pu détecter de signal endogène spécifique pour XDSCR6. Ces résultats étaient relativement prévisibles dans la mesure où il y a très peu d'homologie pour ces protéines entre ces deux espèces. Pour cette raison, nous avons fait produire un anticorps anti-XDSCR6 spécifique de la protéine chez le xénope. J'ai mis au point tous les protocoles et j'ai pu montrer que cet anticorps détecte cette protéine en immunoprécipitation. Malheureusement, malgré tous mes essais, cet anticorps ne semble pas fonctionner en Western Blot. En revanche, en immunodétection, cet anticorps semble détecter la protéine. Comme nous pouvons voir dans la figure 42A, au stade 7 XDSCR6 ne semble pas être présente dans l'embryon. Elle ne serait détectée qu'à partir de la fin de la segmentation jusqu'à la gastrulation dans les trois feuillet embryonnaires. D'après mes résultats, XDSCR6 aurait une localisation cytoplasmique et nucléaire. Pour confirmer la spécificité de ce signal, j'ai transfecté des cellules fibroblastiques embryonnaires de souris, NIH/3T3, avec le plasmide 6myc-XDSCR6 et j'ai réalisé des expériences d'immunodétection. Dans les cellules transfectées, notre anticorps détecte XDSCR6, tandis que dans les cellules non transfectées, le signal est négatif (figure 42B). De plus, des expériences dans l'embryon de surexpression de 6myc-XDSCR6 suivies d'une double immunodétection anti-XDSCR6 et anti-myc montrent que le signal obtenu avec le marquage anti-XDSCR6 semble être plus important dans les cellules qui surexpriment une version étiquetée avec le polypeptide 6myc-XDSCR6 (figure 42C). Le dernier contrôle de spécificité était l'injection du morpholino ciblant Xdscr6. Nous avons analysé le signal anti-XDSCR6 en immunodétection sur les cellules injectées et nous n'avons pas observé de différence avec les cellules non injectées (figure 42D et E). L'ensemble de ces observations suggère qu'effectivement cet anticorps serait capable de détecter la protéine XDSCR6 endogène, mais nous ne



pouvons pas être sûrs qu'il détecte uniquement cette protéine. Pour cette raison, nous n'avons pas inclus ces résultats dans la publication en préparation.

## **8. La modulation de l'activité méthyltransférase d'EZH2 influence la mise en place des axes embryonnaires**

Les résultats présentés et discutés ci-dessus montrent que la régulation de la méthylation de XSTAT3 et plus particulièrement du résidu K49 méthylé par EZH2 pourrait être impliquée dans la mise en place des axes. Nous nous sommes donc intéressés à la fonction de cette méthyltransférase dans ces processus.

Nous avons utilisé un mutant ponctuel, EZH2-H694L, dans lequel EZH2 est totalement dépourvu de ses propriétés de méthyltransférase. Nous avons montré que la perte de fonction de XEZH2 dans la région ventrale de l'embryon induit aussi la formation d'un axe surnuméraire. Ceci suggère que la régulation de la fonction méthyltransférase d'EZH2 est importante pour la mise en place des axes.

## **9. XSTAT3 requiert l'activité de la méthyltransférase EZH2 pour être méthylée et transcriptionnellement active**

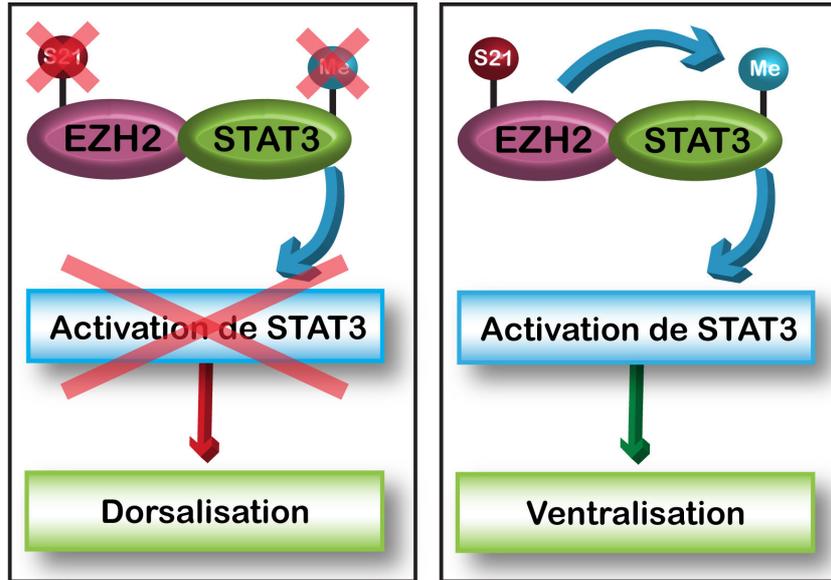
Nos résultats ont montré que la surexpression du mutant EZH2-H694L conduit à la diminution de l'activité transcriptionnelle de XSTAT3. Ensuite nous nous sommes intéressées à comprendre comment XEZH2 est capable de réguler positivement cette activité de XSTAT3. Nous avons montré que ce mécanisme ne met pas en jeu la phosphorylation ni la dimérisation de XSTAT3, car la surexpression de EZH2-H694L ne change ni l'expression de XSTAT3 ou de XSTAT3-Y705, ni leurs localisations subcellulaires. En revanche, la surexpression de ce mutant diminue la méthylation de XSTAT3 sur ses résidus lysine. Nous avons ainsi proposé un mécanisme par lequel XSTAT3 nécessite l'activité méthyltransférase de XEZH2 pour être méthylée et transcriptionnellement active. Comme nous avons vu dans l'introduction, un mécanisme similaire a déjà été observé et décrit dans les cellules humaines cancéreuses du côlon ou des glioblastomes. Dans ces lignées, il a été montré qu'en fonction la méthyltransférase qui méthyle STAT3, l'activité de cette protéine pourrait être soit inhibée soit activée. Par



exemple, la méthyltransférase SET9 méthyle STAT3 sur le résidu K140 dans le noyau, une fois que STAT3 fixée sur le promoteur de ses gènes cibles. Cette méthylation rend STAT3 inactive (Yang et al., 2010). En revanche, lorsque STAT3 est méthylée par EZH2 sur les résidus K49 et K180, ce facteur de transcription sera actif. La méthylation du résidu K49 a lieu après la phosphorylation sur le résidu Y705, la dimérisation et l'entrée de STAT3 dans le noyau (Dasgupta et al., 2015), tandis que la méthylation sur le résidu K180 se produit dans le cytoplasme avant la phosphorylation de STAT3 (revoir figure 35) (Kim et al., 2013). A l'heure actuelle, nous ne disposons pas des outils nécessaires pour établir le profil spatial de STAT3 méthylée sur les résidus lysine chez l'amphibien. En effet, les anticorps qui permettent de détecter chaque résidu lysine méthylé ne sont pas commercialisés. Cependant il serait tout de même intéressant de vérifier si chez l'amphibien XSTAT3 est méthylée dans le noyau ou dans le cytoplasme et avant ou après la phosphorylation. Le fait que STAT3 soit éventuellement méthylée au moment où cette protéine devient phosphorylée et active, pourrait suggérer que STAT3 requiert peut-être la phosphorylation pour être méthylée, mais cela ce n'est qu'une corrélation, nous ne pouvons rien conclure.

## **10. La modulation de la phosphorylation sur le résidu S21 d'EZH2 modifie la mise en place des axes embryonnaires**

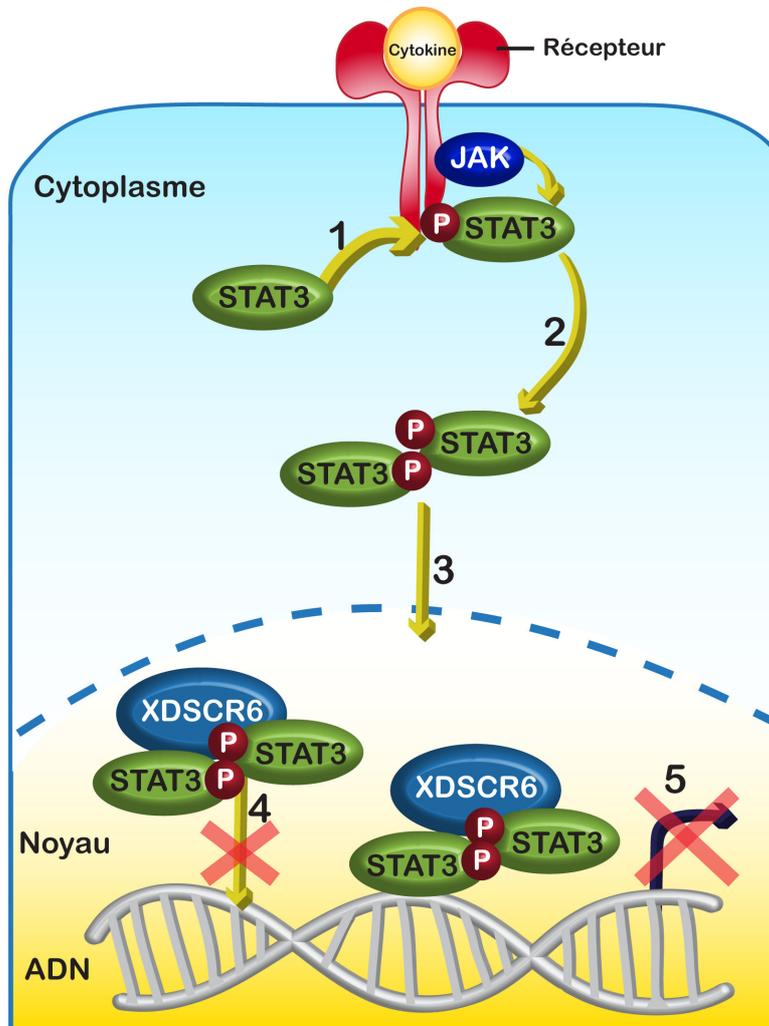
Dans les cellules des mammifères, il a été montré que la méthyltransférase EZH2 méthyle non seulement l'histone H3K27, mais également des facteurs de transcription comme STAT3 ou GATA4 (GATA Binding Protein 4). Comme nous avons vu, la méthylation de H3K27 conduit à la répression de la transcription de certains gènes. En ce qui concerne les facteurs de transcription, des expériences réalisées dans le cœur fœtal de souris ont montré que EZH2 interagit et méthyle directement GATA4 pour inhiber son activité transcriptionnelle (He et al., 2012). A l'inverse, la méthylation d'EZH2 sur STAT3 a plutôt un rôle positif sur son activité transcriptionnelle (Dasgupta et al., 2015; Kim et al., 2013; Yang et al., 2010). Les travaux de Kim et de ses collaborateurs, en 2013, ont montré que EZH2 doit être spécifiquement phosphorylée sur le résidu S21 pour pouvoir méthyle précisément STAT3 sur ses résidus lysine, et permettre ainsi son activation. De plus, lorsque EZH2 est phosphorylée sur S21, la méthylation de l'H3K27 diminue. Ces travaux ont démontré une double fonction d'EZH2 : elle peut méthyle



**Figure 43 – Modèle explicatif pour les propriétés ventralisantes de XSTAT3 régulées par la méthylation de XEZH2.** Modèle proposé fondé sur les hypothèses sur la régulation par XEZH2 de l'activité de XSTAT3. **(A gauche)** En absence de phosphorylation sur S21 (par la surexpression de *Ezh2-s21a*), EZH2 ne serait pas capable de méthyler STAT3 sur les résidus lysine et par conséquent cette protéine sera inactive. Dans ce cas les embryons seront dorsalisés. **(A droite)** Dans le cas où la phosphorylation de S21 est mimée (par la surexpression de *Ezh2-s21d*), EZH2 pourrait méthyler STAT3 sur les résidus lysine et par conséquent cette protéine sera active. Les embryons seront alors ventralisés. (S21 : résidu sérine 21 ; Me : Méthylation)

H3K27 et dans ce cas la transcription de certains gènes cibles est inhibée ; ou alors elle peut méthyler STAT3 ce qui permet son activation. Ainsi, ce résidu S21 permet de cibler spécifiquement la voie dans laquelle EZH2 méthyle exclusivement le facteur de transcription STAT3.

Nos travaux ont montré que la surexpression du mutant perte de fonction sur le résidu S21 d'EZH2, EZH2-S21A, dans la région ventrale de l'embryon conduit à la formation d'un axe surnuméraire. En revanche, la surexpression de la forme constitutivement active d'EZH2 sur ce résidu, EZH2-S21D, conduit à la formation d'embryons avec des problèmes antérieurs. Ces résultats suggèrent que la régulation de la phosphorylation d'EZH2 sur le résidu S21 peut avoir une influence dans la mise en place des axes embryonnaires. Nous n'avons pas encore testé l'effet de ces mutations ponctuelles du résidu S21 sur la régulation de la méthylation de XSTAT3 dans les embryons de xénope. Dans les cellules de glioblastomes, il a été montré que la surexpression d'EZH2-S21A diminue la méthylation de STAT3 sur les résidus lysines, alors que la surexpression d'EZH2-S21D l'augmente. Des expériences supplémentaires sont ainsi requises afin de vérifier si dans les embryons d'amphibien ces effets sur la méthylation de XSTAT3 sont conservés. Nous pourrions surexprimer dans l'embryon l'ARNm codant pour ces deux formes mutantes et réaliser ensuite des expériences d'immunoprécipitation. Dans le cas où les résultats de ces expériences sont en accord avec ceux publiés, ceci nous permettra de suggérer que quand EZH2 n'est pas phosphorylée, STAT3 ne pourrait pas être méthylée sur certains résidus lysine essentiels pour son activité et par conséquent cette protéine ne serait pas activée. Dans ce cas, les embryons seront dorsalisés. A l'inverse, lorsque on mime la phosphorylation d'EZH2, STAT3 serait méthylée, donc par conséquent elle sera transcriptionnellement active. L'activation de XSTAT3 pourrait entraîner la ventralisation des embryons (figure 43). Pour renforcer ces résultats, nous pourrions réaliser des expériences de RT-qPCR et vérifier les conséquences de cette activation ou inhibition d'EZH2 sur les gènes marqueurs du mésoderme dorsal/ventral. Ces résultats apporteront ainsi plus d'informations sur la régulation de STAT3 et EZH2 au cours du développement embryonnaire. En effet, ils pourront suggérer que l'activité méthyltransférase de XEZH2 pourrait contribuer aux propriétés ventralisantes de XSTAT3.



**Figure 44 – Représentation schématique pour expliquer les hypothèses concernant le mécanisme d'inhibition de XDSCR6 sur l'activité de XSTAT3.** La surexpression de *Xdscr6* n'empêche pas XSTAT3 d'être phosphorylée sur la tyrosine 705 (1), de former un dimère (2) ni de rentrer dans le noyau (3). XDSCR6 pourrait empêcher STAT3 de se lier à l'ADN (4). XDSCR6 pourrait réguler négativement le recrutement des cofacteurs qui permettent d'activer la transcription (5). (P : phosphorylation)

## **11. XDSCR6 inhibe l'activité transcriptionnelle de STAT3 en interférant avec son état de méthylation**

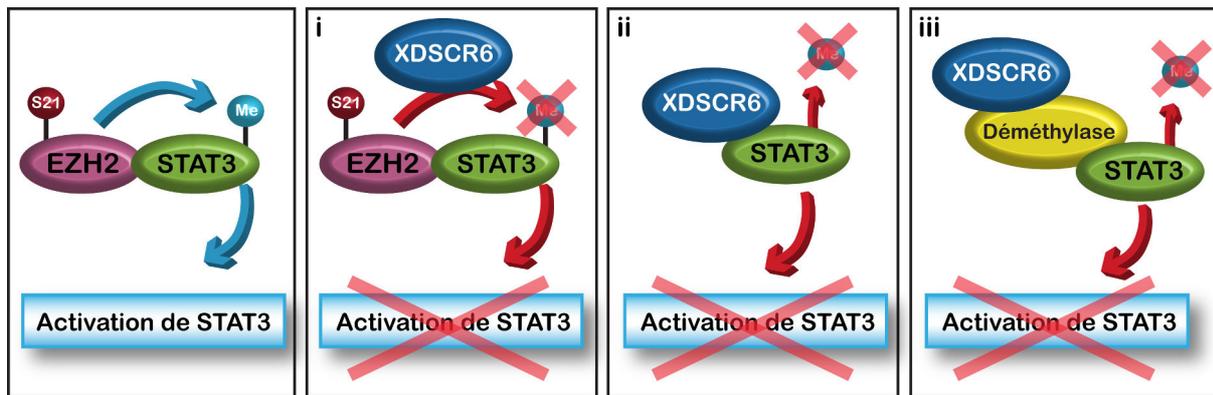
Nous avons montré que XSTAT3 et XDSCR6 interagissent directement. De plus, nos analyses phénotypiques suggèrent l'existence d'un antagonisme fonctionnel entre ces deux protéines. Nous avons ensuite étudié le mécanisme de régulation XDSCR6 et XSTAT3. Par des essais luciférase, nous avons montré que la surexpression de *Xdscr6* inhibe l'activité transcriptionnelle endogène de XSTAT3 au cours de la gastrulation, ce qui suggère que XDSCR6 serait un inhibiteur de ce facteur de transcription. Ensuite, nous nous sommes intéressés à comprendre comment XDSCR6 est capable d'inhiber cette activité. Nous avons montré que XDSCR6 ne joue pas un rôle sur la cinétique d'expression de XSTAT3 ni sur sa phosphorylation sur la tyrosine 705. De plus, XDSCR6 ne joue aucun rôle sur la localisation subcellulaire de XSTAT3 et de sa forme activée XSTAT3-Y705. En revanche, la surexpression de *Xdscr6* induit la diminution de la méthylation de XSTAT3 sur les résidus lysine. Ces données nous permettent d'émettre plusieurs hypothèses pour comprendre l'influence de XDSCR6 sur STAT3 :

- 1) XDSCR6 pourrait empêcher la formation de dimères de STAT3 ;
- 2) XDSCR6 pourrait modifier la localisation subcellulaire du dimère STAT3, en empêchant sa translocation dans le noyau ;
- 3) XDSCR6 pourrait réguler négativement la liaison de XSTAT3 à l'ADN ;
- 4) XDSCR6 pourrait jouer un rôle au moment où X STAT3 entre en contact avec des cofacteurs qui lui permettent d'activer la transcription.

Il est admis que STAT3 phosphorylée sur la tyrosine 705 ne peut être localisée dans le noyau que sous forme de dimère, en effet, cette phosphorylation est liée à la dimérisation qui est un prérequis à l'import nucléaire (Harrison, 2012). Nous avons montré par immunohistochimie que le marquage nucléaire XSTAT3-Y705 n'est pas modifié dans des cellules qui surexpriment XDSCR6. Ces résultats nous suggèrent donc que nos deux premières hypothèses sont peu probables. De plus, nos résultats d'immunodétection suggèrent que XDSCR6 serait présente dans le noyau. Ainsi, l'inhibition de XDSCR6 sur XSTAT3 aurait lieu probablement dans le noyau (figure 44).



Il serait intéressant d'analyser l'activité transcriptionnelle de XSTAT3 sur un de ses gènes cibles endogènes et tester si XDSCR6 régule cette activité transcriptionnelle en modulant la capacité de XSTAT3 à induire l'expression de ses gènes cibles. Si les expériences proposées ci-dessus nous permettent d'identifier des gènes cibles endogènes de XSTAT3, nous pourrions utiliser une construction où le(s) promoteur(s) de *Xoct91*, *Socs-3* ou *ventx1/2* sera cloné en amont du gène rapporteur luciférase. D'une part, nous pourrions alors tester si XSTAT3 module l'expression de *Xoct91* chez l'amphibien et d'autre part, nous pourrions co-injecter les embryons avec cette construction et avec l'ARNm *Xdscr6*, afin de voir si XDSCR6 est capable d'interférer avec l'activité de XSTAT3 au niveau de ce(s) promoteur(s). Afin de tester si XDSCR6 régule négativement le recrutement de XSTAT3 à l'ADN au niveau de ces promoteurs, des expériences d'immunoprécipitation chromatinienne sont également possibles. Elles seraient menées : i) sur des embryons contrôles de façon à déterminer si XSTAT3 est effectivement capable de lier le promoteur de *Xoct91* et de *Ventx1/2* ; ii) sur des embryons surexprimant XDSCR6 dans la région de la calotte animale pour voir si le recrutement de XSTAT3 à l'ADN a été perturbé. Cette expérience nous permettra de savoir si XDSCR6 interfère avec la liaison de XSTAT3 à l'ADN sur ses gènes cibles endogènes. Une autre expérience possible pour tester cette hypothèse est la réalisation d'un retard sur gel (EMSA) à partir d'extraits embryonnaires avec des oligonucléotides contenant les sites de liaison pour XSTAT3 et les anticorps anti-STAT3 et anti-XDSCR6. Dans un premier temps la liaison de XSTAT3 sur ces oligonucléotides sera détectée, ce qui entraîne un retard sur gel. Ensuite nous rajouterons l'anticorps anti-STAT3 et nous regarderons si nous avons un retard plus important sur le gel («supershift»). Enfin, nous rajouterons l'anticorps anti-XDSCR6 et nous regarderons si nous avons un deuxième supershift ou pas. Dans le cas où le supershift est détecté, cela voudrait dire qu'il y a la formation d'un complexe XSTAT3-XDSCR6 à l'ADN. Dans le cas contraire, cela signifierait que XDSCR6 n'interfère pas avec XSTAT3 lorsque XSTAT3 est déjà liée à l'ADN.



**Figure 45 – Représentation schématique pour expliquer les trois hypothèses concernant le mécanisme d'inhibition de XDSCR6 sur la méthylation de XSTAT3.** Dans les conditions normales, EZH2 phosphorylée sur le résidu S21 est capable de méthyler STAT3 sur les résidus lysine et par conséquent d'induire son activation. En présence de XDSCR6, la méthylation et l'activité transcriptionnelle de XSTAT3 diminuent. Trois scénarios sont envisageables pour expliquer cet antagonisme : i) XDSCR6 agit sur XEZH2, soit en interagissant directement avec XEZH2, soit en interférant avec un modulateur de XEZH2, ce qui l'empêcherait de méthyler XSTAT3 ; ii) XDSCR6 agit comme une déméthylase et déméthyle XSTAT3 ; iii) XDSCR6 interagit avec une déméthylase et qui à son tour va déméthyle XSTAT3. (S21 : résidu sérine 21 ; Me : Méthylation)

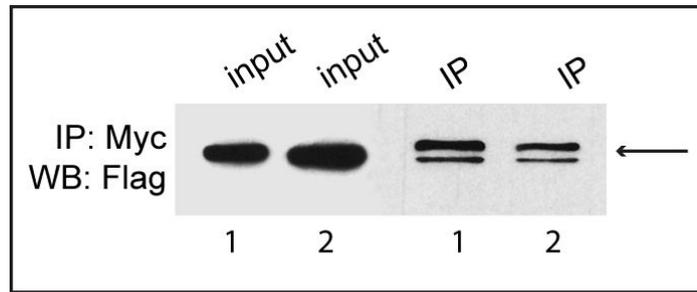
## 12. **XDSCR6 régule négativement l'activité de XEZH2 et de XSTAT3**

Nos travaux ont montré que XDSCR6 régule négativement l'activité transcriptionnelle de XSTAT3 en interférant avec sa méthylation sur les résidus lysine. Nous avons également montré que XEZH2 est requis pour la méthylation et pour l'activité transcriptionnelle de XSTAT3. Une question importante se pose : comment XDSCR6 est capable de réguler négativement l'activité de XSTAT3 ? Nous pouvons imaginer trois scénarios (figure 45) :

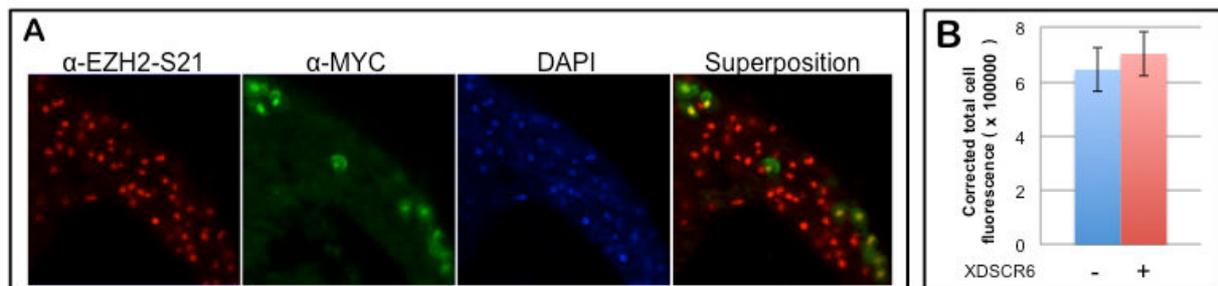
- i) XDSCR6 interfère avec l'activité de XEZH2 et par conséquent l'activité de XSTAT3 est diminuée ;
- ii) XDSCR6 agit comme une déméthylase et déméthyle XSTAT3 ;
- iii) XDSCR6 interagit et active une déméthylase, qui à son tour déméthyle XSTAT3 ;

Les travaux de l'équipe ont montré que l'activité répressive de XEZH2 est inhibée par XDSCR6. Dans ce cas, c'est l'activité de la modification des histones médiée par XEZH2 qui est ciblée. XDSCR6 interfère négativement avec la formation des polycomb bodies, décroche les PcG de la chromatine et permet de lever ainsi la répression sur certains gènes. Ceci a été montré *in vivo* notamment sur le gène mésodermique dorsal *Goosecoïd* (Li et al., 2013).

Nous pouvons ainsi imaginer que XDSCR6 serait capable d'inhiber l'activité de XSTAT3 en interférant avec l'activité de XEZH2. Afin de confirmer cette hypothèse, nous sommes en train de réaliser des expériences de co-injection en utilisant les ARNm codant pour *Xdscr6* et *Ezh2-s21d*. Comme je vous ai décrit dans ce manuscrit, la surexpression de *Ezh2-s21d* dans la région dorsale induit la formation d'embryons avec des problèmes antérieurs. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ce mutant phosphomimétique soit capable de méthyle STAT3 et d'activer ce facteur de transcription. Comme nous avons proposé, l'activation de XSTAT3 conduit à la ventralisation des embryons. Compte tenu du fait que XDSCR6 présente des propriétés dorsalisantes, nous pouvons imaginer que la co-injection des deux ARNm (*Ezh2-s21d* et *Xdscr6*) pourrait restaurer le phénotype induit par *Ezh2-s21d* et conduire à la formation d'embryons normaux. Nous avons d'autres éléments qui renforcent cette hypothèse. Les travaux de l'équipe ont montré que le motif WRPW de XDSCR6 est nécessaire à l'interaction avec XEZH2 et est suffisant pour induire les propriétés dorsalisantes de



**Figure 46 – XDSCR6m interagit avec XSTAT3.** Des expériences de co-immunoprécipitation réalisées sur des embryons au stade gastrula co-injectés avec *6myc-Xdscr6* et *Xstat3-Flag* (1) ou avec *6-myc-XDSCR6m* et *Xstat3-flag* (2). Ces expériences ont été suivies d'un Western blot en utilisant l'anticorps anti-FLAG, permettant ainsi de détecter STAT3-FLAG (flèche). Dans le mutant XDSCR6m, le motif WRPW est muté sur deux acides aminés – WRS~~G~~. XSTAT3 est capable d'interagir avec XDSCR6 même si le motif WRPW est muté.



**Figure 47 – La surexpression de XDSCR6 ne diminue pas la phosphorylation de XEZH2 sur le résidu S21.** (A) Des expériences d'immunodétection réalisées à partir de coupes d'embryons au stade 10,5 préalablement injectés avec l'ARNm de *Xdscr6-myc*. Le marquage α-EZH2-S21 montre que XEZH2 est phosphorylée sur le résidu S21 dans les noyaux au stade gastrula. (B) Quantification de l'intensité de la fluorescence détectée sur les noyaux des cellules négatives (-) ou positives (+) pour XDSCR6-Myc. La surexpression de *Xdscr6-myc* ne change pas la localisation ni la quantité de XEZH2 phosphorylée sur le résidu S21 (p-value = 0,28).

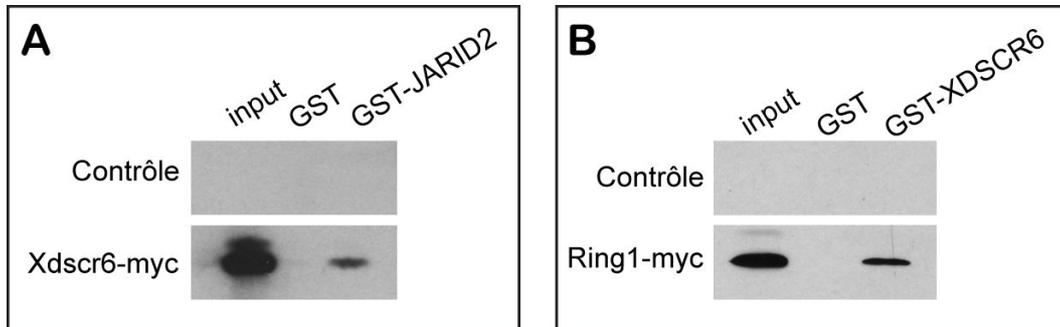
XDSCR6. Nos travaux ont montré que le mutant de XDSCR6 (XDSCR6m dans lequel le motif WRPW est muté) interagit avec XSTAT3 (figure 46), ce qui suggère que le motif WRPW n'est pas nécessaire à cette interaction. Ainsi, ces résultats suggèrent que le motif WRPW est requis pour l'interaction avec XEZH2, mais pas avec XSTAT3. En revanche, par des essais luciférase, l'utilisation du mutant XDSCR6m a montré que ce motif est requis pour les propriétés antagonistes de XDSCR6 sur l'activité transcriptionnelle de XSTAT3. L'ensemble de ces résultats suggère que XDSCR6 pourrait peut-être inhiber l'activité de XSTAT3, en interférant négativement avec le processus de méthylation de XSTAT3 par XEZH2.

Il nous reste à découvrir comment XDSCR6 inhibe l'activité de XEZH2. Nos travaux ont montré que la surexpression de XDSCR6 ne modifie pas la quantité d'expression de XEZH2-S21 dans les embryons, comme nous pouvons voir dans la figure 47.

L'hypothèse qui envisage le fait que XDSCR6 puisse agir comme une déméthylase est fort peu probable. En effet, dans cette protéine (123 acides aminés) aucun domaine fonctionnel qui puisse être relié à une activité déméthylase n'est présent.

Il nous reste analyser la dernière hypothèse dans laquelle XDSCR6 pourrait recruter une déméthylase qui agirait sur la méthylation de XSTAT3. Il a déjà été montré que le résidu K140 de STAT3 peut être déméthylé par LSD1 dans des cellules humaines, ce qui permet l'activation de STAT3 (Yang et al., 2010). Chez le xénope, ce mécanisme n'a jamais été décrit. En revanche, il a été montré que l'homologue de cette déméthylase est présente dans le génome de *Xenopus laevis* et qu'elle est capable de déméthyliser les résidus lysine de l'histone H3, comme chez les mammifères (Chen et al., 2007). Il serait donc intéressant dans un premier temps, de vérifier si cette déméthylase est capable d'enlever la méthylation de STAT3 sur les résidus lysine. Pour cela nous pouvons surexprimer dans les embryons l'ARNm codant pour LSD1 et ensuite réaliser des expériences d'immunoprécipitation (en utilisant les anticorps anti-pan-methyl-lysine et anti-XSTAT3) à partir des extraits des embryons injectés. Par ailleurs, il serait intéressant de vérifier si XDSCR6 est capable d'interagir biochimiquement avec la déméthylase LSD1. En revanche, dans les cellules humaines, cette déméthylation de STAT3 induit l'activation de cette protéine. Si ce même mécanisme est conservé chez le xénope, cela n'expliquerait pas le rôle d'antagoniste de XDSCR6 sur XSTAT3.

Notre équipe avait recherché les partenaires de XDSCR6, par un crible de double-hybride. Ce crible avait permis d'isoler XEZH2 comme partenaire de XDSCR6 mais aussi



**Figure 48 – XDSCR6 interagit avec JARID2 et RING1.** Des expériences GST-pull down suivies d'un Western Blot anti-myc. **(A)** Les expériences de GST-pull down ont été réalisées à partir d'embryons non injectés (contrôle) ou préalablement injectés avec *6myc-Xdscr6*. Aucun signal n'est détecté pour les embryons contrôle. En revanche, XDSCR6-MYC est retenu spécifiquement par la matrice GST-JARID2, montrant qu'il y a une interaction entre XDSCR6 et GST-JARID2. **(B)** Aucun signal n'est détecté pour les embryons contrôle (non injectés). Les extraits protéiques des embryons injectés avec l'ARNm de *Ring1-myc* sont retenus spécifiquement par la matrice GST-XDSCR6 montrant ainsi une interaction entre RING1 et GST-XDSCR6.

les protéines JARID2, RING1 et SETDB1. Les interactions entre XDSCR6 avec EZH2, JARID2 ou RING1 ont été confirmées par des expériences de GST-pull down ou de co-immunoprécipitation (figure 48).

JARID2 appartient à la famille *Jumonji*. Cependant, au contraire des autres membres de cette famille, Jarid2 n'a pas d'activité déméthylase. Il a été montré que cette protéine module l'activité de PRC2. En effet, les auteurs ont proposé que JARID2 serait d'abord méthylée par PRC2 pour ensuite participer au dépôt de la marque H3K27me3 au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires (Sanulli et al., 2015). Au cours du développement embryonnaire du xénope, des expériences d'injection d'un morpholino spécifique de Jarid2 ont montré que cette protéine est nécessaire à l'activation des gènes clés de la gastrulation, comme *Xwnt8a*, *Xbra* et *Xnot*. De plus, la déplétion de Jarid2 conduit aussi à des défauts de différenciation, ce qui suggère que cette protéine serait importante pour la transition de l'état pluripotent à l'état différencié des cellules (Peng et al., 2009).

Nous pourrions donc émettre l'hypothèse d'un mécanisme dans lequel XDSCR6 interagirait avec JARID2 pour moduler l'activité enzymatique de XEZH2 et par conséquent l'activité de XSTAT3. Des expériences sont ainsi envisageables afin d'évaluer la contribution de JARID2 dans la régulation de XDSCR6 sur XSTAT3. Dans un premier temps, des expériences de co-immunoprécipitation pourront être réalisées afin de vérifier si au cours du développement embryonnaire les protéines XDSCR6, XEZH2 et JARID2 interagissent. Des expériences de GST-pull down *in vitro* pourront être réalisées également afin de vérifier si ces interactions sont directes. Par ailleurs, des études fonctionnelles pourront être analysées. Pour cela, nous pourrions surexprimer l'ARNm de *Jarid2* dans l'embryon et réaliser des expériences d'immunoprécipitation afin de vérifier si la méthylation de STAT3 sur les résidus lysine est modifiée. Ces expériences permettraient d'évaluer la contribution de XDSCR6 et JARID2 sur la régulation de l'activité de XEZH2 et XSTAT3.

Il serait également intéressant de réaliser le même type d'expériences avec les partenaires RING1 et SETDB1. Nous avons vu que Ring1 est un membre du groupe PRC1 et ubiquitine l'histone H2A119. Chez le xénope, il n'y a pas beaucoup d'études concernant le rôle de cette protéine au cours du développement. Il existe une seule étude qui suggère que la suppression de Ring1 au stade 1 ou 2 cellules, n'aurait pas d'effets sur le développement (Satijn et al., 2001). SETDB1 (Set Domain Bifurcated 1) est une méthyltransférase qui triméthyle l'histone H3K9. Chez l'humain, cette modification

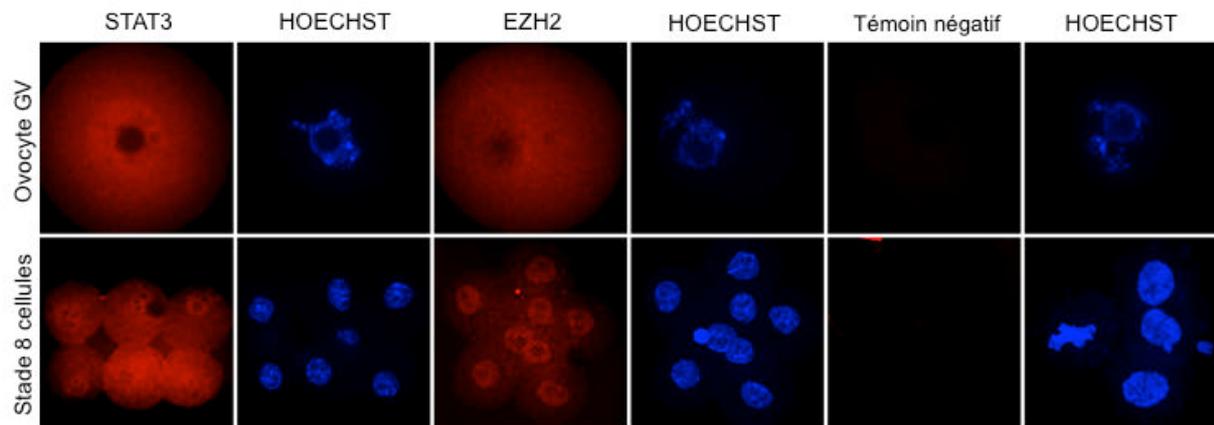


conduit à l'extinction de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs. Chez le xénope, aucune étude n'a été menée sur cette méthyltransférase. Avant de faire les expériences décrites ci-dessus, il faudra d'abord vérifier l'expression de Ring1 et SETDB1 dans les embryons précoces. Nous avons déjà confirmé l'interaction avec Ring1 et XDSCR6. Si nous retrouvons également une interaction biochimique et fonctionnelle entre XDSCR6 et SETDB1 endogènes au cours de la gastrulation, ceci pourrait suggérer que la protéine XDSCR6 pourrait agir comme un régulateur plus général de l'activité des différentes méthyltransférases dans l'embryon de xénope.

## **B. Est-ce que les fonctions de XDSCR6, XSTAT3 et XEZH2 est conservée au cours du développement embryonnaire des autres vertébrés ?**

Comme je vous ai décrit dans l'introduction, XDSCR6 est également un membre de la famille RIPPLY. Certains homologues de XDSCR6 ont été étudiés, et des KO ont été analysés. Par exemple, les souris Ripply1<sup>-/-</sup> sont viables et fertiles et ne présentent pas de problèmes physiques évidents ni d'anormalités comportementales (Takahashi et al., 2010). En revanche, les homozygotes Ripply2<sup>-/-</sup> meurent juste après la naissance avec des problèmes respiratoires. Au stade E18, ils présentent une queue et un axe du corps raccourcis, et des problèmes de malformations squelettiques, notamment lors de la formation de la colonne vertébrale (Chan et al., 2007). Enfin, les souris Ripply3<sup>-/-</sup> meurent également à la naissance mais avec des problèmes de cyanose. Ces mutants présentent des graves défauts dans le développement des artères et du cœur (Okubo et al., 2011). En revanche, la fonction de DSCR6 au cours du développement embryonnaire précoce de la souris, notamment pendant les stades préimplantatoires, n'a jamais été étudiée.

Nos résultats antérieurs montrent que XDSCR6 régule négativement l'activité de XSTAT3 et XEZH2. Au départ, une partie de mon projet consistait à estimer si ce mécanisme moléculaire observé chez le xénope était conservé chez les mammifères notamment au cours du développement précoce chez la souris. En effet, les profils



**Figure 49 – Immunodétection de STAT3 et EZH2 dans l'ovocyte et l'embryon précoce de souris.** Des expériences d'immunodétection ont été réalisées sur des ovocytes I et des embryons au stade 8-16 cellules. Les anticorps anti-STAT3 et anti-EZH2 détectent les protéines endogènes STAT3 et EZH2 respectivement. Ces protéines sont présentes dans les deux stades analysés. Dans les expériences sur témoin négatif, les anticorps primaires sont absents. HOECHST marquent l'ADN des cellules.

d'expression de STAT3 et EZH2 sont déjà caractérisés chez la souris : ces deux protéines sont présentes et actives au cours des stades précoces et ont un rôle dans le maintien de l'état pluripotent et prolifératif des cellules souches embryonnaires (Do et al., 2013). Tout d'abord, notre objectif était de dresser le profil d'expression de DSCR6 (du stade ovocyte jusqu'au stade blastocyste), qui actuellement est inconnu, et le comparer à ceux de STAT3 et d'EZH2. En collaboration avec Damien Cladière (équipe de Dr. Katja Wassmann : "Division cellulaire et ses points de contrôles", UPMC ; CNRS UMR 7622) et Jane-Lynda Deuve (équipe de Dr. Vincent Galy : « *C. elegans* Hérité et Développement » ; UPMC ; CNRS UMR 7622), nous avons commencé par mettre au point les protocoles nous permettant de visualiser STAT3, EZH2 et DSCR6 par immunodétection dans l'embryon préimplantatoire. Nos premiers résultats ont mis en évidence l'expression de STAT3 et d'EZH2 aux stades ovocyte I et au stade 8 cellules (figure 49) et sont en accord avec les données de la littérature. Malheureusement, par manque de temps, nous n'avons pas pu établir le profil d'expression de DSCR6. D'autres expériences étaient envisagées pour analyser le rôle de DSCR6 au cours du développement embryonnaire de la souris. Par exemple, un de nos objectifs était d'analyser les conséquences de la surexpression de DSCR6 sur l'activité de STAT3 et d'EZH2 et sur l'engagement cellulaire vers un destin particulier par immunodétection dans les embryons préimplantatoires.

## **C. La régulation négative de XDSCR6 sur EZH2 et STAT3 est-elle conservée au cours des processus oncogéniques ?**

Au début de ma thèse, nous avions une troisième partie de mon projet qui envisageait de tester si le rôle antagoniste de XDSCR6 sur EZH2 et STAT3 était conservé au cours des processus oncogéniques. Nous avons initié certaines expériences, mais, faute de temps, je n'ai pas pu continuer ce projet.

EZH2 est connue pour être surexprimée dans plusieurs cancers, tels que les cancers du sein, de la prostate ou encore des glioblastomes (Chase and Cross, 2011). Il a été montré que EZH2 régule positivement l'activité de STAT3 et contribue aux propriétés prolifératives des cellules souches cancéreuses de glioblastome (Kim et al., 2013).



Le facteur de transcription STAT3 régule l'expression de plusieurs gènes cibles y compris les régulateurs du cycle cellulaire, les facteurs angiogéniques et les gènes anti-apoptose, favorisant ainsi la tumorigenèse. De plus, il est impliqué de manière récurrente dans de nombreux cancers chez l'Homme où son activité transcriptionnelle est augmentée, comme les leucémies ainsi que dans des nombreuses tumeurs solides, comme le cancer du poumon, du sein, du rein ou encore de l'ovaire (Carpenter and Lo, 2014).

Le fait que DSCR6 puisse antagoniser les activités de STAT3 et EZH2 dans un contexte embryonnaire soulève la question de vérifier si DSCR6 aurait la même activité dans un contexte pathologique où STAT3 et EZH2 sont dérégulées.

Très peu de choses sont connues actuellement sur une implication potentielle de DSCR6 dans les cancers humains. Des données fragmentaires suggèrent que l'ARNm *Dscr6* est présent au cours du développement foetal essentiellement dans les tissus cérébraux, rénaux et pulmonaires et chez l'adulte dans le foie, le poumon et le rein (Shibuya et al., 2000). Par ailleurs, la base de données COSMIC recense 67 échantillons cancéreux présentant des mutations somatiques de *Dscr6* essentiellement dans des glioblastomes, des carcinomes viscéraux et des mélanomes. Il est à noter que 8 mutations sur les 67 sont localisées dans ou à proximité du motif peptidique WRPW que nous avons montré comme étant crucial pour l'activité de DSCR6 au cours du développement embryonnaire. Dans ce contexte, la mutation de ce motif pourrait entraîner une perte de fonction de DSCR6 vis à vis de son activité antagoniste sur EZH2 et STAT3 et aboutir notamment à une augmentation de l'activité de ces deux protéines.

Il est déjà connu qu'une forme mutante constitutivement active de STAT3 (STAT3C) induit la transformation cellulaire de lignées fibroblastiques, mène à la formation de colonies en milieu semi-solide et à la formation de tumeurs lorsque ces cellules sont greffées dans des souris immunodéficientes (Bromberg et al., 1999). Afin de déterminer si DSCR6 peut influencer l'activité oncogénique de STAT3, nous avons généré des lignées fibroblastiques exprimant de manière stable STAT3-C. Nous avons comme objectifs de comparer la capacité à former des colonies *in vitro* à partir de lignées établies exprimant soit STAT3C soit STAT3C et hDSCR6. Nous avons également prévu de tester l'influence de l'activité de EZH2 dans ce contexte après transfection des formes mutées EZH2-S21A et EZH2-S21D dans ces lignées. L'activité méthyltransférase d'EZH2 aurait pu également être inhibée par l'utilisation d'une drogue spécifique dont nous disposons au laboratoire. Enfin, nous voulions tester ces interactions fonctionnelles *in vivo* par greffes



orthotopiques de ces cellules dans des souris immudéficientes. La croissance tumorale et la survie cellulaire auraient été suivies analysées sur les animaux greffés. L'ensemble de ces expériences devait apporter des éléments de réponse quant à l'implication potentielle de la fonction de DSCR6 chez les mammifères et lors des processus oncogéniques.



## Conclusion générale

Au cours des premières étapes du développement embryonnaire, des mécanismes épigénétiques et des régulations géniques par des facteurs de transcription permettent la formation d'un individu entier. L'étude des gènes impliqués dans l'établissement des feuilletts primordiaux et des axes est essentielle pour comprendre le développement. Nous avons trouvé un gène, qui semble jouer un rôle crucial dans ces activités. Il s'agit du gène *Xdscr6*. Plus particulièrement, l'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit a mis en évidence un mécanisme original de régulation de *XDSCR6* sur l'activité transcriptionnelle de *XSTAT3*. En effet, nous avons montré que *XDSCR6* inhibe cette activité de *XSTAT3* en interférant avec la méthylation de ses résidus lysine. De plus, la méthyltransférase *XEZH2* semble intervenir dans ce mécanisme. J'ai montré l'importance de la bonne régulation des trois protéines dans la mise en place des axes embryonnaires. Nous avons ainsi décrit un mécanisme de régulation génique qui n'a jamais été mise en évidence au cours du développement embryonnaire.

Nos travaux ont suggéré que *XDSCR6* inhibe l'activité de *XSTAT3* et de *XEZH2* chez l'amphibien. La découverte d'un nouvel inhibiteur spécifique de *STAT3* et d'*EZH2*, des protéines dont l'activité est très souvent dérégulée dans les cancers, pourrait être précieuse pour élaborer de nouvelles stratégies anti-tumorales.

# Références bibliographiques

- Agger, K., Christensen, J., Cloos, P.A.C., and Helin, K. (2008). The emerging functions of histone demethylases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 159–168.
- Ahn, K.-J., Jeong, H.K., Choi, H.-S., Ryoo, S.-R., Kim, Y.J., Goo, J.-S., Choi, S.-Y., Han, J.-S., Ha, I., and Song, W.-J. (2006). DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol. Dis.* 22, 463–472.
- Akkers, R.C., van Heeringen, S.J., Jacobi, U.G., Janssen-Megens, E.M., François, K.-J., Stunnenberg, H.G., and Veenstra, G.J.C. (2009). A Hierarchy of H3K4me3 and H3K27me3 Acquisition in Spatial Gene Regulation in *Xenopus* Embryos. *Developmental Cell* 17, 425–434.
- Aldiri, I., and Vetter, M.L. (2009). Characterization of the expression pattern of the PRC2 core subunit Suz12 during embryonic development of *Xenopus laevis*. *Developmental Dynamics* 238, 3185.
- Aldiri, I., Moore, K.B., Hutcheson, D.A., Zhang, J., and Vetter, M.L. (2013). Polycomb repressive complex PRC2 regulates *Xenopus* retina development downstream of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Development* 140, 2867–2878.
- Almeida, A.M., Murakami, Y., Layton, D.M., Hillmen, P., Sellick, G.S., Maeda, Y., Richards, S., Patterson, S., Kotsianidis, I., Mollica, L., et al. (2006). Hypomorphic promoter mutation in PIGM causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Nat. Med.* 12, 846–851.
- Almouzni, G., Khochbin, S., Dimitrov, S., and Wolffe, A.P. (1994). Histone acetylation influences both gene expression and development of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 165, 654–669.
- Aloia, L., Di Stefano, B., and Di Croce, L. (2013). Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. *Development* 140, 2525–2534.
- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Martí, E., Visa, J., Guimerà, J., Oset, M., González, J.R., Flórez, J., Fillat, C., et al. (2001). Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1915–1923.
- Altafaj, X., Ortiz-Abalia, J., Fernández, M., Potier, M.C., Laffaire, J., Andreu, N., Dierssen, M., González-García, C., Ceña, V., Martí, E., et al. (2008). Increased NR2A expression and prolonged decay of NMDA-induced calcium transient in cerebellum of TgDyrk1A mice, a mouse model of Down syndrome. *Neurobiol. Dis.* 32, 377–384.
- Aranda, S., Laguna, A., and de la Luna, S. (2011). DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J.* 25, 449–462.
- Barnett, M.W., Seville, R.A., Nijjar, S., Old, R.W., and Jones, E.A. (2001). *Xenopus* Enhancer of Zeste (XEZ); an anteriorly restricted polycomb gene with a role in neural patterning. *Mechanisms of Development* 102, 157–167.
- Belichenko, N.P., Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Salehi, A., Reeves, R.H., and Mobley, W.C. (2009). The “Down syndrome critical region” is sufficient in the mouse model to confer behavioral, neurophysiological, and synaptic phenotypes characteristic of Down

- syndrome. *J. Neurosci.* 29, 5938–5948.
- 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.
- Brachet, J. (1977). An old enigma: the gray crescent of amphibian eggs. *Curr. Top. Dev. Biol.* 11, 133–186.
- Branchi, I., Bichler, Z., Minghetti, L., Delabar, J.M., Malchiodi-Albedi, F., Gonzalez, M.-C., Chettouh, Z., Nicolini, A., Chabert, C., Smith, D.J., et al. (2004). Transgenic mouse in vivo library of human Down syndrome critical region 1: association between DYRK1A overexpression, brain development abnormalities, and cell cycle protein alteration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 429–440.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., and Darnell, J.E. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295–303.
- Buchwald, G., van der Stoop, P., Weichenrieder, O., Perrakis, A., van Lohuizen, M., and Sixma, T.K. (2006). Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J.* 25, 2465–2474.
- Cabin, D.E., McKee-Johnson, J.W., Matesic, L.E., Wiltshire, T., Rue, E.E., Mjaatvedt, A.E., Huo, Y.K., Korenberg, J.R., and Reeves, R.H. (1998). Physical and comparative mapping of distal mouse chromosome 16. 5 p5. *Genome Res.* 8, 940–950.
- Cao, R., and Zhang, Y. (2004a). SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol. Cell* 15, 57–67.
- Cao, R., and Zhang, Y. (2004b). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 155–164.
- Cao, R., Tsukada, Y.-I., and Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol. Cell* 20, 845–854.
- Carpenter, R.L., and Lo, H.-W. (2014). STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers (Basel)* 6, 897–925.
- Carron, C., and Shi, D.-L. (2016). Specification of anteroposterior axis by combinatorial signaling during *Xenopus* development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5, 150–168.
- Carron, C., Bourdelas, A., Li, H.-Y., Boucaut, J.-C., and Shi, D.-L. (2005). Antagonistic interaction between IGF and Wnt/JNK signaling in convergent extension in *Xenopus* embryo. *Mech. Dev.* 122, 1234–1247.
- Cha, T.-L., Zhou, B.P., Xia, W., Wu, Y., Yang, C.-C., Chen, C.-T., Ping, B., Otte, A.P., and Hung, M.-C. (2005). Akt-Mediated Phosphorylation of EZH2 Suppresses Methylation of Lysine 27 in Histone H3. *Science* 310, 306–310.
- Chan, T., Kondow, A., Hosoya, A., Hitachi, K., Yukita, A., Okabayashi, K., Nakamura, H., Ozawa, H., Kiyonari, H., Michiue, T., et al. (2007). Ripply2 is essential for precise somite formation during mouse early development. *FEBS Lett.* 581, 2691–2696.
- Chase, A., and Cross, N.C.P. (2011). Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin. Cancer Res.* 17, 2613–2618.
- Chen, J.-Y., Lin, J.-R., Tsai, F.-C., and Meyer, T. (2013). Dosage of *Dyrk1a* shifts cells within a p21-

- cyclin D1 signaling map to control the decision to enter the cell cycle. *Mol. Cell* 52, 87–100.
- Chen, W., Obara, M., Ishida, Y., Suzuki, K., and Yoshizato, K. (2007). Characterization of histone lysine-specific demethylase in relation to thyroid hormone-regulated anuran metamorphosis. *Development, Growth & Differentiation* 49, 325–334.
- Cho, K.W., Blumberg, B., Steinbeisser, H., and De Robertis, E.M. (1991). Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. *Cell* 67, 1111–1120.
- Choi, D.K., Suzuki, Y., Yoshimura, S., Togashi, T., Hida, M., Taylor, T.D., Wang, Y., Sugano, S., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). Molecular cloning and characterization of a gene expressed in mouse developing tongue, mDscr5 gene, a homolog of human DSCR5 (Down syndrome Critical Region gene 5). *Mamm. Genome* 12, 347–351.
- Christian, J.L., and Moon, R.T. (1993). Interactions between Xwnt-8 and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of *Xenopus*. *Genes Dev.* 7, 13–28.
- Christian, J.L., Gavin, B.J., McMahon, A.P., and Moon, R.T. (1991). Isolation of cDNAs partially encoding four *Xenopus* Wnt-1/int-1-related proteins and characterization of their transient expression during embryonic development. *Dev. Biol.* 143, 230–234.
- Conlon, F.L., Sedgwick, S.G., Weston, K.M., and Smith, J.C. (1996). Inhibition of Xbra transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of Xbra in dorsal mesoderm. *Development* 122, 2427–2435.
- Cunliffe, V., and Smith, J.C. (1992). Ectopic mesoderm formation in *Xenopus* embryos caused by widespread expression of a Brachyury homologue. *Nature* 358, 427–430.
- Dale, L., and Slack, J.M. (1987). Regional specification within the mesoderm of early embryos of *Xenopus laevis*. *Development* 100, 279–295.
- Dale, L., Smith, J.C., and Slack, J.M. (1985). Mesoderm induction in *Xenopus laevis*: a quantitative study using a cell lineage label and tissue-specific antibodies. *J Embryol Exp Morphol* 89, 289–312.
- Dale, L., Howes, G., Price, B.M., and Smith, J.C. (1992). Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development* 573–585.
- Darribère, T. (2002). *Introduction à la biologie du développement* (Belin).
- Das, I., and Reeves, R.H. (2011). The use of mouse models to understand and improve cognitive deficits in Down syndrome. *Dis Model Mech* 4, 596–606.
- Dasgupta, M., Dermawan, J.K.T., Willard, B., and Stark, G.R. (2015). STAT3-driven transcription depends upon the dimethylation of K49 by EZH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 3985–3990.
- von Dassow, G., Schmidt, J.E., and Kimelman, D. (1993). Induction of the *Xenopus* organizer: expression and regulation of Xnot, a novel FGF and activin-regulated homeo box gene. *Genes Dev.* 7, 355–366.
- Davisson, M.T., Schmidt, C., and Akeson, E.C. (1990). Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* 360, 263–280.
- Delabar, J.M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J.L., Prieur, M., Noel, B., and Sinet,

- P.M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur. J. Hum. Genet.* 1, 114–124.
- Dierssen, M., and de Lagrán, M.M. (2006). DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinase 1A): a gene with dosage effect during development and neurogenesis. *ScientificWorldJournal* 6, 1911–1922.
- Dimri, S., Sukanya, and De, A. (2017). Approaching non-canonical STAT3 signaling to redefine cancer therapeutic strategy. *Integrative Molecular Medicine* 4.
- Do, D.V., Ueda, J., Messerschmidt, D.M., Lorthongpanich, C., Zhou, Y., Feng, B., Guo, G., Lin, P.J., Hossain, M.Z., Zhang, W., et al. (2013). A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes Dev.* 27, 1378–1390.
- Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1997). BMP-4 act as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in xenopus. 2325–2334.
- Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136, 153–179.
- Duncan, S.A., Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J.E. (1997). STAT signaling is active during early mammalian development. *Dev. Dyn.* 208, 190–198.
- Elinson, R.P., and Rowing, B. (1988). A transient array of parallel microtubules in frog eggs: potential tracks for a cytoplasmic rotation that specifies the dorso-ventral axis. *Dev. Biol.* 128, 185–197.
- Erhardt, S., Su, I.-hsi., Schneider, R., Barton, S., Bannister, A.J., Perez-Burgos, L., Jenuwein, T., Kouzarides, T., Tarakhovskiy, A., and Surani, M.A. (2003). Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse. *Development* 130, 4235–4248.
- 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, 5015–5025.
- 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.
- Faust, C., Schumacher, A., Holdener, B., and Magnuson, T. (1995). The eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice. *Development* 121, 273–285.
- Ferrando-Miguel, R., Cheon, M.S., and Lubec, G. (2004). Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down Syndrome brain (Part V): Overexpression of phosphatidylinositol-glycan class P protein (DSCR5). *Amino Acids* 26.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.* 17, 1870–1881.
- Fisher, A.L., Ohsako, S., and Caudy, M. (1996). The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2670–2677.
- Flachsova, M., Sindelka, R., and Kubista, M. (2013). Single blastomere expression profiling of *Xenopus laevis* embryos of 8 to 32-cells reveals developmental asymmetry. *Sci Rep* 3, 2278.

- Fotaki, V., Dierssen, M., Alcántara, S., Martínez, S., Martí, E., Casas, C., Visa, J., Soriano, E., Estivill, X., and Arbonés, M.L. (2002). Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol. Cell Biol.* 22, 6636–6647.
- Francis, N.J., Saurin, A.J., Shao, Z., and Kingston, R.E. (2001). Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Mol. Cell* 8, 545–556.
- Funayama, N., Fagotto, F., McCrea, P., and Gumbiner, B.M. (1995). Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: evidence for intracellular signaling. *J. Cell Biol.* 128, 959–968.
- Gao, Z., Zhang, J., Bonasio, R., Strino, F., Sawai, A., Parisi, F., Kluger, Y., and Reinberg, D. (2012). PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol. Cell* 45, 344–356.
- Gawantka, V., Delius, H., Hirschfeld, K., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1995). Antagonizing the Spemann organizer: role of the homeobox gene *Xvent-1*. *EMBO J.* 14, 6268–6279.
- Gearhart, J.D., Davisson, M.T., and Oster-Granite, M.L. (1986). Autosomal aneuploidy in mice: generation and developmental consequences. *Brain Res. Bull.* 16, 789–801.
- Gilbert, S. F. (1997). *Developmental Biology*. p.
- Gimlich, R.L. (1986). Acquisition of developmental autonomy in the equatorial region of the *Xenopus* embryo. *Dev. Biol.* 115, 340–352.
- Gimlich, R.L., and Gerhart, J.C. (1984). Early cellular interactions promote embryonic axis formation in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 104, 117–130.
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357–362.
- Grey, R.D., Wolf, D.P., and Hedrick, J.L. (1974). Formation and structure of the fertilization envelope in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 36, 44–61.
- Grey, R.D., Bastiani, M.J., Webb, D.J., and Schertel, E.R. (1982). An electrical block is required to prevent polyspermy in eggs fertilized by natural mating of *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* 89, 475–484.
- Guimerá, J., Casas, C., Pucharcòs, C., Solans, A., Domènech, A., Planas, A.M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., and Pritchard, M.A. (1996). A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1305–1310.
- Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 10, 622–640.
- Hämmerle, B., Carnicero, A., Elizalde, C., Ceron, J., Martínez, S., and Tejedor, F.J. (2003). Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2277–2286.
- 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, 483–492.

- Harrison, D.A. (2012). The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- He, A., Shen, X., Ma, Q., Cao, J., von Gise, A., Zhou, P., Wang, G., Marquez, V.E., Orkin, S.H., and Pu, W.T. (2012). PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. *Genes Dev.* 26, 37–42.
- Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kintner, C., Noro, C.Y., and Wylie, C. (1994). Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* 79, 791–803.
- Hellsten, U., Harland, R.M., Gilchrist, M.J., Hendrix, D., Jurka, J., Kapitonov, V., Ovcharenko, I., Putnam, N.H., Shu, S., Taher, L., et al. (2010). The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science* 328, 633–636.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O.G., and Melton, D.A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 77, 283–295.
- Hitachi, K., Danno, H., Tazumi, S., Aihara, Y., Uchiyama, H., Okabayashi, K., Kondow, A., and Asashima, M. (2009). The *Xenopus* Bowline/Ripply family proteins negatively regulate the transcriptional activity of T-box transcription factors. *The International Journal of Developmental Biology* 53, 631–639.
- Hogben, L. (1946). History of the Hogben test. *Br Med J* 2, 554.
- Hoppler, S., Brown, J.D., and Moon, R.T. (1996). Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in *Xenopus* embryos. *Genes Dev.* 10, 2805–2817.
- Houlston, E., and Elinson, R.P. (1991). Patterns of microtubule polymerization relating to cortical rotation in *Xenopus laevis* eggs. *Development* 112, 107–117.
- Huang, X.-J., Wang, X., Ma, X., Sun, S.-C., Zhou, X., Zhu, C., and Liu, H. (2014). EZH2 is essential for development of mouse preimplantation embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 1166–1175.
- Kanzaki, M., and Morris, P.L. (1998). Lactogenic hormone-inducible phosphorylation and gamma-activated site-binding activities of Stat5b in primary rat Leydig cells and MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology* 139, 1872–1882.
- Kawaguchi, A., Ochi, H., Sudou, N., and Ogino, H. (2012). Comparative expression analysis of the H3K27 demethylases, JMJD3 and UTX, with the H3K27 methylase, EZH2, in *Xenopus*. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 295–300.
- Kawamura, A., Koshida, S., Hijikata, H., Ohbayashi, A., Kondoh, H., and Takada, S. (2005). Groucho-associated transcriptional repressor ripply1 is required for proper transition from the presomitic mesoderm to somites. *Dev. Cell* 9, 735–744.
- Kawamura, A., Koshida, S., and Takada, S. (2008). Activator-to-repressor conversion of T-box transcription factors by the Ripply family of Groucho/TLE-associated mediators. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3236–3244.
- Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schürmann, A., Huppertz, C., Kainulainen, H., and Joost, H.G. (1996). Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J. Biol. Chem.* 271, 3488–3495.
- Kim, E., Kim, M., Woo, D.-H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y.T., Kim, H., Rheey, J., Nakano, I., et al. (2013). Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and

- promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell* 23, 839–852.
- Kimelman, D. (1999). Transcriptional regulation in *Xenopus*: a bright and froggy future. *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 553–558.
- Klein, T.J., and Mlodzik, M. (2005). Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 155–176.
- Kofron, M., Demel, T., Xanthos, J., Lohr, J., Sun, B., Sive, H., Osada, S., Wright, C., Wylie, C., and Heasman, J. (1999). Mesoderm induction in *Xenopus* is a zygotic event regulated by maternal VegT via TGFbeta growth factors. *Development* 126, 5759–5770.
- Kondow, A., Hitachi, K., Okabayashi, K., Hayashi, N., and Asashima, M. (2007). Bowline mediates association of the transcriptional corepressor XGrg-4 with Tbx6 during somitogenesis in *Xenopus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 959–964.
- Korenberg, J.R., Chen, X.N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., Carpenter, N., Daumer, C., Dignan, P., Disteché, C., et al. (1994). Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 4997.
- Kuliyev, E., Doherty, J.R., and Mead, P.E. (2005). Expression of *Xenopus* suppressor of cytokine signaling 3 (xSOCS3) is induced by epithelial wounding. *Dev. Dyn.* 233, 1123–1130.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* 16, 2893–2905.
- Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004). Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol. Cell* 14, 183–193.
- L. Hogben, E. Charles, and D. Slome (1931). Studies on the pituitary. VIII. The relation of the pituitary gland to calcium metabolism and ovarian function in *Xenopus*.
- Laguna, A., Aranda, S., Barallobre, M.J., Barhoum, R., Fernández, E., Fotaki, V., Delabar, J.M., de la Luna, S., de la Villa, P., and Arbonés, M.L. (2008). The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development. *Dev. Cell* 15, 841–853.
- Lana-Elola, E., Watson-Scales, S.D., Fisher, E.M.C., and Tybulewicz, V.L.J. (2011). Down syndrome: searching for the genetic culprits. *Dis Model Mech* 4, 586–595.
- 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, 1123–1136.
- Latinkić, B.V., Umbhauer, M., Neal, K.A., Lerchner, W., Smith, J.C., and Cunliffe, V. (1997). The *Xenopus* Brachyury promoter is activated by FGF and low concentrations of activin and suppressed by high concentrations of activin and by paired-type homeodomain proteins. *Genes Dev.* 11, 3265–3276.
- Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L.A., Guenther, M.G., Levine, S.S., Kumar, R.M., Chevalier, B., Johnstone, S.E., Cole, M.F., Isono, K., et al. (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125, 301–313.
- Lejeune, J., Gautier, M., and Turpin, R. (1959). [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid

- children]. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 248, 1721–1722.
- Levy, D., and Lee, C. (2002). What does Stat3 do? *The Journal of Clinical Investigation.*
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565–570.
- Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S., and De Robertis, E.M. (1997). Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88, 747–756.
- Li, H.-Y., Grifone, R., Saquet, A., Carron, C., and Shi, D.-L. (2013). The *Xenopus* homologue of Down syndrome critical region protein 6 drives dorsoanterior gene expression and embryonic axis formation by antagonising polycomb group proteins. *Development* 140, 4903–4913.
- Li, Z., Cao, R., Wang, M., Myers, M.P., Zhang, Y., and Xu, R.-M. (2006). Structure of a Bmi-1-Ring1B polycomb group ubiquitin ligase complex. *J. Biol. Chem.* 281, 20643–20649.
- Li, Z., Yu, T., Morishima, M., Pao, A., LaDuca, J., Conroy, J., Nowak, N., Matsui, S.-I., Shiraishi, I., and Yu, Y.E. (2007). Duplication of the entire 22.9 Mb human chromosome 21 syntenic region on mouse chromosome 16 causes cardiovascular and gastrointestinal abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1359–1366.
- Lim, J.-W., Hummert, P., Mills, J.C., and Kroll, K.L. (2011). Geminin cooperates with Polycomb to restrain multi-lineage commitment in the early embryo. *Development* 138, 33–44.
- Lin, J., Wang, X., and Dorsky, R.I. (2011). Progenitor expansion in *apc* mutants is mediated by Jak/Stat signaling. *BMC Dev Biol* 11, 73.
- Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., and Hennighausen, L. (1997). Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev.* 11, 179–186.
- van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., van der Gulden, H., and Berns, A. (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 737–752.
- van der Lugt, N.M., Domen, J., Linders, K., van Roon, M., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M., and van Lohuizen, M. (1994). Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the *bmi-1* proto-oncogene. *Genes Dev.* 8, 757–769.
- Luis, N.M., Morey, L., Mejetta, S., Pascual, G., Janich, P., Kuebler, B., Cozutto, L., Roma, G., Nascimento, E., Frye, M., et al. (2011). Regulation of human epidermal stem cell proliferation and senescence requires polycomb-dependent and -independent functions of Cbx4. *Cell Stem Cell* 9, 233–246.
- Lyle, R., Béna, F., Gagos, S., Gehrig, C., Lopez, G., Schinzel, A., Lespinasse, J., Bottani, A., Dahoun, S., Taine, L., et al. (2009). Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur. J. Hum. Genet.* 17, 454–466.
- del Mar Lorente, M., Marcos-Gutiérrez, C., Pérez, C., Schoorlemmer, J., Ramírez, A., Magin, T., and Vidal, M. (2000). Loss- and gain-of-function mutations show a polycomb group function for Ring1A in mice. *Development* 127, 5093–5100.
- Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343–349.

- Margueron, R., Li, G., Sarma, K., Blais, A., Zavadil, J., Woodcock, C.L., Dynlacht, B.D., and Reinberg, D. (2008). Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol. Cell* 32, 503–518.
- Martínez de Lagrán, M., Altafaj, X., Gallego, X., Martí, E., Estivill, X., Sahún, I., Fillat, C., and Dierssen, M. (2004). Motor phenotypic alterations in TgDyrk1a transgenic mice implicate DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction. *Neurobiol. Dis.* 15, 132–142.
- Mead, P.E., Brivanlou, I.H., Kelley, C.M., and Zon, L.I. (1996). BMP-4-responsive regulation of dorsal-ventral patterning by the homeobox protein Mix.1. *Nature* 382, 357–360.
- Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., et al. (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84, 431–442.
- Mii, Y., and Taira, M. (2009). Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. *Development* 136, 4083–4088.
- Miklossy, G., Hilliard, T.S., and Turkson, J. (2013). Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 12, 611–629.
- Min, Z., Lin, H., Zhu, X., Gao, L., Khand, A.A., and Tao, Q. (2016). Ascl1 represses the mesendoderm induction in *Xenopus*. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 48, 1006–1015.
- Miyabara, S., Gropp, A., and Winking, H. (1982). Trisomy 16 in the mouse fetus associated with generalized edema and cardiovascular and urinary tract anomalies. *Teratology* 25, 369–380.
- Mohr, A., Fahrenkamp, D., Rinis, N., and Müller-Newen, G. (2013). Dominant-negative activity of the STAT3-Y705F mutant depends on the N-terminal domain. *Cell Commun. Signal* 11, 83.
- Moon, R.T., and Kimelman, D. (1998). From cortical rotation to organizer gene expression: toward a molecular explanation of axis specification in *Xenopus*. *Bioessays* 20, 536–545.
- Morey, L., and Helin, K. (2010). Polycomb group protein-mediated repression of transcription. *Trends Biochem. Sci.* 35, 323–332.
- Morrison, G.M., and Brickman, J.M. (2006). Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. *Development* 133, 2011–2022.
- de Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., Vidal, M., et al. (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev. Cell* 7, 663–676.
- Newport, J., and Kirschner, M. (1982). A major developmental transition in early *xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* 30, 675–686.
- Newport, J., and Kirschner, M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. 687–696.
- Nichane, M., Ren, X., and Bellefroid, E.J. (2010). Self-regulation of Stat3 activity coordinates cell-cycle progression and neural crest specification. *EMBO J.* 29, 55–67.
- Nieuwkoop, P.D. (1969). The formation of the mesoderm in urodelean amphibians: I. Induction by the endoderm. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org* 162, 341–373.

- Nieuwkoop, P.D., and Faber, J. (1994). *Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis* (Garland Pub.).
- Nieuwkoop, P. D., and Faber, J. (1956). *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*. Amsterdam: North Holland Publishing.
- Ningxia, Z., Shuyan, L., Zhongjing, S., Ling, C., Tianzhong, M., Lifeng, W., Yan, Y., Leili, L., Xiancai, C., and Haibin, C. (2011). The Expression Pattern of Polycomb Group Protein Ezh2 During Mouse Embryogenesis. *Anat Rec* 294, 1150–1157.
- Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Matsuda, T., Ariizumi, T., Heike, T., Asashima, M., and Yokota, T. (1999). Activation of Stat3 by Cytokine Receptor gp130 Ventralizes Xenopus Embryos Independent of BMP-4. *Developmental Biology* 216, 481–490.
- O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A., and Jenuwein, T. (2001). The Polycomb-Group Gene Ezh2 Is Required for Early Mouse Development. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4330–4336.
- O'Doherty, A., Ruf, S., Mulligan, C., Hildreth, V., Errington, M.L., Cooke, S., Sesay, A., Modino, S., Vanes, L., Hernandez, D., et al. (2005). An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science* 309, 2033–2037.
- Oelgeschläger, M., Kuroda, H., Reversade, B., and De Robertis, E.M. (2003). Chordin is required for the Spemann organizer transplantation phenomenon in Xenopus embryos. *Dev. Cell* 4, 219–230.
- Ogawa, Y., Nonaka, Y., Goto, T., Ohnishi, E., Hiramatsu, T., Kii, I., Yoshida, M., Ikura, T., Onogi, H., Shibuya, H., et al. (2010). Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat Commun* 1, 86.
- Ohkawara, B., Shirakabe, K., Hyodo-Miura, J., Matsuo, R., Ueno, N., Matsumoto, K., and Shibuya, H. (2004). Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF-beta-mediated mesoderm induction. *Genes Dev.* 18, 381–386.
- Okubo, T., Kawamura, A., Takahashi, J., Yagi, H., Morishima, M., Matsuoka, R., and Takada, S. (2011). Ripply3, a Tbx1 repressor, is required for development of the pharyngeal apparatus and its derivatives in mice. *Development* 138, 339–348.
- Olson, L.E., Richtsmeier, J.T., Leszl, J., and Reeves, R.H. (2004a). A chromosome 21 critical region does not cause specific Down syndrome phenotypes. *Science* 306, 687–690.
- Olson, L.E., Roper, R.J., Sengstaken, C.L., Peterson, E.A., Aquino, V., Galdzicki, Z., Siarey, R., Pletnikov, M., Moran, T.H., and Reeves, R.H. (2007). Trisomy for the Down syndrome "critical region" is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Hum. Mol. Genet.* 16, 774–782.
- Onichtchouk, D., Gawantka, V., Dosch, R., Delius, H., Hirschfeld, K., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1996). The Xvent-2 homeobox gene is part of the BMP-4 signalling pathway controlling [correction of controlling] dorsoventral patterning of Xenopus mesoderm. *Development* 122, 3045–3053.
- Onichtchouk, D., Glinka, A., and Niehrs, C. (1998). Requirement for Xvent-1 and Xvent-2 gene function in dorsoventral patterning of Xenopus mesoderm. *Development* 125, 1447–1456.
- Pannese, M., Polo, C., Andreazzoli, M., Vignali, R., Kablar, B., Barsacchi, G., and Boncinelli, E.

- (1995). The *Xenopus* homologue of *Otx2* is a maternal homeobox gene that demarcates and specifies anterior body regions. *Development* 121, 707–720.
- Paroush, Z., Finley, R.L., Kidd, T., Wainwright, S.M., Ingham, P.W., Brent, R., and Ish-Horowicz, D. (1994). *Groucho* is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* 79, 805–815.
- Pascal, A., Riou, J.F., Carron, C., Boucaut, J.C., and Umbhauer, M. (2001). Cloning and developmental expression of *STAT5* in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 106, 171–174.
- Pasini, D., Bracken, A.P., Jensen, M.R., Lazzarini Denchi, E., and Helin, K. (2004). *Suz12* is essential for mouse development and for *EZH2* histone methyltransferase activity. *EMBO J.* 23, 4061–4071.
- Patterson, D., and Costa, A.C.S. (2005). Down syndrome and genetics - a case of linked histories. *Nat. Rev. Genet.* 6, 137–147.
- Peng, J.C., Valouev, A., Swigut, T., Zhang, J., Zhao, Y., Sidow, A., and Wysocka, J. (2009). *Jarid2/Jumonji* Coordinates Control of *PRC2* Enzymatic Activity and Target Gene Occupancy in Pluripotent Cells. *Cell* 139, 1290–1302.
- Pera, E.M., and De Robertis, E.M. (2000). A direct screen for secreted proteins in *Xenopus* embryos identifies distinct activities for the Wnt antagonists *Crescent* and *Frzb-1*. *Mech. Dev.* 96, 183–195.
- Pereira, P.L., Magnol, L., Sahún, I., Brault, V., Duchon, A., Prandini, P., Gruart, A., Bizot, J.-C., Chadeaux-Vekemans, B., Deutsch, S., et al. (2009). A new mouse model for the trisomy of the *Abcg1-U2af1* region reveals the complexity of the combinatorial genetic code of down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4756–4769.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E.M. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of *chordin* to *BMP-4*. *Cell* 86, 589–598.
- 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, 707–710.
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., et al. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122, 517–527.
- Polani, P.E., and Adinolfi, M. (1980). Chromosome 21 of man, 22 of the great apes and 16 of the mouse. *Dev Med Child Neurol* 22, 223–225.
- Ray, S., Boldogh, I., and Brasier, A.R. (2005). *STAT3* NH<sub>2</sub>-terminal acetylation is activated by the hepatic acute-phase response and required for *IL-6* induction of *angiotensinogen*. *Gastroenterology* 129, 1616–1632.
- Reeves, R.H., Irving, N.G., Moran, T.H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S.S., Schmidt, C., Bronson, R.T., and Davisson, M.T. (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat. Genet.* 11, 177–184.
- Reijnen, M.J., Hamer, K.M., den Blaauwen, J.L., Lambrechts, C., Schoneveld, I., van Driel, R., and Otte, A.P. (1995). *Polycomb* and *bmi-1* homologs are expressed in overlapping patterns in *Xenopus* embryos and are able to interact with each other. *Mech. Dev.* 53, 35–46.
- Reymond, A., Marigo, V., Yaylaoglu, M.B., Leoni, A., Ucla, C., Scamuffa, N., Caccioppoli, C., Dermitzakis, E.T., Lyle, R., Banfi, S., et al. (2002). Human chromosome 21 gene expression

- atlas in the mouse. *Nature* 420, 582–586.
- Ringrose, L., and Paro, R. (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu. Rev. Genet.* 38, 413–443.
- Rosa, F., Roberts, A.B., Danielpour, D., Dart, L.L., Sporn, M.B., and Dawid, I.B. (1988). Mesoderm induction in amphibians: the role of TGF-beta 2-like factors. *Science* 239, 783–785.
- Roux, W. (1890). Über die Entwicklungsmechanik der Organismen.
- Sago, H., Carlson, E.J., Smith, D.J., Kilbridge, J., Rubin, E.M., Mobley, W.C., Epstein, C.J., and Huang, T.T. (1998). Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6256–6261.
- Saha, B., Home, P., Ray, S., Larson, M., Paul, A., Rajendran, G., Behr, B., and Paul, S. (2013). EED and KDM6B coordinate the first mammalian cell lineage commitment to ensure embryo implantation. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2691–2705.
- Sanulli, S., Justin, N., Teissandier, A., Ancelin, K., Portoso, M., Caron, M., Michaud, A., Lombard, B., da Rocha, S.T., Offer, J., et al. (2015). Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation. *Mol Cell* 57, 769–783.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L.K., and De Robertis, E.M. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79, 779–790.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., and De Robertis, E.M. (1995). Regulation of neural induction by the *Chd* and *Bmp-4* antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 377, 757.
- Satijn, D.P.E., Hamer, K.M., Blaauwen, J. den, and Otte, A.P. (2001). The Polycomb Group Protein EED Interacts with YY1, and Both Proteins Induce Neural Tissue in *Xenopus* Embryos. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1360–1369.
- Saurin, A.J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Kingston, R.E. (2001). A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* 412, 655–660.
- Sawarkar, R., and Paro, R. (2010). Interpretation of developmental signaling at chromatin: the Polycomb perspective. *Dev. Cell* 19, 651–661.
- Scerbo, P., Girardot, F., Vivien, C., Markov, G.V., Luxardi, G., Demeneix, B., Kodjabachian, L., and Coen, L. (2012). Ventx Factors Function as Nanog-Like Guardians of Developmental Potential in *Xenopus*. *PLoS ONE* 7, e36855.
- Scharf, S.R., and Gerhart, J.C. (1983). Axis determination in eggs of *Xenopus laevis*: a critical period before first cleavage, identified by the common effects of cold, pressure and ultraviolet irradiation. *Dev. Biol.* 99, 75–87.
- Schmerer, M., Torregroza, I., Pascal, A., Umbhauer, M., and Evans, T. (2006). STAT5 acts as a repressor to regulate early embryonic erythropoiesis. *Blood* 108, 2989–2997.
- Schohl, A., and Fagotto, F. (2002).  $\beta$ -catenin, MAPK and Smad signaling during early *Xenopus* development. *Development* 129, 37–52.
- Schuettengruber, B., and Cavalli, G. (2009). Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development* 136, 3531–3542.
- Schwartz, Y.B., and Pirrotta, V. (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of

- genomic programmes. *Nat. Rev. Genet.* 8, 9–22.
- Sebrié, C., Chabert, C., Ledru, A., Guedj, F., Po, C., Smith, D.J., Rubin, E., Rivals, I., Beloeil, J.-C., Gillet, B., et al. (2008). Increased dosage of *DYRK1A* and brain volumetric alterations in a YAC model of partial trisomy 21. *Anat Rec (Hoboken)* 291, 254–262.
- Shao, M., Liu, Z.-Z., Wang, C.-D., Li, H.-Y., Carron, C., Zhang, H.-W., and Shi, D.-L. (2009). Down syndrome critical region protein 5 regulates membrane localization of Wnt receptors, Dishevelled stability and convergent extension in vertebrate embryos. *Development* 136, 2121–2131.
- Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y.-J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., Yuan, G.-C., and Orkin, S.H. (2008). EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol. Cell* 32, 491–502.
- Shibuya, K., Kudoh, J., Minoshima, S., Kawasaki, K., Asakawa, S., and Shimizu, N. (2000). Isolation of Two Novel Genes, *DSCR5* and *DSCR6*, from Down Syndrome Critical Region on Human Chromosome 21q22.2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271, 693–698.
- Simon, J.A., and Kingston, R.E. (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 697–708.
- Sims, R.J., Nishioka, K., and Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* 19, 629–639.
- Smith, W.C., and Harland, R.M. (1991). Injected *Xwnt-8* RNA acts early in *Xenopus* embryos to promote formation of a vegetal dorsalizing center. *Cell* 67, 753–765.
- Smith, W.C., and Harland, R.M. (1992). Expression cloning of *noggin*, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70, 829–840.
- Smith, D.J., Stevens, M.E., Sudanagunta, S.P., Bronson, R.T., Makhinson, M., Watabe, A.M., O'Dell, T.J., Fung, J., Weier, H.U., Cheng, J.F., et al. (1997). Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat. Genet.* 16, 28–36.
- Smith, J.C., Price, B.M., Green, J.B., Weigel, D., and Herrmann, B.G. (1991). Expression of a *Xenopus* homolog of *Brachyury (T)* is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 67, 79–87.
- Spemann, H. (1903). *Entwicklungsphysiologische Studien am Tritonei*, III. p.
- Spemann, H., and Mangold, H. (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. 599–638.
- Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 435–459.
- Sun, B.I., Bush, S.M., Collins-Racie, L.A., LaVallie, E.R., DiBlasio-Smith, E.A., Wolfman, N.M., McCoy, J.M., and Sive, H.L. (1999). *derrière*: a TGF-beta family member required for posterior development in *Xenopus*. *Development* 126, 1467–1482.
- Suzuki, A., Thies, R.S., Yamaji, N., Song, J.J., Wozney, J.M., Murakami, K., and Ueno, N. (1994). A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10255.

- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, J., Ohbayashi, A., Oginuma, M., Saito, D., Mochizuki, A., Saga, Y., and Takada, S. (2010). Analysis of Ripply1/2-deficient mouse embryos reveals a mechanism underlying the rostro-caudal patterning within a somite. *Dev. Biol.* 342, 134–145.
- Takahashi, S., Yokota, C., Takano, K., Tanegashima, K., Onuma, Y., Goto, J., and Asashima, M. (2000). Two novel nodal-related genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development* 127, 5319–5329.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 3801–3804.
- Tejedor, F., Zhu, X.R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K.F., and Pongs, O. (1995). minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* 14, 287–301.
- Tien, C.-L., Jones, A., Wang, H., Gerigk, M., Nozell, S., and Chang, C. (2015). Snail2/Slug cooperates with Polycomb repressive complex 2 (PRC2) to regulate neural crest development. *Development* 142, 722–731.
- Togashi, T., Choi, D.K., Taylor, T.D., Suzuki, Y., Sugano, S., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2000). A novel gene, DSCR5, from the distal Down syndrome critical region on chromosome 21q22.2. *DNA Res.* 7, 207–212.
- Turpen, J.B., Carlson, D.L., and Huang, C. (2001). Cloning and developmental expression of *Xenopus* Stat1. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 219–229.
- Voncken, J.W., Roelen, B.A., Roefs, M., de Vries, S., Verhoeven, E., Marino, S., Deschamps, J., and van Lohuizen, M. (2003). Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 2468–2473.
- Waddington, C.H. (1942). The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 41, 10–13.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873–878.
- Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F.P., and Moos, M. (1997). Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* 88, 757–766.
- Watanabe, R., Murakami, Y., Marmor, M.D., Inoue, N., Maeda, Y., Hino, J., Kangawa, K., Julius, M., and Kinoshita, T. (2000). Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PI3-P and is regulated by DPM2. *EMBO J.* 19, 4402–4411.
- Wen Z, and Darnell JE Jr (1997). Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res.*
- Wilson, P.A., and Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. 331–333.
- Witt, O., Deubzer, H.E., Milde, T., and Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* 277, 8–21.
- Xanthos, J.B., Kofron, M., Tao, Q., Schaible, K., Wylie, C., and Heasman, J. (2002). The roles of three

- signaling pathways in the formation and function of the Spemann Organizer. *Development* 129, 4027–4043.
- Yamaguchi, H., and Hung, M.-C. (2014). Regulation and Role of EZH2 in Cancer. *Cancer Research and Treatment* 46, 209–222.
- Yang, J., Huang, J., Dasgupta, M., Sears, N., Miyagi, M., Wang, B., Chance, M.R., Chen, X., Du, Y., Wang, Y., et al. (2010). Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 21499–21504.
- Yasuo, H., and Lemaire, P. (2001). Role of Goosecoid, Xnot and Wnt antagonists in the maintenance of the notochord genetic programme in *Xenopus* gastrulae. *Development* 128, 3783–3793.
- Yoshitake, Y., Howard, T.L., Christian, J.L., and Hollenberg, S.M. (1999). Misexpression of Polycomb-group proteins in *Xenopus* alters anterior neural development and represses neural target genes. *Dev. Biol.* 215, 375–387.
- Yuan, Z. -I. (2005). Stat3 Dimerization Regulated by Reversible Acetylation of a Single Lysine Residue. *Science* 307, 269–273.
- Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15, 2343–2360.
- Zhang, J., Houston, D.W., King, M.L., Payne, C., Wylie, C., and Heasman, J. (1998). The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell* 94, 515–524.
- Zhang, X., Abreu, J.G., Yokota, C., MacDonald, B.T., Singh, S., Coburn, K.L.A., Cheong, S.-M., Zhang, M.M., Ye, Q.-Z., Hang, H.C., et al. (2012). Tiki1 is required for head formation via Wnt cleavage-oxidation and inactivation. *Cell* 149, 1565–1577.
- Zimmerman, L.B., De Jesús-Escobar, J.M., and Harland, R.M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599–606.