



**HAL**  
open science

# Caractérisation de la différenciation de l'endoderme primitif: Coopération entre la voie de signalisation RTK-FGF et le facteur de transcription Gata 6

Stephanie Hermitte

► **To cite this version:**

Stephanie Hermitte. Caractérisation de la différenciation de l'endoderme primitif: Coopération entre la voie de signalisation RTK-FGF et le facteur de transcription Gata 6. Sciences agricoles. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT: 2017CLFAS014 . tel-03119405

**HAL Id: tel-03119405**

**<https://theses.hal.science/tel-03119405>**

Submitted on 24 Jan 2021

**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.

UNIVERSITE CLERMONT - AUVERGNE

Année : 2017

N° d'ordre

*ECOLE DOCTORALE*  
*DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne  
Pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire et Biologie du Développement

Soutenue le 23 Octobre 2017

Stéphanie HERMITTE

---

*Caractérisation de la différenciation de l'endoderme  
primitif : Coopération entre la voie de signalisation  
RTK-FGF et le facteur de transcription GATA6*

---

Président :	M. ARNAUD Philippe,	Directeur de Recherche
Rapporteurs :	Mme BŒUF Hélène, Mr COHEN-TANNOUJJI Michel, Mr. LAVIAL Fabrice,	Directeur de Recherche Directeur de Recherche Chargé de Recherche
Directrices de thèse :	Mme CHAZAUD Claire, Mme FOGLI Anne,	Directeur de Recherche MCU-PH

Laboratoire d'accueil : UMR CNRS 6293 - Clermont Université - INSERM U1103,  
Génétique Reproduction et Développement







---

## REMERCIEMENTS

---

Merci, tout d'abord, aux membres de mon jury Hélène BŒUF, Michel COHEN-TANNOUJJI et Fabrice LAVIAL, d'avoir accepté de rapporter mon travail, ainsi que Philippe ARNAUD, pour avoir été un président de jury plus qu'à la hauteur. J'ai une pensée particulière pour vous Fabrice LAVIAL puisque vous avez aussi été présent lors de mon second comité de thèse. En espérant avoir évolué depuis !

Merci ensuite au Dr Chantal VAURY, pour m'avoir accueillie au sein de l'Institut, qui était encore partagé à ce moment là et qui depuis a fusionné avec sa partie manquante des Cézeaux pour grandir de la meilleure des façons je l'espère !

Merci particulier à mes directrices de thèse. Tout d'abord à toi, ma (principale et première) directrice de thèse, Claire CHAZAUD pour m'avoir accueillie au sein de ton équipe, au début pour 3 ans et puis finalement pour un peu plus puisque tu m'as fait confiance pour une année supplémentaire. Ces 4 ans passés avec toi m'ont fait grandir et je t'en remercie pour cela. Merci à toi, Anne FOGLI, ma seconde directrice de thèse, pour avoir accepté en cours de route de co-diriger cette thèse et merci pour tes conseils « protéiques » précieux !

Merci à l'ensemble du personnel technique du GREd « Dunant », Nadège, Fanfan pour ton aide pour tout matériel ou produit dont j'ai eu besoin et que j'ai cherché durant ces 4 années ; Merci particulier à Christian pour ton aide, ton dévouement et ton humour ! Je n'ai pas réussi à mémoriser toutes tes blagues ! Désolée... Merci à Marie-Diane, Nadia et Annie pour toutes les questions administratives notamment !

Merci chaleureux à mon équipe. Tout d'abord, les membres d'aujourd'hui : Nico (je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite ! bonne construction de ta maison ☺), Cécilia (tu verras la fin de thèse c'est génial ! ☺) et Lorena (je te souhaite le meilleur pour la fin de ton post-doc et pour après...). Ensuite, les membres passés : Sabine, nous avons commencé ce challenge de la thèse ensemble mais tu m'a lâchement devancée pour finir en première (avoues !! :p) et abandonnée (je dirai même !!) pour la fin ! Merci pour ton soutien, pour le partage de cette expérience dans les bons comme les mauvais moments. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour cette nouvelle tranche de vie ! Merci à toi, Maxime, pour tout ce savoir que tu m'as transmis en si peu de temps ! La formation éclair a été top ! Peut-être que la prochaine fois ça sera une formation « plongée » à laquelle j'aurai droit !?! Merci chaleureux à Cynthia, pour tous tes conseils précieux embryonnaires et hiérarchiques ! Merci aussi à Fatma, Adel, Kasia pour m'avoir permise à mon tour de transmettre quelques unes des connaissances acquises et pour m'avoir aidée à améliorer la langue de Shakespeare (Lorena aussi je pense à toi pour cela !).

Merci, un énorme merci bien entendu à toute l'équipe ARNAUD ! Phil (je passe outre le statut « président de jury » ici) pour tous tes conseils précieux, Catherine, pour ton professionnalisme et cette note de Lyberty, Francky (Vincent ? j'avoue que ton imitation est pour moi mémorable et restera un souvenir impérissable ! je suis une grande FAN !!). Merci David, pour cette formation éclair sur la culture cell ; cela m'a permis de débiter plus sereinement cette thèse et a enrichi mes réflexions sur les travaux que j'ai effectués pendant ces 4 ans. Je vous souhaite le meilleur !

Un merci particulier et ému à toi ma Bertouille ! Quelle aurait été ma thèse sans toi ? Tant sur le plan professionnel que personnel, nous avons partagé tellement. Ton soutien sans faille, ton savoir, ta gentillesse, ta bonne humeur, etc, dieu sais que la liste est longue ! J'ai bougé pas mal en France et je



n'ai pu amener dans mes valises mes amis proches mais je peux dire que tu étais une collègue et que tu es devenue, au fil de ces 4 années, une amie. Sans toi cette thèse aurait été bien différente et sans doute beaucoup plus difficile ! Je te souhaite bien sûr le meilleur autant professionnellement que personnellement ! On gardera contact bien entendu en Auvergne, en Angleterre ou ailleurs !

Merci affectueux à toi Isa, ma « zaza » préférée ! Que de moments confiance partagés dans cette salle de culture ! J'avoue que sans toi, la culture cell aurait été bien triste ! Merci pour ton soutien quotidien et ta disponibilité ! Je te souhaite tout le bonheur du monde sur tous les plans ! Carpe diem ☺

Merci chaleureux à toi Steph ! Déjà nos prénoms nous ont rapprochés mais ton grand cœur, ton « coté maman » indéniable et ta disponibilité ont rendu cette thèse plus douce. Plein de bonheur futur professionnel et personnel !

Merci à toi Jil ! Un ENORME Merci ! Que de délires, de bonne humeur, de partage, de discussions profondes scientifiques le plus souvent bien sûr !!! Tu as été ma bouffée d'air frais de fin de thèse ! Tu es une personne en or, une amie également à ce jour ! Je n'aurai qu'un mot à dire CHI\*\*\*. Que ta fin de thèse soit paisible (elle le sera forcément ☺ ) et je te souhaite plein de bonheur pour le futur !

Merci aussi Marie-Elisa pour nos conversations, nos pauses dans les bons comme dans les mauvais moments. Courage pour cette fin de thèse et pour ce que tu entreprendras pour la suite. Merci Elisa, on se connaît depuis moins longtemps mais tu es une personne super ! Je te souhaite aussi une belle fin de thèse. Le girl-power est là les filles ! Restez soudées !

Merci aussi à toi Céline, ta gentillesse, ton savoir et ton aide ont été précieux sur ces derniers mois de thèse. Plein de bonheurs pour la suite !

Un grand merci à l'ensemble des équipes du laboratoire pour ces échanges scientifiques (ou non) durant ces quatre années. Un merci affectueux à toi Critiana, tu as été la touche italienne qui manquait au labo. Tu es une personne avec une belle âme, une amie. Que ta fin de thèse se termine en apothéose et que ton futur te permette de t'épanouir tel que tu le souhaites ! Merci aussi particulier à toi Benjamin, tu va enfin quitter ce labo et avant moi ! Congrats !! Je retiendrai bien entendu des souvenirs émus de ta compagnie en modules ainsi que ceux partagés de ta bonne humeur quotidienne ! Pleins de bonheur à toi et ta petite famille en pleine expansion Mazeltov ! ☺.

Mes dernières pensées et l'amour de ces remerciements sont dirigés envers ma famille. Premièrement à mes parents, ça y est ! J'ai fini ces longues années d'étude qui n'ont été possibles que grâce à vos sacrifices, votre patience, votre confiance et votre dévouement, etc.. La liste est trop longue, et je n'ai pas de mots assez forts pour vous remercier de tout ce que vous avez fait pour moi, vous m'avez tout donné pour que je puisse réussir autant sur le plan professionnel que personnel. On n'apprend pas à être parents mais je vous certifie que vous avez superbement bien appris et tenu votre rôle. Je suis comblée de vous avoir comme parents et j'espère que cette thèse, qui est aussi la vôtre, vous rendra fiers. Je vous aime. Soeurette, je ne t'oublie forcément pas. *The one and only to infinity and beyond...* Je te souhaite le meilleur dans ta vie qui ne fait, comme la mienne, que commencer. Enfin, je tiens à remercier chaleureusement ma belle famille pour votre soutien et votre amour (je peux le dire). Bien entendu je finirai ces remerciements, par adresser mes derniers mots à toi Gaël. Que dire à part que ces deux années, à tes côtés, ont été merveilleuses par ta présence et celle de tes amis bienveillants. Cette thèse a été la tienne surtout pour les sacrifices et la compréhension dont tu as fait preuve durant ces derniers mois. Ma venue en Auvergne m'a permis de croiser ton chemin et j'espère pouvoir le partager pendant encore longtemps. Je t'aime infiniment.



## Résumé

À E3.5 jours de développement (E3.5), l'embryon murin se compose d'une monocouche de cellules externes correspondant au Trophectoderme (TE) et d'une masse cellulaire interne (MCI), hétérogène, constituée de deux sous-populations de cellules précurseurs : les cellules épiblastiques (Epi) et les cellules d'endoderme primitif (EPr). NANOG, marqueur épiblastique et GATA6, marqueur de l'EPr, sont co-exprimés à E3.5 dans la MCI puis adoptent une expression exclusive au sein de leur lignage respectif. La différenciation du lignage EPr nécessite l'expression de GATA6 et l'activation de la voie Récepteur Tyrosine Kinase (RTK) activée par le FGF (RTK-FGF) pour l'induction de gènes cibles de GATA6 tels que *Sox17* et *Gata4*.

Au cours de ma thèse, j'ai, dans un premier temps, étudié la relation GATA6/voie RTK-FGF lors de l'induction de l'expression des gènes de différenciation de l'EPr. J'ai utilisé des cellules souches embryonnaires murines ES sauvages ou mutantes pour *Gata6* (ES *Gata6*<sup>-/-</sup>), dans lesquelles j'ai surexprimé différentes formes mutantes de *Gata6* inactivées sur les différents résidus identifiés comme potentiellement phosphorylables par la voie RTK-FGF. Ainsi, j'ai analysé l'expression protéique des gènes *Sox17* et *Gata4* ainsi que des expressions ARN de ces cibles et d'autres gènes caractéristiques exprimés dans l'EPr dans les différentes conditions de surexpression des formes de *Gata6* en absence ou présence d'inhibiteurs de la voie RTK-FGF. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence que la transmission du signal s'effectue au travers de récepteur au FGF et qu'il existe une compensation entre les branches RTK-MEK-ERK et RTK-PI3K ciblant le résidu Sérine 37 de GATA6. Enfin, les résidus S34 et T509 sont nécessaires et les résidus S34, S37 et T509 semblent coopérer, au travers d'un mécanisme pour le moment non détaillé, pour l'induction des gènes cibles exprimés au sein de l'EPr.

Dans un second temps, j'ai débuté la caractérisation phénotypique du rôle des facteurs *Dickkopf1* (DKK1), un inhibiteur de la voie WNT/ $\beta$ -caténine, et *NOGGIN*, un inhibiteur de la voie des Bone Morphogenic Protein (BMP) lors de la différenciation de l'EPr en endoderme pariétal (EP) et viscéral (EV). À l'aide de modèles de souris KO pour DKK1 et NOGGIN, croisées en fond C57Bl6 pur, j'ai pu observer que l'expression d'OCT4 était maintenue au sein des embryons homozygotes mutants pour *Dkk1* et double homozygotes mutants pour *Dkk1* et *Noggin*. Cependant, le mécanisme potentiel de compensation ou de coopération de ces deux marqueurs n'est pour le moment pas détaillé précisément et mérite l'analyse d'un plus grand nombre d'embryons mutants.

## Abstract

At E3.5 days of development (E3.5), mouse embryo consists of a monolayer of external cells corresponding to Trophectoderme (TE) and of an intern cell mass (ICM), heterogeneous, constituted by two subpopulations of precursory cells: epiblastic cells (Epi) and primitive endoderm cells (EPr). NANOG, an Epi marker and GATA6, a PrE marker, are co-expressed at E3.5 in the MCI and then adopt an exclusive expression within their respective lineage. EPr differentiation requires both expression of GATA6 and RTK pathway, activated by FGF ligand, in order to induce late markers *Sox17* and *Gata4* expression.

First, I studied the relation GATA6/RTK during this process to understand the mechanism of induction of these target genes during final EPr differentiation. I used embryonic stem cells ES WT or *Gata6* mutants (ES *Gata6*<sup>-/-</sup>), in which I transfected various *Gata6* mutant constructions on different residues characterized as potentially phosphorylable by the RTK pathway. So, I analyzed protein expression of *Sox17* and *Gata4* target genes as well as RNA expression of characteristic genes expressed in the EPr in different inhibition conditions of RTK pathway. So, I was able to highlight that the transmission of the signal is made through the FGF receptor (FGFR1) and that there is compensation between RTK-MEK-ERK and RTK-PI3K pathways highlighted by later *Gata6* overexpression of certain mutant forms. Finally, residue S34, S37 and T509 seems to cooperate, through a mechanism not detailed for the moment, for the induction of the EPr target genes.

Then, I was interested to phenotypically characterize the role of *Dickkopf1* (DKK1), an inhibitor of the WNT/ $\beta$ -catenin pathway, and *NOGGIN*, an inhibitor of the Bone Morphogenic Protein (BMP) pathway during the EPr differentiation in parietal endoderm (EP) and visceral (EV). Using models of mouse KO for *Dkk1* and *Noggin*, met in pure background C57Bl6, I was able to observe that OCT4 expression was maintained within the *Dkk1*<sup>-/-</sup>, and *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> embryos. However, the potential compensation or cooperation mechanism of these two markers is not understanding well for the moment and deserves the analysis of a largest mutant embryos number.



---

# SOMMAIRE

---

REMERCIEMENTS .....	
SOMMAIRE .....	
LISTE DES ABREVIATIONS .....	
LISTE DES FIGURES.....	
LISTE DES TABLEUX .....	
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	1
CHAPITRE 1 - Le développement murin : du processus de fécondation à la constitution d'un fœtus mature .....	2
I Premiers stades de la morula : compaction et polarité .....	3
II Première vague de décision de destin cellulaire : TE <i>versus</i> MCI .....	4
III Différenciation de la MCI en Epi et EPr .....	8
IV La formation d'un blastocyste mature .....	24
CHAPITRE 2 - L'embryon murin : un modèle de choix pour l'isolement et la dérivation de modèles de cellules souches <i>in vitro</i> .....	30
I Tératocarcinomes et cellules embryonnaires de carcinome ECC .....	31
II Les XEN : cellules souches de l'endoderme extra-embryonnaire .....	32
III Cellules souches embryonnaires: m(urines)ES.....	35
CHAPITRE 3 - La famille GATA : membres, mise en évidence, rôle des facteurs de transcription GATA6 et GATA4 et de leur implication lors de la différenciation de l'EPr.....	38
I La famille GATA .....	38
II Focus sur le facteur GATA6 .....	40
III Modifications post-traductionnelles des facteurs GATA .....	42
CHAPITRE 4 - La voie de signalisation des Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK) .....	45
I Structure des récepteurs RTK.....	45
II Activation des récepteurs RTK.....	45
III Les récepteurs RTK : focus sur la famille FGFR.....	46
IV Branches RAS/RAF/MEK-ERK et RAS/PI3K-AKT de la voie RTK-FGF .....	48
V Interconnexion des branches RAS/RAF/MEK-ERK et RAS/PI3K-AKT-mTOR.....	49
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	52
Projets de thèse.....	53



Projet 1 : Etude de la coopération entre la voie de signalisation RTK et le facteur de transcription GATA6 au cours de la différenciation de l'EPr.....	54
Objectifs – Projet 1 .....	55
Résultats – Projet 1 .....	56
I Etude <i>in silico</i> de la phosphorylation de GATA6 par la signalisation RTK-FGF .....	56
II Surexpression des formes mutantes de <i>Gata6</i> en cellules ES <i>Gata6</i> <sup>-/-</sup> .....	58
III Quel est l'impact de l'inactivation de certains résidus de GATA6 sur l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles? .....	67
IV Quel est l'état de phosphorylation de la protéine GATA6 en présence ou absence d'inhibiteurs de la signalisation RTK-FGF ?.....	74
Conclusion – Projet 1.....	80
Discussion et Perspectives – Projet 1 .....	81
Projet 2 : Rôle(s) des facteurs <i>Dickkopf</i> ( <i>Dkk1</i> ) et <i>Noggin</i> au cours de la maturation de l'EPr et de la formation de ses dérivés. ....	88
Introduction – Projet 2 .....	89
I Généralités sur les voies WNT.....	89
II Rôle et activité de la voie WNT .....	92
III La voie WNT au cours du développement embryonnaire précoce.....	95
IV Antagonistes de la voie WNT canonique.....	96
V Interaction des voies WNT et de la voie BMP/TGF- $\beta$ .....	100
Objectifs – Projet 2 .....	104
Etat de l'art – Projet 2 .....	105
Résultats – Projet 2 .....	110
Conclusion - Projet 2 .....	113
Discussion et Perspectives – Projet 2 .....	114
ANNEXES PROJET 1.....	118
MATERIELS ET METHODES .....	129
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....	137
Publication scientifique .....	138
Autres communications scientifiques .....	144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	145



---

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

### A.

AFP : Alpha-FétoProtéine  
A-P : Antéro-Postérieur  
APC : Adenomatous polyposis coli  
aPKC : atypical Protein Kinase C  
ARNm: Acide ribonucléique messenger  
AVE: Endoderme Viscéral Antérieur

### B.

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor  
bHLH : basic Helix-Loop-Helix  
BMP: Bone Morphogenetic Protein

### C.

CDH1 : E cadhérine  
CDK : Cyclin Dependant Kinase  
CDR : Cystein Rich Domain  
CDX2 : Caudal-related homeobox 2  
CE : Corps Embryonnaires ou Embryoïdes  
ChIP: Immunoprécipitation de la chromatine  
CKIa : Kinase caseine Ia  
CAMKII : calmodulin dependant kinase II

### D.

DAB2 : Disabled-Homolog 2  
dbcAMP : dibutyryl cAMP  
DEP : Dishevelled-EGL-10-Pleckstrin  
DIX : Dishevelled Axin  
DKK: Dickkopf  
DMSO: Diméthylsulfoxyde

DUSP : DUal Specificity Phosphatases  
DVE: Endoderme viscéral Distal  
DVL : Dishevelled

### E.

E: Jour embryonnaire  
ECC : Cellules Embryonnaires Carcinomiques  
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor  
EP : Endoderme Pariétal  
Epi : Epiblaste  
EpiSCs : Cellules Souches Embryonnaires épiblastiques  
EPr : Endoderme Primitif  
Erk1/2 : Extracellular signal Regulated Kinase 1/2  
ES: Cellules souches embryonnaires  
EV : Endoderme Viscéral  
ExE: Ectoderme extra-embryonnaire  
ExEn: Endoderme extra-embryonnaire

### F.

FGF: Fibroblast Growth Factor  
FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor  
FOG : Friend of GATA  
Frizzled : Fz ou Fzd  
FRS2 : Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2

### G.

GFP: Green Fluorescent Protein  
GRB2: Growth-Factor-Receptor-Bound Protein 2

GSK3: Glycogen synthase kinase 3  
GAGs : Glycosaminoglycanes  
GRB2 : Growth factor Receptor Bound Protein 2  
GTPase : hydroxylase  
Guanosine TriPhosphate

### H.

H2B: Histone 2B  
Hex : Hematopoietically expressed homeobox  
hiPS : Cellules Souches humaines Pluripotentes induites  
HMG: High mobility group  
Hnf: Hepatic nuclear factor  
HSPGs : Héparane Sulfate Protéoglycanes

### I.

IGFR : Insulin Growth Factor Receptor  
IVF : *In Vitro* Fertilized  
iPSC : cellules souches Pluripotentes Induites

### J.

JAK/STAT : Janus Kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription  
c-JNK : c-Jun N-terminal Kinase

### K.

KLF: Krüppel-like factor  
Krm1 et Krm2 : Kremen1 et Kremen2

### L.

LEF/TCF : Lymphoid enhancer Factor / T Cell Factor



LIF: Leukemia Inhibitory Factor  
LRP: Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-Related Protein

#### **M.**

MAPK : Mitogen-activated protein kinase  
MCI : Masse Cellulaire Interne  
MEK1-2 : Mitogen-activated protein kinase kinase ou MAP2K ou MAPKKMEF : fibroblastes embryonnaires mitotiquement inactivés  
mES : cellules souches embryonnaires murines  
MP-T : modification post-traductionnelle  
MUSK : Muscle Skeletal Receptor Tyr Kinase

#### **N.**

NFAT : Facteur Nucléaire des lymphocytes T activés

#### **O.**

OCT 4: Octamer-binding transcription factor 4

#### **P.**

PAR: Partitioning defection protein  
PCP : Planar cell polarity  
P/D : axe Proximo-Distal  
PDGFR: Platelet Derived Growth Factor receptor  
PDZ : Postsynaptic density 95, discs large, Zonula occludens-1

p-ERK : forme phosphorylée active de la protéine ERK  
PFA : paraformaldéhyde  
PGK : Phosphoglycerate kinase  
PKC : Protein Kinase C  
PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase  
PLA : Proximity Ligation Assay  
PLCy : Phosphoinositide PhosphoLipase Cy  
POU : Pit-Oct-Unc  
PTK7 : Protein Tyr Kinase7

#### **R.**

RA : acide rétinoïque ou ATRA ou dérivé de la vitamine A  
ROCK : Proteins kinase RHO  
ROR : Tyr kinase-like Orphan Receptor  
RSPO : R-Spondine  
RTK : Recepteur Tyrosine Kinase

#### **S.**

SEF : Similar Expression of Fgf  
SFRP : Secreted Frizzled-Related Proteins  
SH2 : Src Homology-2  
SH3 : Src Homology-3  
SHP2 : Src Homology region 2 domain containing Phosphatase 2  
SMAD : Mother against decapentaplegic homolog  
SOS : Son Of Sevenless  
SOX : SRY (« Sex determining Region Y ») -

related HMG-box (« High mobility group ») gene  
SPRY : Sprouty  
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

#### **T.**

TAD : Domaine Trans-Activateur ou AD  
TE: Trophectoderme  
TEM : transition épithélio-mésenchymateuse  
TGFβ: Transforming Growth Factor  
tPA : tissue plasminogen activator  
TS: Cellules souches trophoctodermiques

#### **U.**

UTR : Untranslated region

#### **V.**

#### **W.**

WIF-1 : Wnt Inhibitory Factor 1  
WNT : Wingless-related mouse mammary tumor virus integration site

#### **X.**

XEN: Cellule Souche de l'Endoderme EXtra-embryonnaire

#### **Y.**

YAP : Yes-Associated Protein



---

## LISTE DES FIGURES

---

- Figure 1 : Représentation schématique du développement pré, péri et post-implantatoire de l'embryon murin
- Figure 2 : Mécanismes d'établissement de forces et des tensions intercellulaires au sein des blastomères murins
- Figure 3 : Divisions cellulaires au sein de l'embryon de souris
- Figure 4 : Modèle de spécification des cellules du TE et de la MCI, dépendant de la position/polarité des cellules et de la signalisation HIPPO dans l'embryon pré-implantatoire
- Figure 5 : Expression du marqueur OCT4 au cours du développement embryonnaire
- Figure 6 : Expression du marqueur SOX2 au cours du développement embryonnaire
- Figure 7 : Patron en poivre et sel de l'expression de Nanog et Gata6 au niveau ARNm et protéique au sein des cellules de la MCI d'embryon préimplantatoire
- Figure 8 : La voie RTK-FGF : branches RTK-FGF/MEK-ERK et RTK-FGF/PI3K-AKT
- Figure 9 : Expression des ligands et récepteurs de la signalisation RTK-FGF au niveau ARNm au cours du développement embryonnaire
- Figure 10 : La perte du FGFR1 entraîne une absence de cellules EPr sauvé en présence d'un seul allèle FGFR1
- Figure 11 : L'ajout des inhibiteurs PD17 + PD032 de la voie RTK, avant la compaction, ne permet pas de restaurer l'expression de GATA6 dans les embryons *Nanog*<sup>-/-</sup>
- Figure 12 : Les mutants *Grb2*<sup>-/-</sup> ne produisent pas d'EPr
- Figure 13 : La modulation de la signalisation RTK-FGF module l'acquisition du destin cellulaire par les cellules de la MCI
- Figure 14 : Le traitement au cocktail 2i (inhibiteurs contre GSK3 + MEK1/2) entraîne une perte du lignage EPr et du TE
- Figure 15 : Analyse de l'expression des marqueurs de l'EPr dans les embryons *Nanog*<sup>-/-</sup>
- Figure 16 : Sauvetage de l'expression de SOX17 et GATA4 par traitement au FGF4 recombinant dans les embryons *Nanog*<sup>-/-</sup>
- Figure 17 : Expression des marqueurs GATA6 et d'un autre marqueur de l'EPr, GATA4, aux stades E4.5 et E5.0
- Figure 18 : Analyse phénotypique des embryons *Gata6*<sup>-/-</sup>
- Figure 19 : Le phénotype de perte d'EPr est sauvé au stade E4.5 dans les embryons *Gata6*<sup>+/-</sup>
- Figure 20 : Mécanismes de spécification des lignages Epi et EPr en trois étapes
- Figure 21 : Développement tardif de l'embryon
- Figure 22 : Origine (à gauche) et formation (à droite) des différentes catégories de cellules souches pluripotentes *in vivo* et *in vitro*
- Figure 23 : Les cellules de carcinomes embryonnaires ECC
- Figure 24 : Potentialité de différenciation des cellules souches au cours du développement embryonnaire et de la vie adulte
- Figure 25 : Relations d'activation ou d'inhibition entre les différents facteurs clés contrôlant l'état de pluripotence
- Figure 26 : Structure de la séquence protéique des facteurs GATA chez les Vertébrés.
- Figure 27 : Evolution des facteurs GATA au cours du temps chez les Métazoaires
- Figure 28 : Organisation génomique du gène *Gata6*, formes transcriptionnelles et traductionnelles (Ensembl)



Figure 29 : Mise en évidence de la phosphorylation *in vitro* de la protéine GATA6 par le cocktail MEK/ERK sur des résidus sérines dans des cellules CaCo2

Figure 30 : Représentation schématique de nouveaux sites de phosphorylation potentiels par la GSK3 sur la forme longue de la protéine GATA6 humaine

Figure 31 : Famille des récepteurs tyrosine kinase (RTK)

Figure 32 : Communications de la voie MEK-ERK vers la voie PI3K-AKT et inversement de la PI3K-AKT vers MEK-ERK .....

Figure 33 : Hypothèses de travail

Figure 34 : Représentation schématique des séquences protéiques des isoformes longues des protéines GATA6

Figure 35 : Alignement des principaux résidus protéiques des isoformes de GATA6 inter-espèces

Figure 36 : Représentation détaillée de la construction plasmidique Pef1a *Gata6* WT

Figure 37 : Carte de pEF1α-AcGFP1-N1 (Clontech).

Figure 38 : Représentation schématique des séquences mutantes de *Gata6*.

Figure 39 : Représentation schématique de l'interruption du gène *Gata6*

Figure 40 : Représentation de la stratégie expérimentale adoptée pour l'analyse de l'expression des marqueurs SOX17 et GATA4

Figure 41 : Expression protéique de SOX17 après 24h de surexpression des formes de *Gata6* en condition contrôle

Figure 42 : Activation de la voie RTK-FGF au sein des cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>

Figure 43 : Expression protéique de SOX17 après 24h de surexpression des formes de *Gata6* en condition contrôle et traitée aux inhibiteurs de la voie RTK-FGF

Figure 44 : Expression protéique de SOX17 après 24h de surexpression des formes de *Gata6* mutées sur les résidus S34, S37 et T509 seuls, en condition contrôle

Figure 45 : Expression protéique de SOX17 après 24h de surexpression des formes de *Gata6* mutées sur les résidus S34, S37 et T509 seuls, en condition contrôle et traitées avec les inhibiteurs des RTK

Figure 46 : Pourcentage de cellules exprimant GATA4 (A, C) ou SOX17 (B, D) parmi la population de cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> (A, B) ou ES WT (C, D) transfectées GFP<sup>+</sup> et traitées avec des inhibiteurs de la signalisation RTK-FGF, après 48h de surexpression de *Gata6*.

Figure 47 : Quantification par RT-qPCR de l'expression, en 24h, de *Gata6* (plasmide), du gène de pluripotence *Nanog*, et des gènes de différenciation de l'EPr *Sox17* et *Gata4*, sur population totale GFP<sup>+</sup> et GFP<sup>-</sup> en condition contrôle.

Figure 48 : Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes de différenciation de l'EPr, sur population totale GFP<sup>+</sup> et GFP<sup>-</sup> en condition contrôle, après 24h de surexpression de *Gata6*.

Figure 49 : Quantification par RT-qPCR de l'expression, en 24h, de *Nanog*, gène de pluripotence et des gènes de différenciation de l'EPr, *Sox17* et *Gata4* après traitement aux inhibiteurs des RTK

Figure 50 : Détail des réglages pour le tri des cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> au FACS ARIA II en condition contrôle avec surexpression de *Gata6* WT après 24h.

Figure 51 : Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes *Gfp* (A) et *Gata6* (plasmide) (B), *Nanog* (C), *Sox17* (D) et *Gata4* (E) après 24h de surexpression du plasmide Pef1a vide et de *Gata6* WT.

Figure 52 : Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes *Gfp* (A) et *Gata6* (plasmide) (B), *Nanog* (C), *Sox17* (D) et *Gata4* (E) après 24h de surexpression du plasmide Pef1a vide, *Gata6* WT et *Gata6* 3mut.

Figure 53 : Observation de l'intensité du signal de fluorescence GFP au sein des cellules transfectées *Gata6*<sup>-/-</sup> de la sous population intermédiaire GFP ++ en condition contrôle ou de double inhibition PD17 + PD032.

Figure 54 : Représentation schématique du système inductible à la Doxycycline au sein des cellules ES KH2



Figure 55 : Représentation schématique des constructions PGK-Gata6 exprimant les formes sauvages ou mutantes de *Gata6* sous la dépendance du promoteur PGK.

Figure 56 : Analyse de l'expression protéique de GATA6 au sein des cellules sauvages ES WT et mutantes ES *Gata6*<sup>-/-</sup>

Figure 57 : Comparaison de taille de la protéine GATA6 au sein des cellules sauvages ES WT et F9.

Figure 58 : Analyse de l'expression protéique de GATA6 au sein des cellules mutantes ES *Gata6*<sup>-/-</sup> avec ou sans traitement aux inhibiteurs PD17 + PD032, 48h de surexpression des constructions Pef1a vide, *Gata6* WT et *Gata6* 3mut.

Figure 59 : Cinétique d'expression de GATA6 après surexpression de Gata6 WT dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>

Figure 60 : Culture des ES *Gata6*<sup>-/-</sup> pendant 4h avec du MG132 après 24h de transfection

Figure 61 : Sauvetage de l'expression de GATA6 par inhibition du protéasome (MG132)

Figure 62 : Test des différents anticorps GFP en Western Blot

Figure 63 : Expression de GATA6 au sein de la sous-population triée GFP++ au FACS Aria II

Figure 64 : Sites potentiels d'ubiquitination de GATA6 souris

Figure 65 : Schéma simplifié des 3 branches activées de la signalisation WNT

Figure 66 : Représentation schématique des interactions entre les trois groupes de GSK et leur implication dans la régulation de diverses signalisations

Figure 67 : Différenciation des cellules XEN en épithélium d'EV après activation de la voie WNT

Figure 68 : Structure protéique des domaines contenus dans chaque membre de la famille DKK

Figure 69 : Modèle des interactions des facteurs DKK avec la signalisation WNT- $\beta$ -caténine: mode d'action des protéines DKK1 et DKK2

Figure 70 : Phénotype des embryons *Dkk1*<sup>-/-</sup>

Figure 71 : Signalisations majeures TGF- $\beta$ /activine/nodal et BMP

Figure 72 : Profil d'expression du marqueur de l'EPr DKK1

Figure 73 : Cultures d'embryons sauvages sans ou avec traitement au DKK1 recombinant (1 $\mu$ g/mL)

Figure 74 : Expression de la Thrombomoduline dans des cellules XEN traitées au DKK1 recombinant après 48h.

Figure 75 : L'inhibition de la GSK3 (BIO) empêche la formation de l'EP *in vitro* au sein de corps embryonnaire formés à partir de cellules F9.

Figure 76 : Culture d'explants de MCI sauvages (*APC*<sup>+/+</sup>) ou mutants (*APC*<sup>min/min</sup>) cultivés durant 72h en milieu N2B27

Figure 77 : Etude de l'épithélisation des explants de MCI sauvages (*APC*<sup>+/+</sup>) ou mutants (*APC*<sup>min/min</sup>) cultivés durant 72h en milieu N2B27.

Figure 79 : Profil d'expression génique de *Noggin*

Figure 78 : Implication de la voie BMP dans le maintien des lignages TE, EPI et PE au sein des embryons au stade E4.5.

Figure 80 : Phénotypes des embryons doubles mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> en fond mixte au stade E4.5.

Figure 81 Phénotype des embryons doubles mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> en fond C57Bl6 pur au stade E4.5.

Figure 82 : Phénotype observé pour chaque génotype pour chaque lignage au stade E4.5

Figure 83 : Phénotype observé pour chaque génotype pour chaque lignage au stade E4.75

Figure 84 : Phénotype sur la migration des cellules d'EPr des embryons simple mutant *Dkk1*<sup>-/-</sup> et doubles mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> en fond C57Bl6 pur au stade E4.5.

Figure 85 : Représentation schématique des plasmides utilisés pour la réalisation des lignées stables inductibles à la Doxycycline



---

## *LISTE DES TABLEAUX*

---

Tableau 1 : Amorces utilisées pour le génotypage des embryons étudiés

Tableau 2 : Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence

Tableau 3 : Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence et Western Blot

Tableau 4 : Séquences des primers ayant servi à la mutagenèse dirigée des résidus d'intérêts de *Gata6*.

Tableau 5 : Séquences des primers ayant servi lors du séquençage des différentes formes mutées créées de *Gata6*

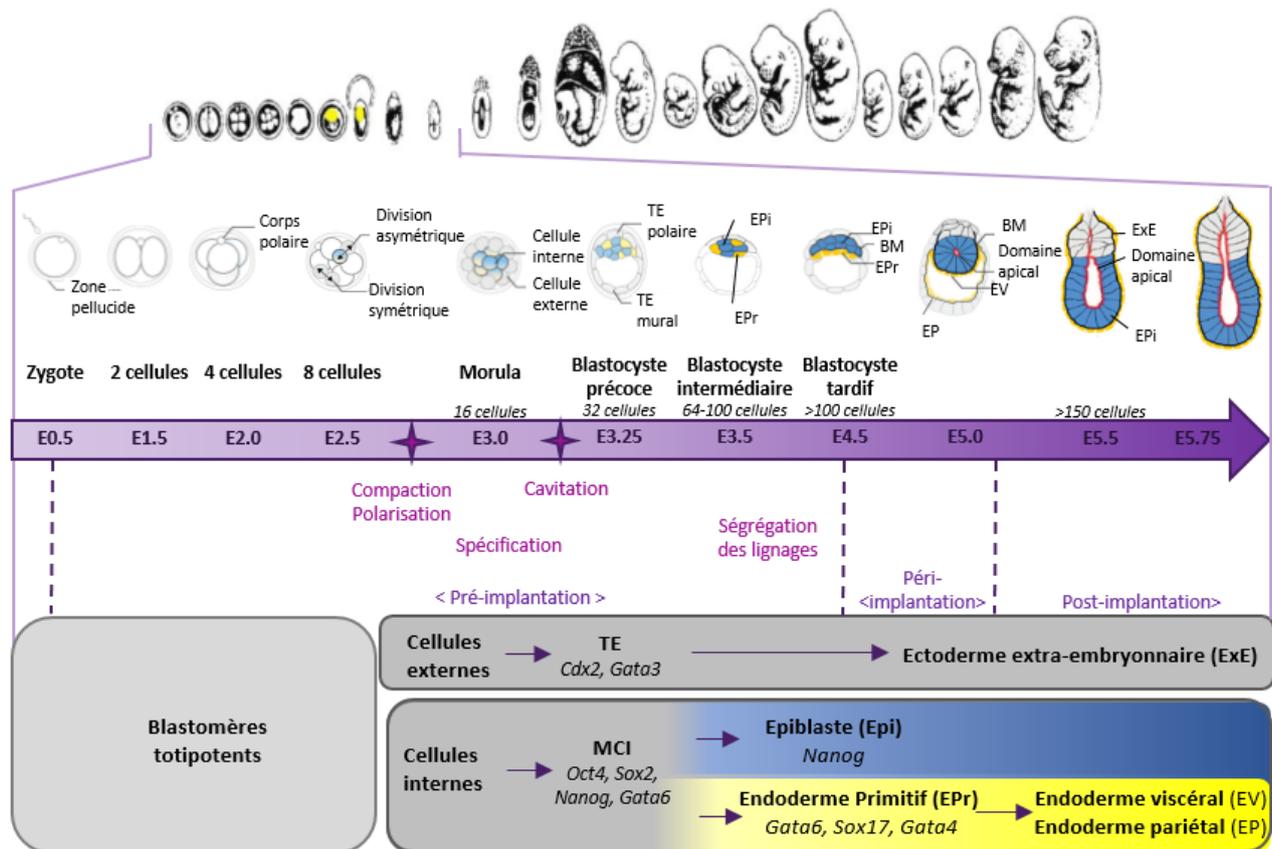
Tableau 6 : Amorces utilisées en q-PCR



---

*INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE*

---



**Figure 1 : Représentation schématique du développement pré, péri et post-implantatoire de l'embryon murin**

(Adaptée de Bedzhov et al 2014)

Epi: Epiblaste, Epr: Endoderme Primitif, TE: Trophectoderme, EV: Endoderme Viscéral, EP: Endoderme Pariétal, BM: membrane basale, ExE: ectoderme extra-embryonnaire

## CHAPITRE 1 - Le développement murin : du processus de fécondation à la constitution d'un fœtus mature

---

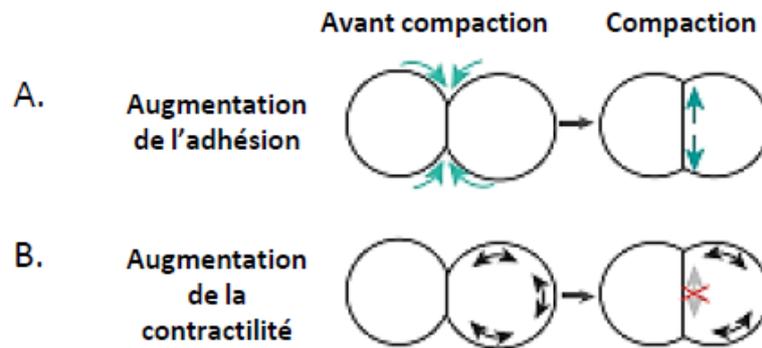
---

Le développement pré-implantatoire correspond à la période de croissance et de maturation de l'embryon depuis la fécondation jusqu'à son implantation dans l'utérus maternel qui a lieu à 4.5 jours de développement (E4.5) (**Figure 1**).

Chez la souris, durant cette période, l'embryon mature et plusieurs étapes se distinguent. Une première phase de décision cellulaire produit les cellules du Trophectoderme (TE), premier lignage caractéristique de l'embryon précoce et les cellules de la Masse Cellulaire Interne (MCI) (**Figure 1**). Ces dernières cellules donnent naissance aux deux autres lignages clés de l'embryon que sont l'Épiblaste (Epi) et l'Endoderme Primitif (EPr) (**Figure 1**). Enfin, au stade E5.5, les cellules d'EPr se différencient en deux populations : l'endoderme viscéral (EV), entourant l'épiblaste mature, et l'endoderme pariétal (EP) composé de cellules ayant migré le long du trophoctoderme. Ces deux derniers tissus endodermiques composent les annexes extra-embryonnaires et ne composent pas l'embryon à proprement parlé mais permettent à celui-ci de subvenir à ces besoins nutritionnels.

Les trois lignages, TE, Epi et EPr, se distinguent sur le plan morphologique et fonctionnel et présentent des devenir divers. En effet, les cellules du TE produiront, pour une partie, le placenta ; les cellules épiblastiques constitueront le fœtus dans son ensemble ainsi que les annexes extra-embryonnaires et les cellules de l'EPr formeront, en partie, le sac vitellin.

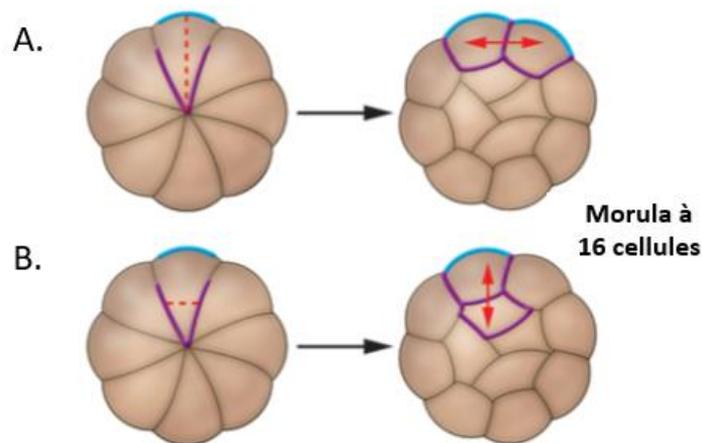
Ainsi composé, l'embryon sera capable de s'implanter dans l'utérus maternel afin de subvenir à ses besoins énergétiques en captant les nutriments maternels.



**Figure 2 : Mécanismes d'établissement des forces et des tensions intercellulaires au sein des blastomères murins**

(Modifiée de Chazaud and Yamanaka 2016)

- A. L'augmentation de l'adhésion entre les cellules favorise le contact cellule-cellule.
- B. L'augmentation de la surface de contractilité corticale contrôle la compaction. Dans ce modèle, le contact entre cellule médié par l'E-cadhérine (CDH1) empêche une augmentation de la contractilité à ce niveau.



**Figure 3 : Divisions cellulaires au sein de l'embryon de souris**

(Modifiée de Cockbrun and Rossant 2010)

Les blastomères, dans l'embryon à E2.5, se divisent suivant deux manières:

- A. parallèlement à l'axe extérieur/intérieur (en pointillés), ce qui produit deux cellules externes, polaires (↔)
- B. perpendiculairement à l'axe extérieur/intérieur (en pointillés) ce qui donne naissance à deux cellules filles: une cellule polaire et une apolaire (↔)

## I Premiers stades de la morula : compaction et polarité

Après la fécondation, le zygote composé de 1 cellule, va subir des divisions cellulaires, successives pour être composé de 2 puis 4 puis 8 cellules, appelées « blastomères » ayant la caractéristique d'être totipotents, sphériques et morphologiquement indistinguables (**Figure 1**). Ainsi, ces cellules peuvent donner l'ensemble des tissus extra-embryonnaires et embryonnaires (pour revue Johnson et McConnell 2004).

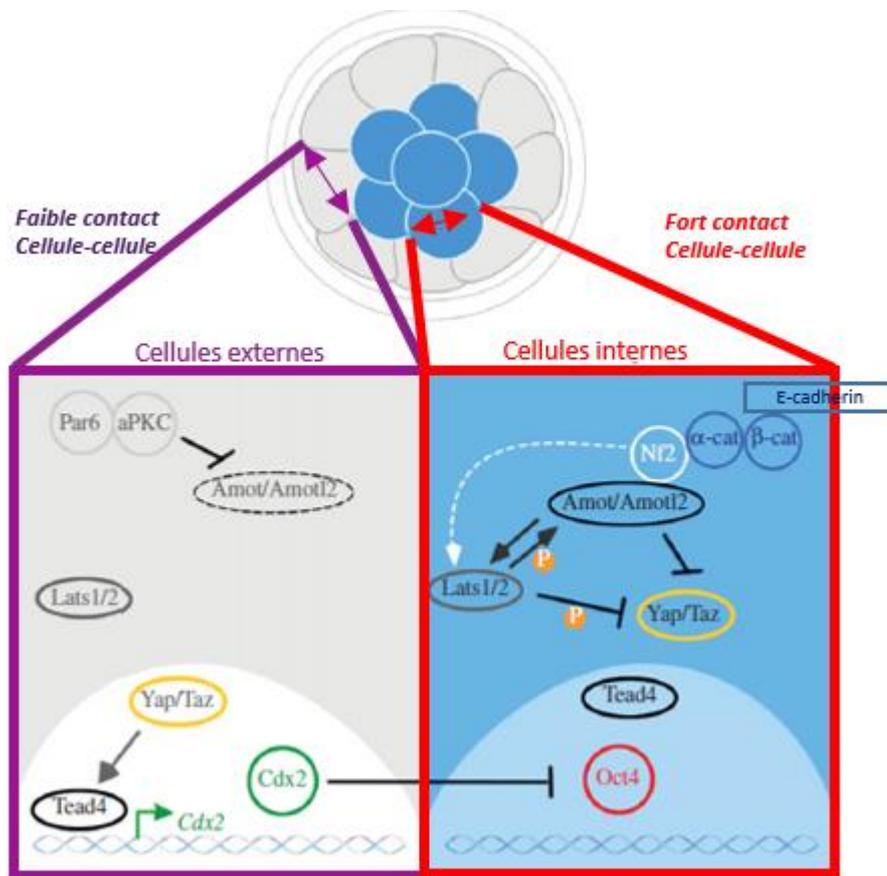
Au stade 8 cellules, les blastomères vont se compacter. La compaction est un processus découlant du renforcement des adhésions et des contacts cellules-cellules dépendants de l'E-CADHERINE (CDH1). Cela est associé à une augmentation des tensions et de la contractilité des cellules ce qui induit la formation d'un proto-épithélium (**Figure 2** - Maître et al., 2015, pour revue Chazaud and Yamanaka, 2016).

Parallèlement, les blastomères se polarisent. Cette polarisation s'opère sans nécessité de contact cellule-cellule. Ainsi, une réorganisation cellulaire a lieu et le côté apical des cellules se distingue en composition protéique du côté basolatéral à la surface cellulaire formant ainsi l'axe apico-basal (Ziomek and Johnson, 1980). Les protéines Ezrine, aPKC (« Atypical Protein Kinase C »), PAR3 (« Partitioning defection 3 ») et PAR6, sont localisées du côté apical (Plusa et al., 2005; Vinot et al., 2005; Yamanaka et al., 2006) et les protéines PAR1, JAM1 et Na/K ATPase sont exprimées du côté basal (Barcroft et al., 2004; Thomas et al., 2004).

Une fois la polarité apico-basale établie, la position des blastomères peut être orientée au sein des embryons entre les stades 8 à 16 cellules *via* le contrôle de l'orientation des divisions. Cette première vague de division cellulaire a lieu suivant différents axes et produit soit (i) deux cellules polarisées, héritant chacune d'une part du domaine apical, soit (ii) d'une cellule polarisée, héritant seule du domaine apical, et d'une cellule non polarisée (**Figure 3** - Cockburn and Rossant, 2010).

Cependant, l'orientation des divisions ne permet pas de maintenir les cellules en position interne au sein de l'embryon par exemple. *Maitre et al* ont montré que la contractilité cellulaire, contrôlée par la polarité apico-basale, était suffisante pour l'internalisation des cellules, ce qui oriente ensuite leur destin cellulaire (Maître et al., 2016). Ainsi, l'internalisation des cellules s'opère par un comportement actif des cellules contrôlé à la fois par l'héritage acquis du domaine apical lors de la division cellulaire (Anani et al., 2014) et par la force engendrée par la constriction apicale (Samarage et al., 2015).

Lors de la transition 16 à 32 cellules, les cellules vont adopter une position interne ou externe. D'une part ; les cellules non polarisées internes vont donner les cellules de la MCI (**Figure 1**). D'autre part, les cellules externes polarisées vont former une monocouche de cellules épithéliales liées entre



**Figure 4 : Modèle de spécification des cellules du TE et de la MCI, dépendant de la position/polarité des cellules et de la signalisation HIPPO dans l'embryon pré-implantatoire**

(Modifiée de Bedhoz et al 2014)

Au stade morula, les cellules ou blastomères sont positionnés aléatoirement. Les blastomères internes (en rouge) présentent des contacts cellules-cellules, forts et symétriques, et vont donner les cellules pluripotentes de la MCI. Les cellules externes (en violet) sont positionnées de façon à avoir des contacts cellules-cellules faibles et asymétriques ce qui va induire la formation du TE. Cette asymétrie cellulaire entraîne une différence en facteur de transcription exprimés et va permettre l'accumulation de protéines de polarité telles que PAR6 et aPKC au domaine apical. L'activité de ces deux protéines inhibe l'activité des kinases LATS de la voie HIPPO et de la protéine AMOT. Il en résulte une levée d'inhibition de YAP/TAZ, via une « non-phosphorylation » de YAP/TAZ, par LATS1/2. Cela rend possible la translocation de YAP/TAZ dans le noyau et induit la fixation de TEAD4 sur des gènes cibles, comme *Cdx2*, qui seront ainsi transcriptionnellement activés.

elles par des jonctions serrées adhérentes et étanches (Fleming et al., 2001). L'épithélium formé par les cellules polarisées donnera naissance aux cellules du TE (**Figure 1**).

## II Première vague de décision de destin cellulaire : TE versus MCI

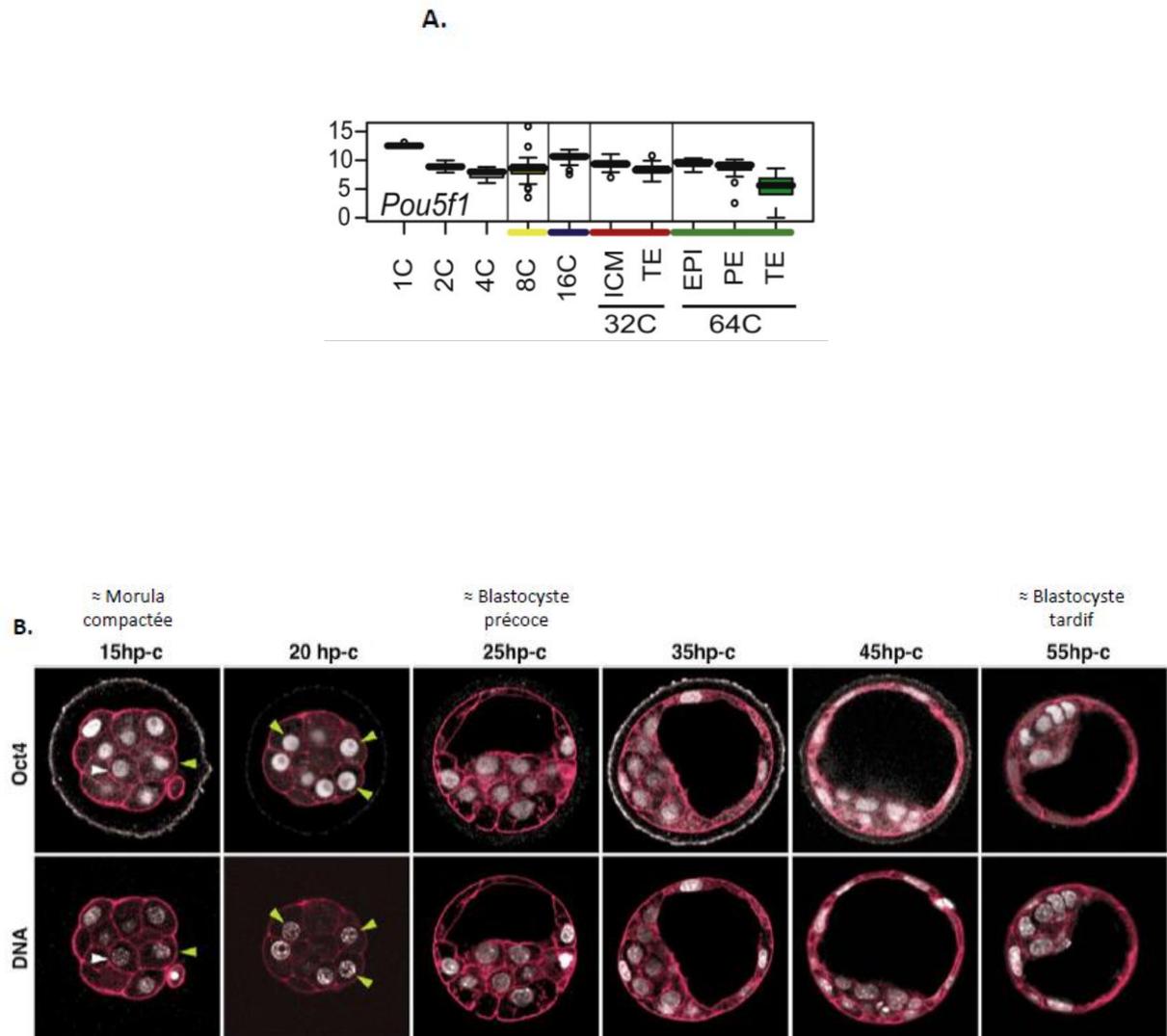
### II.A Etablissement du destin TE

Ainsi, après le stade 32 cellules, des profils d'expression distincts renforcent le choix entre lignage TE ou MCI. Les facteurs de transcription *Cdx2* (« Caudal-related homeobox 2 ») et *Oct4* (« Octamer-binding transcription factor 4 ») sont co-exprimés au stade de 8 cellules puis leur expression se restreint au lignage TE pour *Cdx2* et à la MCI pour *Oct4* au stade E3.25 (Dietrich and Hiiragi, 2007; Guo et al., 2010; Niwa et al., 2005; Palmieri et al., 1994; Ralston and Rossant, 2005). La polarisation et le nombre de divisions asymétriques sont renforcés par la forte expression de CDX2 dans les cellules (Ajduk et al., 2014).

La restriction de l'expression de CDX2 au sein des cellules du TE est contrôlée par la signalisation HIPPO qui joue un rôle primordial dans la ségrégation des blastomères en guidant leur destin cellulaire futur. Cette cascade de protéines à activité Sérine/Thréonine kinase est impliquée dans les connexions entre cellules (**Figure 4** - Nishioka et al., 2009). En effet, l'absence de voie HIPPO dans les cellules externes entraîne l'expression de *Cdx2* alors qu'au sein des cellules internes, l'expression de *Cdx2* n'est pas induite puisque la signalisation HIPPO est activée ce qui permet l'expression d'*Oct4* (**Figure 4** - Nishioka et al., 2009)

Les embrions zygotiques mutants *Cdx2*<sup>-/-</sup> se développent jusqu'au stade E4.5 possiblement grâce à une expression maternelle, néanmoins controversée de *Cdx2* (Jedrusik et al., 2010; Wu et al., 2010). Les embryons mutants montrent des défauts dans le maintien de leur cavité blastocœlique au stade E3.5 avec une perte des jonctions serrées associées à une mauvaise localisation des marqueurs de l'épithélisation tels que l'E-CADHERINE ainsi que des défauts au cours du processus d'éclosion engendrant une mort des embryons (Strumpf et al., 2005; Wu et al., 2010).

Ainsi, *Cdx2* est essentiel à la mise en place d'un TE fonctionnel et pourrait avoir deux rôles : un au cours de la polarisation cellulaire (Jedrusik et al., 2008, 2015) qui permet la spécification du TE et un autre lors du maintien du lignage TE notamment par l'activation de l'expression de gènes tardifs du TE tels que *Gata3* (Ralston et al., 2010; Strumpf et al., 2005). CDX2 est co-exprimé avec GATA3, au niveau nucléaire à partir du stade 16 cellules (Ralston et al., 2010). De plus, même si *Cdx2* n'est pas requis pour l'expression de *Gata3*, GATA3 régule la transcription de *Cdx2* par fixation directe (Home et al., 2009; Ralston et al., 2010).



**Figure 5 : Expression du marqueur OCT4 au cours du développement embryonnaire.**

- A. Expression de l'ARNm du transcrit *Oct4* quantifiée par RT qPCR sur cellule unique au cours du développement embryonnaire. (Issue de Guo et al 2010)
- B. Expression protéique d'OCT4 par immunofluorescence au sein d'embryons aux stades pré-implantatoires déterminés en heures après la compaction (hp-c). (Issue de Dieckrich and Hiiragi 2007)

Enfin, l'expression ectopique de *Cdx2* au sein des cellules souches embryonnaire (ES) est suffisante pour entraîner leur différenciation en cellules ressemblant aux cellules souches trophoctodermiques (TS) (Niwa et al., 2005).

## **II.B Etablissement de la MCI**

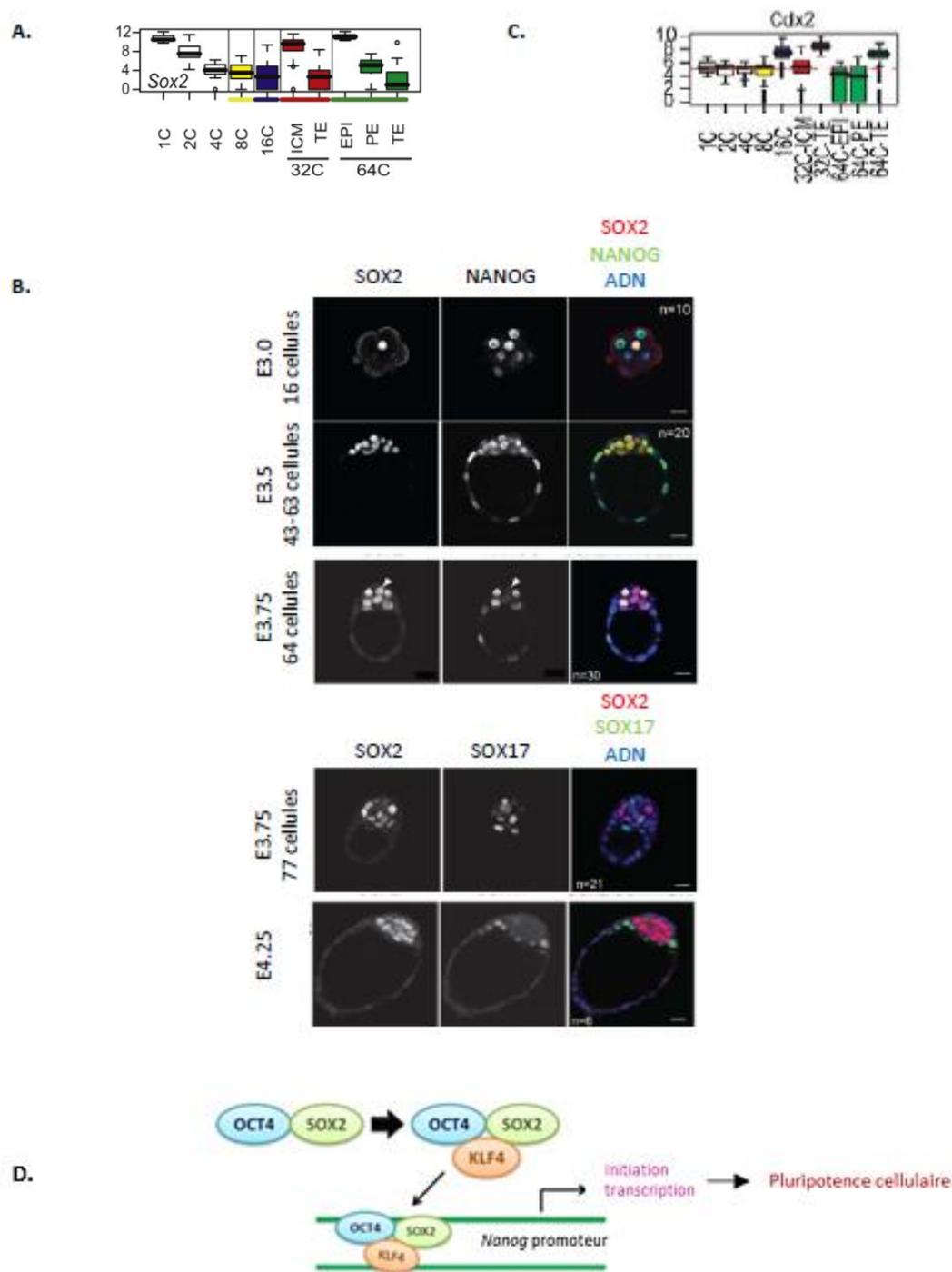
La MCI s'établit à partir des cellules internes non polarisées. Ces cellules se caractérisent par l'absence des marqueurs du TE et par l'expression de marqueurs de pluripotence tels que *Pou5f1* (OCT4) et *Sox2*.

### **II.B.1 Le facteur OCT4 : marqueur de la pluripotence**

Le gène *Pou5f1* code la protéine OCT4, un facteur de transcription à homéodomaine de la famille POU (« Pit-Oct-Unc »). OCT4 joue un rôle clé dans la mise en place de la totipotence/pluripotence (Pesce and Schöler, 2000).

Dans les cellules ES d'ailleurs, une variation de la concentration de la protéine OCT4 induit des dérégulations dans le programme de développement puisque la délétion totale du gène *Pou5f1* ou la diminution de moitié de sa concentration protéique entraîne l'acquisition d'un destin TE. Cela s'accompagne de modifications de morphologie des cellules, de l'expression de *Cdx2* et *Eomes* (Niwa et al., 2000; Velkey and O'Shea, 2003) mais aussi de la déplétion des marqueurs de pluripotence *Sox2*, *Nanog* et *Klf5* (« Krüppel-like factor »). En revanche, la surexpression de *Pou5f1* provoque une différenciation des cellules en EPr (Debeb et al., 2009; Niwa et al., 2000; Ying et al., 2015).

En embryon, l'expression des transcrits *Oct4* débute à partir des stades 2-4 cellules avec une expression zygotique qui relaie une expression maternelle au stade 1 cellule (Guo et al., 2010; Nichols et al., 1998; Pan et al., 2002). Cette expression ARN est ensuite maintenue au sein des cellules de la MCI et des cellules du TE jusqu'au stade 64 cellules (**Figure 5A** - Guo et al., 2010). La protéine OCT4 est, quant à elle, uniformément détectée au sein des embryons à partir de 4 cellules et est maintenue au fil des prochains stades (**Figure 5B** - Plachta et al., 2011). Puis de manière concomitante à la différenciation des cellules du TE, l'expression de la protéine OCT4 est rapidement réprimée dans ces cellules du TE par CDX2 mais elle reste fortement exprimée au sein des noyaux des cellules de la MCI où l'expression de CDX2 ne peut l'inhiber, avec de manière intéressante, une expression plus forte dans les cellules d'EPr nouvellement produites au stade E4.0 (Avilion et al., 2003; Chambers et al., 2007; Dietrich and Hiiragi, 2007; Lin et al., 2010; Mitsui et al., 2003; Niwa et al., 2005; Palmieri et al., 1994; Ralston and Rossant, 2005). Cela explique le fait que OCT4 soit réexprimée au sein des cellules du TE dans les embryons *Cdx2*<sup>-/-</sup> (Strumpf et al., 2005) et le fait que les marqueurs du TE soit exprimés au sein de la MCI des embryons *null Oct4*<sup>-/-</sup> (Nichols et al., 1998). Enfin, au stade E4.5, l'expression



**Figure 6 : Expression du marqueur SOX2 au cours du développement embryonnaire.**

- A. Expression de l'ARNm de *Sox2* quantifiée par RT-qPCR sur cellule unique au cours du développement embryonnaire. (Issue de Guo et al 2010).
- B. Expression de l'ARNm de *Cdx2* quantifiée par RT-qPCR sur cellule unique au cours du développement embryonnaire. (Issue de Wicklow et al 2014).
- C. Expression protéique de SOX2, NANOG et SOX17 par immunofluorescence au sein d'embryons sauvages aux stades pré-implantatoires indiqués (Issue de Guo et al 2010).
- D. Interaction entre OCT4 et SOX2 pour la régulation de la transcription de gènes cibles comme *Nanog* pour le contrôle de la pluripotence (Issue de Lee et al 2016).

d'OCT4 est restreinte aux cellules de l'Epi et est réprimée au sein de l'EPr (**Figure 5** - Grabarek et al., 2012; Ralston et al., 2010).

Les embryons mutants pour *Pou5f1* au niveau zygotique et maternel se développent de manière tout à fait normale jusqu'au stade blastocyste montrant que l'expression maternelle de *Pou5f1* n'est pas cruciale (Frum et al., 2013; Le Bin et al., 2014).

Les travaux de *Le Bin et al*, réalisés avec un système de délétion conditionnelle par la recombinase Cre inducible sur le gène floxé *Pou5f1*, à des stades morula tardive ou blastocyste précoce, ont permis de montrer qu'OCT4 est requis, de manière paracrine pour induire le destin EPr dans les cellules voisines. Cette action passe par l'activation de l'expression du FGF4 par les cellules Epi ce qui va induire dans les cellules voisines l'expression différentielle de gènes impliqués dans la ségrégation du lignage EPr (Le Bin et al., 2014). De plus, les travaux de *Frum et al*, sur embryons *null Oct4*, révèlent l'action cellulaire autonome d'OCT4 pour l'activation de l'expression de gènes de l'EPr tels que *Gata6*, *Sox17*, *Gata4*, *Sox7* et *Pdgfra* (Frum et al., 2013).

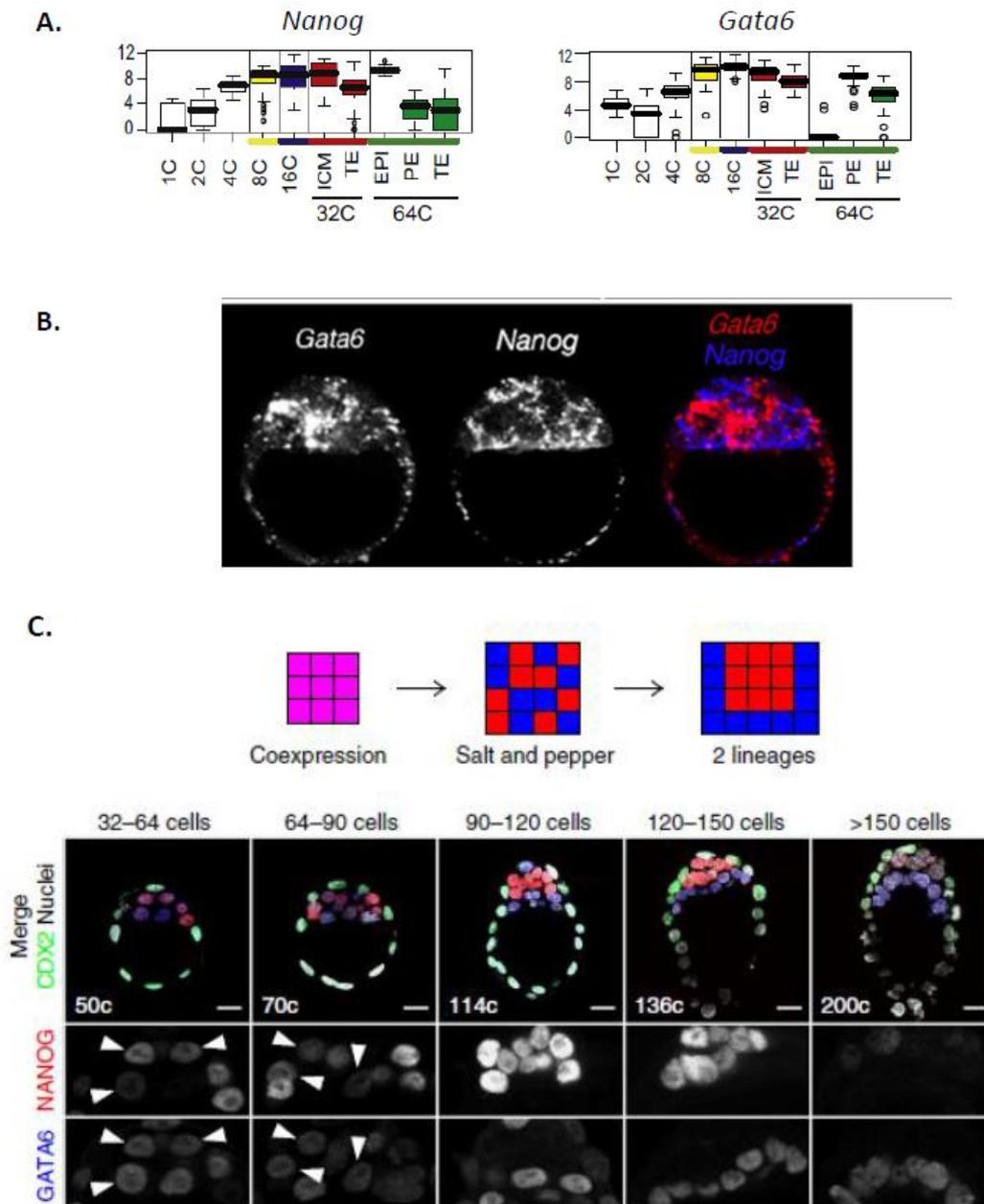
Au sein des embryons mutants, un phénotype tardif est observé au stade E4.0. Malgré la conservation de la distribution des cellules internes et externes ainsi que le maintien de la prolifération et de la survie des embryons ; ceux-ci cavitent partiellement. De plus, la MCI échoue dans le maintien de sa pluripotence. Les cellules de la MCI acquièrent une identité TE avec notamment l'expression de CDX2 (Frum et al., 2013; Nichols et al., 1998; Ralston et al., 2010). Ainsi, l'observation de l'expression renforcée d'OCT4 au sein des cellules d'EPr nouvellement produites au stade E4.0 et le phénotype obtenu dans les embryons mutants pour *Pou5f1* au même stade ont conduit à émettre l'hypothèse qu'une augmentation de l'expression de *Pou5f1* de manière transitoire pourrait être un prérequis pour la différenciation des cellules d'EPr (Frum et al., 2013; Le Bin et al., 2014).

Ainsi, OCT4 est un facteur de transcription indispensable dans la décision du destin MCI *versus* TE et dans les processus de pluripotence/différenciation.

## **II.B.2 Sox2 : marqueur précoce des cellules internes de la MCI et co-facteur d'OCT4 (pour revue Julian et al., 2017; Rizzino and Wuebben, 2016)**

- SOX2 : marqueur précoce des cellules internes

Le marqueur SOX2 appartient à la famille des SOX (« SRY (« Sex determining Region Y ») - related HMG-box (« High mobility group ») gene »). Au sein de l'embryon, le transcrit *Sox2* est exprimé à partir du stade 1 cellule correspondant au transcrit maternel. Puis, l'expression de l'ARNm *Sox2* augmente progressivement pour devenir spécifique des cellules de la MCI au stade 32 cellules et être fortement diminuée dans les cellules du TE (**Figure 6A** - Guo et al., 2010). Ainsi, *Sox2* est le marqueur le plus précoce connu à ce jour de la MCI. L'expression de l'ARNm *Sox2* est inversement corrélée à celle



**Figure 7 : Patron en poivre et sel de l'expression de Nanog et Gata6 au niveau ARNm et protéique au sein des cellules de la MCI d'embryon préimplantatoire**

- Expression des ARNm *Nanog* et *Gata6* quantifiée par RT-qPCR sur cellule unique au cours du développement préimplantatoire (Issue de Guo et al 2010)
- Double hybridation *in situ* montrant l'expression des ARNm de *Gata6* (en rouge) et *Nanog* (en bleu) dans des blastocystes à E3.5. La plupart des cellules expriment soit *Nanog* soit *Gata6*. Peu de cellules co-expriment faiblement *Nanog* et *Gata6*. (Issue de Chazaud et al 2006)
- Modèle de spécification et ségrégation des cellules Epi et Epr montrant les changements d'expression et de position des types cellulaires ; établi à partir d'immunomarquages révélant l'expression de GATA6 (en bleu), NANOG (en rouge) et CDX2 (en vert) au cours du développement embryonnaire du stade 8 cellules à >150 cellules. La protéine GATA6 est détectée dans quelques cellules de la MCI. (Issue de Saiz et al 2016). Les têtes de flèches blanches désignent les cellules co-exprimant NANOG et GATA6. Echelle: 5µm Z-projections.

de l'ARNm *Cdx2* connu pour être le premier marqueur des cellules du TE (**Figure 6A et 6B** - Guo et al., 2010). L'expression des transcrits *Sox2* est initiée après celle des transcrits *Pou5f1* mais elle devient spécifique avant elle au sein des cellules épiblastiques (Avilion et al., 2003; Wicklow et al., 2014).

Au niveau protéique, SOX2 commence à être exprimée au stade 16 cellules dans certaines cellules internes et est co-exprimée avec le marqueur de la MCI NANOG dans les cellules Epi au stade blastocyste à E3.75 (**Figure 7C** - Guo et al., 2010; Wicklow et al., 2014).

Ainsi, l'établissement de mutants maternel et zygotique *Sox2*<sup>-/-</sup> par *Wicklow et al* a permis de montrer que ces embryons étaient correctement formés jusqu'au stade blastocyste avec une expression d'OCT4 normale (Wicklow et al., 2014). Cependant, le nombre de cellules EPr est réduit au sein de ces embryons mutants au stade E3.75 montrant que SOX2 promeut, de manière paracrine, *via* le FGF4, dans les cellules de l'Epi, la différenciation des cellules de l'EPr *via* l'expression de gènes caractéristiques tels que *Sox17*, *Pdgfra* et *Gata4* (Wicklow et al., 2014). Enfin, l'expression de *Sox2* est requise pour le maintien du destin Epi mais pas pour le maintien de l'expression de ces gènes d'EPr (Avilion et al., 2003; Wicklow et al., 2014).

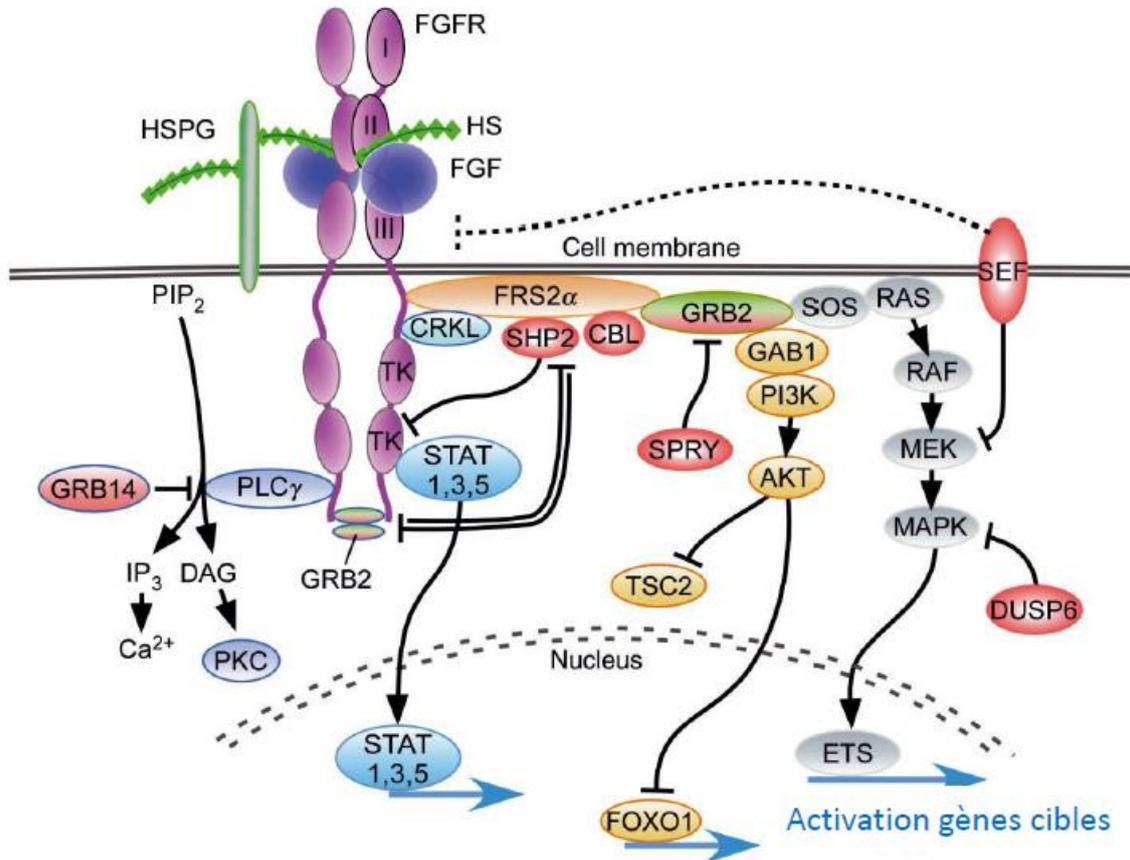
Dans les cellules souches ES, *Sox2* est requis pour l'établissement et le maintien de leur pluripotence ainsi que pour leur auto-renouvellement (Avilion et al., 2003).

- SOX2 : co-facteur d'OCT4 pour le maintien de la pluripotence

Il a été mis en évidence que SOX2 interagit avec OCT4 (**Figure 6D** - Kuroda et al., 2005; Pesce and Schöler, 2001; Rodda et al., 2005; pour revue Lee et al., 2017) pour l'expression de certains gènes cibles comme le marqueur de pluripotence *Nanog*. Néanmoins, il est à noter que *Nanog* est exprimé au sein des embryons homozygotes mutants pour *Oct4* et *Sox2* (Frum et al., 2013; Wicklow et al., 2014) montrant que SOX2 n'est pas requis pour l'initiation de l'expression d'*Oct4* ou *Nanog*.

De plus, il a été observé, dans les cellules ES, que le couple OCT4/SOX2 s'auto-régule positivement *via* une boucle de rétro-contrôle qui leur permet de se fixer directement sur leurs promoteurs (**Figure 6D** - Chew et al., 2005; Okumura-Nakanishi et al., 2005). Enfin, *Chen et al* montrent l'abondance des *enhancers* régulés par OCT4 et SOX2 grâce à des expériences de ChIP (« Immunoprécipitation de la chromatine ») (Chen et al., 2008). Cependant, il a été mis en évidence par *Niwa et al* que SOX2 n'est pas indispensable pour le maintien de la pluripotence des cellules dans le cas où OCT4 est artificiellement maintenu (Niwa et al., 2000).

De manière surprenante, lorsque *Sox2* est réprimé dans les cellules ES, les transcrits *Sox2*, *Oct4* et *Nanog* sont aussi réprimés induisant une perte de pluripotence et la différenciation en TE (Chew et al., 2005; Masui et al., 2007). Ainsi, le facteur SOX2, lié à OCT4, permet de réguler des gènes de pluripotence et ils constituent avec le facteur NANOG un complexe de régulateurs clés dans ce type de processus (Gao et al., 2012).



**Figure 8 : La voie RTK-FGF : les branches RTK-FGF/MEK-ERK et RTK-FGF/PI3K-AKT**

(Issue de Ornitz and Itoh 2015)

La fixation du ligand FGF sur le récepteur FGFR, interagissant avec les molécules d'héparane sulfate (HSPG ou HS), induit la formation d'une structure tertiaire FGF-FGFR-HSPG qui active le domaine tyrosine kinase intracellulaire par phosphorylation de résidus tyrosines spécifiques.

Cette activation va transmettre le signal en intracellulaire *via* plusieurs branches:

La branche RAS-MAPK (en gris)

La branche PI3-AKT (en jaune)

La branche PLC (en bleu foncé)

La branche STAT (en bleu clair)

### **III Différenciation de la MCI en Epi et EPr**

Au sein de l'embryon, lors de la cavitation, la MCI devient hétérogène. En effet, à cette étape, la MCI va produire deux lignages distincts : l'épiblaste (Epi) et l'endoderme primitif (EPr) (**Figure 1**).

#### **III.A Spécification des cellules de la MCI : expression des marqueurs NANOG et GATA6**

Il est admis que l'hétérogénéité clé dans la spécification et la différenciation de l'Epi et d'EPr est celle visualisée par les facteurs de transcription NANOG et GATA6, respectivement. En effet, ces deux marqueurs sont co-exprimés, au niveau transcriptionnel et protéique, dans tous les blastomères au stade 8 cellules (**Figure 7A** - Dietrich and Hiiragi, 2007; Plusa et al., 2008) jusque vers le stade 32 cellules.

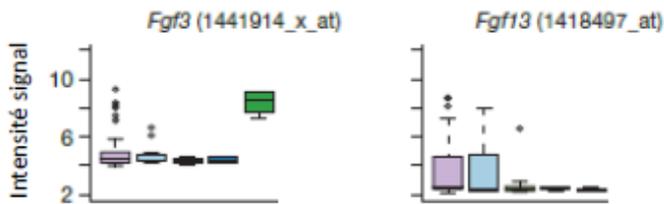
Certaines cellules de la MCI vont exprimer préférentiellement NANOG alors que d'autres exprimeront GATA6 (Chazaud et al., 2006; Guo et al., 2010; Kurimoto, 2006). Par conséquent, un patron particulier, au niveau ARNm et protéique, est généré et appelé « poivre et sel » au stade E3.75 (**Figure 7B et 7C** - Chazaud et al., 2006; Guo et al., 2010; Kurimoto, 2006; Plusa et al., 2008; Saiz et al., 2016). Ce patron dépend de la répression d'un des deux marqueurs au détriment de l'autre. Le premier élément d'établissement de cette organisation est l'expression préférentielle de NANOG au détriment de celle de GATA6 au sein de certaines cellules indépendamment de leur localisation au sein de la MCI (Bessonard et al., 2014; Chazaud et al., 2006; Guo et al., 2010; Kurimoto, 2006; Plusa et al., 2008). L'apparition de l'expression exclusive de soit NANOG soit GATA6 ne se fait pas au même moment dans chaque cellule : on parle donc d'asynchronie. Les premières cellules commencent à s'engager vers E3.25 alors que les dernières débutent leur engagement vers le stade E3.75. Ainsi, au stade E3.5, trois types cellulaires composent la MCI : des cellules NANOG positives et GATA6 négatives, des cellules GATA6 positives et NANOG négatives ou encore des cellules co-exprimant NANOG et GATA6. Le patron en « poivre et sel » est ainsi formé (**Figure 7B** - Bessonard et al., 2014; Chazaud et al., 2006; Gerbe et al., 2008; Guo et al., 2010; Kurimoto, 2006; Meilhac et al., 2009; Plusa et al., 2008; Xenopoulos et al., 2012).

#### **III.B Implication de la signalisation RTK-FGF/MEK-ERK : contrôle de la spécification en Epi et EPr.**

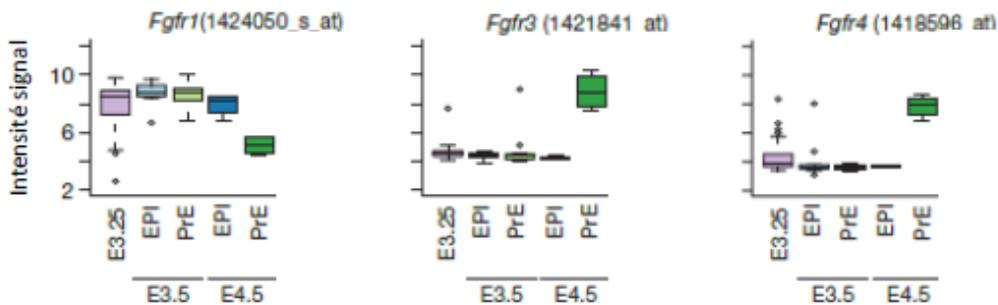
Depuis quelques années, de nombreux travaux montrent l'importance des signaux extracellulaires et de l'environnement externe des cellules pour leur devenir. Il est maintenant établi que des voies de signalisation telles que la voie des RTK (« Receptor tyrosin kinase ») et en particulier la branche des protéines MAPK (« Mitogen Mitogen-activated protein kinase ») -MEK-ERK, induite par le FGF (« Fibroblast Growth Factor ») (**Figure 8**) joue un rôle prépondérant dans le choix de ce devenir cellulaire entre Epi et EPr.

A.

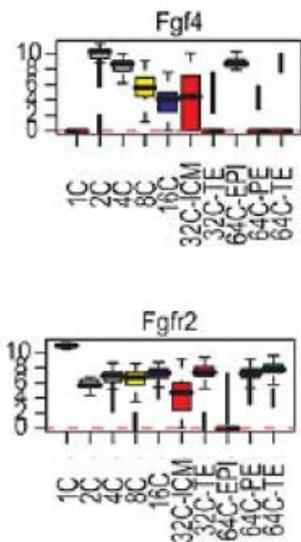
Ligands FGF



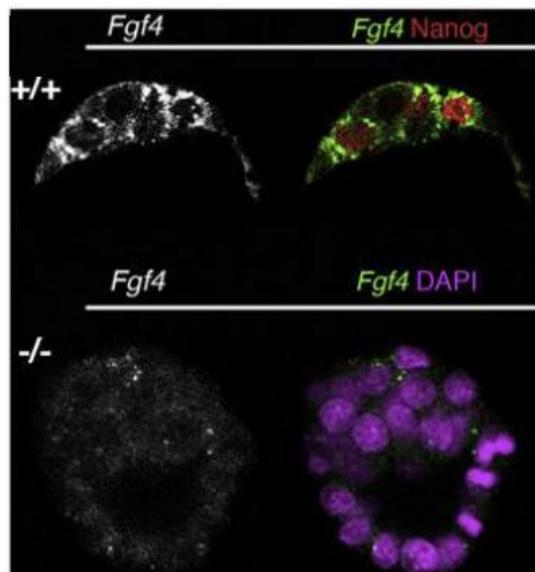
Récepteurs FGFR



B.



C.



**Figure 9 : Expression des ligands et récepteurs de la signalisation RTK-FGF au niveau ARNm au cours du développement embryonnaire**

- A. Expression des ARNm *Fgf3* et *Fgf13* (ligands FGF) et *Fgfr1*, *Fgfr3* et *Fgfr4* (Récepteurs FGFR) quantifiée par RT-qPCR sur cellule unique à différents stades du développement préimplantatoire (Issue de Ohnishi et al 2013) (66 cellules d'embryon WT dont 36 cellules de 6 embryons à E3.25, 11 cellules d'Epi et d'Epr d'embryon à E4.5 respectivement).
- B. Expression des ARNm *Fgf4* et *Fgfr2* quantifiée par RT-qPCR sur cellule unique au cours du développement préimplantatoire (Issue de Guo et al 2010)
- C. Hybridation *in situ* montrant l'expression de l'ARNm *Fgf4* (en vert) et de l'expression protéique de NANOG (en rouge) dans des blastocystes à E3.75. Les cellules qui expriment NANOG expriment *Fgf4*. (Issue de Frankenberg et al 2011)

La signalisation RTK est composée de récepteurs transmembranaires distribués en différentes classes comme le FGFR (« Fibroblast Growth Factor Receptor »), l'EGFR (« Epidermal Growth Factor Receptor »), l'IGFR (« Insulin Growth Factor Receptor »), le PDGFR (« Platelet Derived Growth Factor Receptor »), etc ; et de ligands de type facteurs de croissance, cytokines ou intégrines qui vont permettre de transmettre un signal externe au sein de la cellule. Chez les vertébrés, il existe 22 ligands FGF et 5 récepteurs et seuls ceux pour laquelle leur délétion est délétaire chez la souris seront abordés ci-après (pour revue Lanner et Rossant 2010; Ornitz et Itoh 2015).

### III.B.1 Les ligands de la voie FGF-MEK-ERK

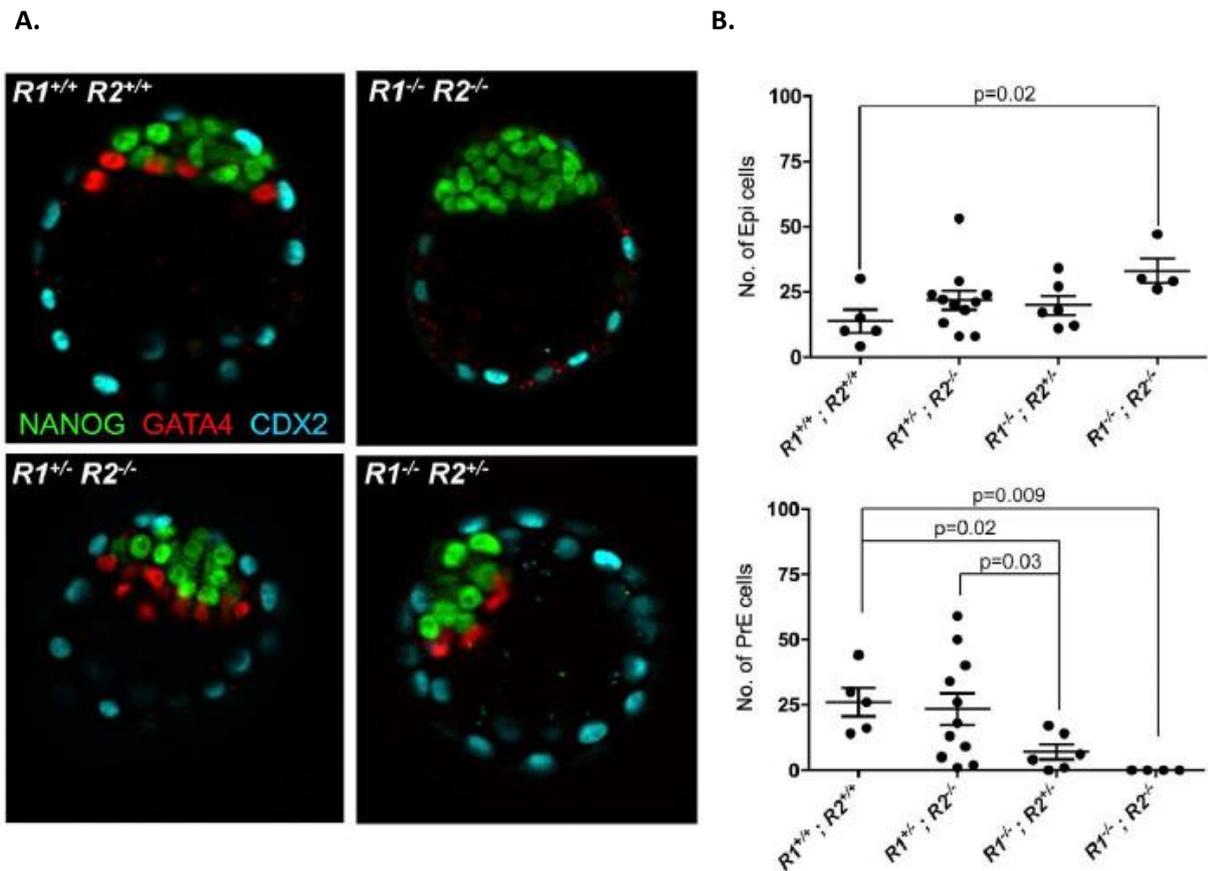
Les 22 ligands FGF ne sont pas tous exprimés en même temps et dans les mêmes types cellulaires au cours du développement précoce puisqu'il a été mis en évidence que seul le *Fgf1* est exprimé au stade morula (Boroviak et al., 2015), seuls les ligands *Fgf4* et *Fgf13* sont exprimés au sein de la MCI au stade E3.25 (**Figure 9A** - Boroviak et al., 2015; Ohnishi et al., 2014). Il est à noter tout de même que l'expression du *Fgf4* est nettement plus forte au stade E3.25 (32 cellules) et est restreinte au sein de l'Epi aux stades E3.5 et E4.5 (**Figure 9A** - Ohnishi et al., 2014). Enfin, on retrouve les ligands *Fgf10* et *Fgf3* au sein des cellules d'EPr et le ligand *Fgf4* dans les cellules d'Epi au stade E4.5 avant l'implantation, cellules dans lesquelles s'ajoutent les *Fgf8* et *Fgf15* lorsque l'embryon est implanté (Boroviak et al., 2015; Niswander and Martin, 1992).

Il a été mis en évidence que les ligands *Fgf3* et *Fgf4* étaient inversement régulés dans les cellules de carcinome embryonnaire puisque ces cellules, à l'état indifférencié, sont FGF4 positives et FGF3 négatives alors qu'une fois différenciées en endoderme pariétal notamment, ces cellules sont FGF3 positives et FGF4 négatives (Velcich et al., 1989).

- Focus sur le ligand FGF4

Différents travaux montrent que la commutation d'expression entre NANOG et GATA6 pour l'établissement de leur expression exclusive est due à l'expression du ligand FGF4.

Si l'on surexprime, par ajout de protéine recombinante, du FGF4 dans des embryons sauvages en culture, les cellules EPr sont induites au détriment des cellules Epi (**Figure 9B** - Saiz et al., 2016; Yamanaka et al., 2010). Au contraire, l'inhibition de la voie RTK-FGF/MEK-ERK, en utilisant un inhibiteur du FGFR1, affecte massivement le lignage EPr en inhibant sa spécification et promeut le lignage Epi exprimant NANOG (Saiz et al., 2016). Ainsi, l'activité p-ERK semble cruciale pour le choix entre Epi et EPr. L'interaction, ou du moins le réseau établi entre NANOG, GATA6 et l'activité p-ERK, a été étudiée et simulée *via* un modèle mathématique dans des travaux menés par notre équipe (Bessonard et al., 2014).



**Figure 10 : La perte du FGFR1 entraîne une absence de cellules EPr sauvé en présence d'un seul allèle FGFR1**

(Issue de Molotkov et al 2017)

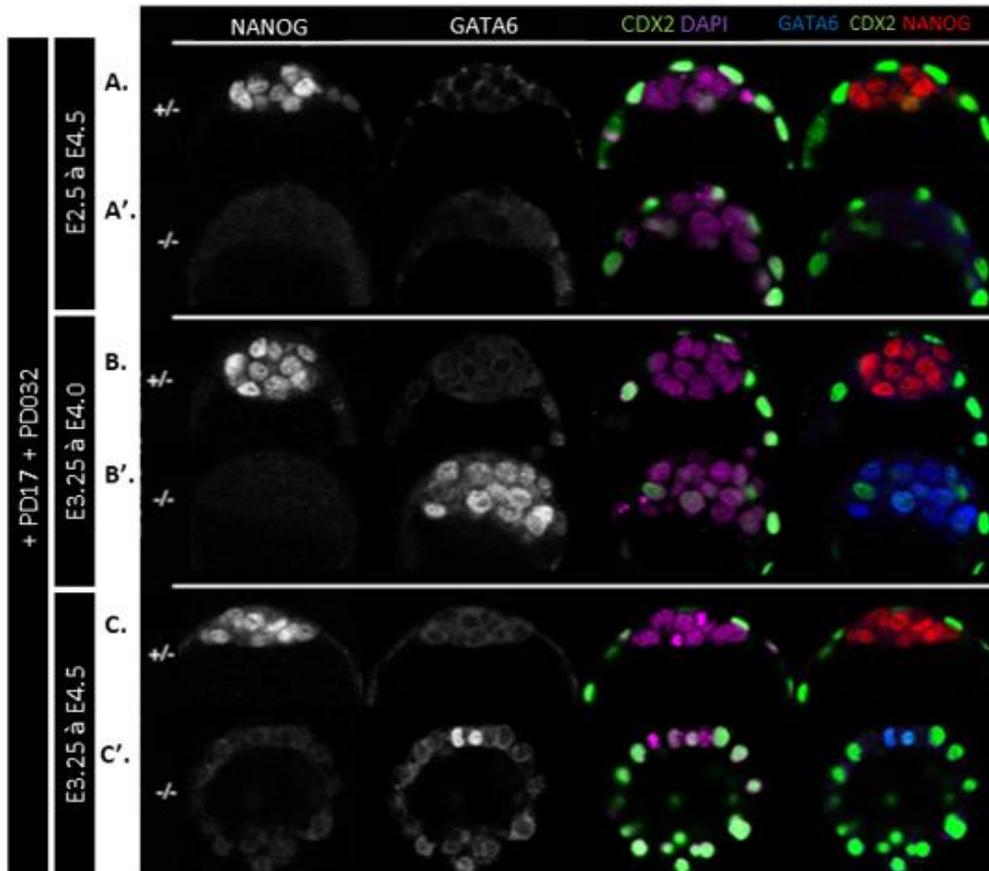
- Immunofluorescence de NANOG (en vert), GATA4 (en rouge) et CDX2 (en bleu) dans des blastocystes tardifs en fond C57Bl6 pur. R1 = FGFR1, R2 = FGFR2.
- Le nombre de cellules NANOG positives (Epi) et GATA4 positives (EPr) a ensuite été compté pour chaque génotype et les résultats sont représentés avec moyenne  $\pm$  SEM.

*Fgf4* présente une expression maternelle (Rappolee et al., 1994) qui est substituée par une expression zygotique hétérogène au sein de la MCI à E3.25 (Frankenberg et al., 2011; Guo et al., 2010; Krawchuk et al., 2013; Kurimoto, 2006). Cette hétérogénéité permet d'émettre l'hypothèse que le *Fgf4* pourrait être la cause de l'asynchronie dans le choix du destin cellulaire de la MCI (**Figure 9A et B** -Guo et al., 2010; Krupa et al., 2014; Ohnishi et al., 2014) ou la conséquence en aval de Nanog puisque le FGF4 est une protéine sécrétée, au stade E3.5, par les cellules de l'Epi exprimant NANOG et son relargage dans l'espace intercellulaire permet d'agir sur les cellules voisines d'EPr afin de renforcer leur devenir. Cette protéine a donc une action paracrine (**Figure 9C** - Frankenberg et al., 2011; Guo et al., 2010; Ohnishi et al., 2014).

Les embryons mutants zygotiques *Fgf4*<sup>-/-</sup> meurent juste après l'implantation (Feldman et al., 1995; Zhong et al., 2006). Ils présentent des défauts de prolifération de la MCI lorsque celle-ci est cultivée en explant (Feldman et al., 1995) ainsi que des défauts de ratio Epi *versus* EPr. En effet, malgré l'expression de GATA6 à E3.25, aucun marqueur tardif comme SOX17 et GATA4 n'est exprimé dans ces embryons révélant un échec dans la différenciation en EPr alors que l'ensemble des cellules de la MCI expriment NANOG (Kang et al., 2013; Krawchuk et al., 2013). Cela phénocopie des mutants maternel et zygotique *Fgf4*<sup>-/-</sup> (Krawchuk et al., 2013). De la même manière, les mutants *Fgfr1*<sup>-/-</sup> *Fgfr2*<sup>-/-</sup> présentent une expression ubiquitaire de NANOG (**Figure 10** - Kang et al., 2013; Krawchuk et al., 2013; Molotkov et al., 2017). L'expression de GATA6 est initiée mais ne peut être maintenue au stade E3.25. Cela montre que son expression est régulée par un mécanisme en 2 étapes : (1) une étape d'initiation de son expression au stade 4-8 cellules (E2.5) indépendante de l'expression du *Fgf4* ; puis (2) entre les stades morula et blastocyste précoce (E3.5), l'expression de GATA6 est maintenue à un niveau élevé alors que l'expression de NANOG est réprimée ce qui conduit les cellules vers un destin d'EPr. Cette étape ne requiert pas l'activation directe par la signalisation RTK-FGF et est potentiellement maintenue par un autre mécanisme d'autorégulation (Frankenberg et al., 2011; Kang et al., 2013). Les facteurs impliqués dans l'initiation des marqueurs GATA6, au stade 4 cellules, et NANOG, au stade 2-4 cellules, restent pour l'heure inconnus.

Cependant, des expériences faites au sein de notre équipe montrent que si l'on cultive des embryons mutants *Nanog*<sup>-/-</sup> avec des inhibiteurs du FGFR1 (PD17) et de MEK1/2 (PD032) (« Mitogen-activated protein kinase kinase »), avant leur compaction, on observe que l'initiation de l'expression de *Gata6* n'est pas induite contrairement aux embryons mutants *Nanog*<sup>-/-</sup> non traités avec ces inhibiteurs (**Figure 11** -Frankenberg et al., 2011). Ainsi, un ligand de la voie RTK, autre que le *Fgf4*, est impliqué dans l'induction de l'expression de *Gata6*.

Il a été montré que l'activation de l'expression du *Fgf4* requiert la coopération et l'interaction physique entre les protéines OCT4 et SOX2 qui forment ainsi un complexe SOX2/OCT4 (**Figure 6D** - Dailey et al., 1994; Yuan et al., 1995). Cela est confirmé par le niveau d'expression plus faible du *Fgf4*



**Figure 11 : L'ajout des inhibiteurs PD17 + PD032 de la voie RTK, avant la compaction, ne permet pas de restaurer l'expression de GATA6 dans les embryons *Nanog*<sup>-/-</sup>**

(Modifié de Frankenberg et al 2011)

Culture d'embryons hétérozygotes *Nanog*<sup>+/-</sup> en absence (A, B, C) ou des embryons homozygotes *Nanog*<sup>-/-</sup> en présence (A', B', C') des inhibiteurs PD17 (contre FGFR1) et PD032 (contre MEK1/2) des stades E2.5 à E4.5 (A, A') ; des stades E3.25 à E4.0 (B, B') ou E4.5 (C, C') et immunomarqués avec NANOG (en rouge), GATA6 (en bleu) et CDX2 (en vert).

dans les embryons *Oct4*<sup>-/-</sup> et *Sox2*<sup>-/-</sup> engendrant une diminution du nombre de cellules EPr au stade E4.0. Cela est associé à une absence d'expression des marqueurs de l'EPr tels que SOX17 et GATA4 (Frum et al., 2013; Nichols et al., 1998; Wicklow et al., 2014) avec une différence pour les embryons *Sox2*<sup>-/-</sup> qui réactivent l'expression de ces marqueurs au stade blastocyste tardif (Wicklow et al., 2014).

Concernant le marqueur de pluripotence OCT4, son expression est maintenue au sein de ces embryons mutants *Fgf4*<sup>-/-</sup>, ce qui montre qu'elle n'est pas dépendante du *Fgf4*. De plus, l'identité des cellules induites par OCT4 ou celle du TE n'est pas modifiée (Goldin and Papaioannou, 2003).

Cependant, cette même étude montre qu'au stade E4.5, le *Fgf4* est requis pour le maintien de l'expression du récepteur *Fgfr2* au sein du TE alors que son expression n'est pas affectée plus précocement à E3.5. En accord avec ces résultats, le phénotype observé dans les embryons *Fgfr2*<sup>-/-</sup> montre que la perte d'expression de ce récepteur est la cause de la mort des embryons *Fgf4*<sup>-/-</sup>. La létalité s'explique par l'affection du nombre total de cellules et en particulier du nombre de cellules NANOG positives (Kang et al., 2017; Molotkov et al., 2017).

De plus il a été montré un effet dose de l'expression du *Fgf4* (Krawchuk et al., 2013). Les expériences de sauvetage du phénotype d'absence de cellules EPr dans les embryons mutants zygotiques *Fgf4*<sup>-/-</sup>, par addition graduelle de FGF4 exogène, sont concluantes et révèlent une spécification normale de la MCI (Krawchuk et al., 2013).

Enfin, la contribution maternelle du FGF4 a été mise en évidence avec les mutants maternels *Fgf4*<sup>+/-</sup> qui présentent une réduction de la proportion du lignage EPr, au stade E3.75, par rapport aux mutants zygotiques *Fgf4*<sup>+/-</sup> (Krawchuk et al., 2013).

### **III.B.2 Les récepteurs de la voie RTK-FGF au cours de l'embryogenèse précoce**

Chez la souris, parmi les différents récepteurs de la voie, il a été mis en évidence que le récepteur *Fgfr2* est précocement et principalement exprimé dès le stade 1 cellules puis son expression est réduite mais reste détectée des stades 2 cellules à E3.25 (**Figure 9B** - Boroviak et al., 2015; Guo et al., 2010; Ohnishi et al., 2014). Son expression se restreint ensuite aux lignages TE et EPr (**Figure 9B** - Boroviak et al., 2015; Guo et al., 2010; Kang et al., 2017; Ohnishi et al., 2014). Le récepteur *Fgfr1* est retrouvé exprimé dès le stade morula puis au stade E3.5 au sein des cellules Epi et EPr. Enfin son expression est réduite, voire nulle, au sein des cellules EPr au stade tardif E4.5 (**Figure 9A** - Kang et al., 2017; Ohnishi et al., 2014). Il est néanmoins important de noter qu'aux stades précoces, les autres récepteurs *Fgfr3* et *Fgfr4* sont exprimés à des niveaux très faibles ; leur expression n'augmente qu'au stade E4.5 au sein des cellules EPr (**Figure 9A** - Ohnishi et al., 2014).

La délétion du *Fgfr2* provoque elle aussi un phénotype embryonnaire avec un défaut de maturation des cellules EPr (Kang et al., 2017; Molotkov et al., 2017). En effet, les embryons *Fgfr2*<sup>-/-</sup> meurent au stade E10.5, après l'implantation qui a lieu de manière aléatoire (Yu et al., 2003).



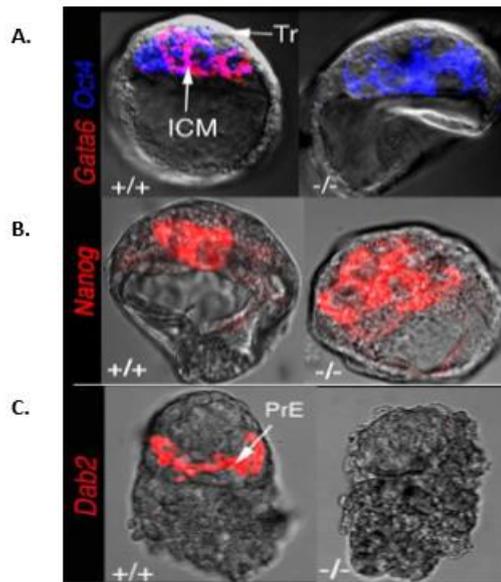
Néanmoins le phénotype observé au niveau du lignage EPr est moindre que celui observé dans les embryons *Fgfr1*<sup>-/-</sup> (Kang et al., 2017; Molotkov et al., 2017). Ces embryons *Fgfr2*<sup>-/-</sup> présentent une forte réduction du nombre de cellules NANOG positives comparés aux embryons simples mutants pour *Fgfr1*<sup>-/-</sup> (Kang et al., 2017). Le rôle du *Fgfr2* dans la formation du lignage EPr et sa maturation est aussi mis en lumière lorsque le *Fgfr2* est surexprimé au stade 2 cellules au sein de la MCI engendrant une surproduction de cellules d'EPr (Morris et al., 2013).

L'analyse des simples mutants *Fgfr1*<sup>-/-</sup> et *Fgfr2*<sup>-/-</sup>, confirme que, malgré l'expression spécifique du FGFR2 dans les cellules d'EPr et l'expression ubiquitaire du FGFR1 au sein de la MCI, c'est le FGFR1 qui est responsable de l'acquisition du destin EPr (Kang et al., 2017). Les deux récepteurs sont requis pour régir, au niveau temporel, l'acquisition du destin cellulaire mais le FGFR1 est le récepteur principal et critique.

Les embryons *Fgfr1*<sup>-/-</sup> *Fgfr2*<sup>-/-</sup> activent initialement l'expression de NANOG et GATA6 mais cela s'associe à une perte d'expression de GATA6 au stade E4.5 et donc des dérivés tardifs de l'EPr, comme constaté en embryons *Fgf4*<sup>-/-</sup>, montrant que les autres récepteurs FGFR3 et FGFR4 ne compensent pas la perte des deux autres récepteurs (**Figure 10** - Kang et al., 2017; Molotkov et al., 2017). Un effet dose est observé dans l'expression du *Fgfr1* puisque la présence d'un seul allèle sauvage est suffisant pour la spécification des cellules GATA6 positives et NANOG négatives en EPr (**Figure 10** - Molotkov et al., 2017). En outre, le traitement avec un ligand de la voie, le FGF4, d'embryons simples mutants *Fgfr1*<sup>-/-</sup> exprimant le FGFR2, ne permet pas de réprimer l'expression de NANOG et de convertir l'ensemble des cellules de la MCI en cellules d'EPr exprimant GATA6 (Kang et al., 2017).

En conclusion, FGFR1 est donc le récepteur primaire au FGF4 pour l'établissement du lignage EPr et est le récepteur par lequel la signalisation FGF module l'expression de NANOG et contrôle son maintien. En effet, sa délétion bloque la répression de ce marqueur et empêche la progression de la maturation des cellules de l'Epi des stades E3.5 à E4.5 (Kang et al., 2017). Quant à FGFR2, l'hypothèse émise est qu'il régulerait finement l'expression de NANOG de manière paracrine, en limitant la fixation du FGF4 sur le FGFR1.

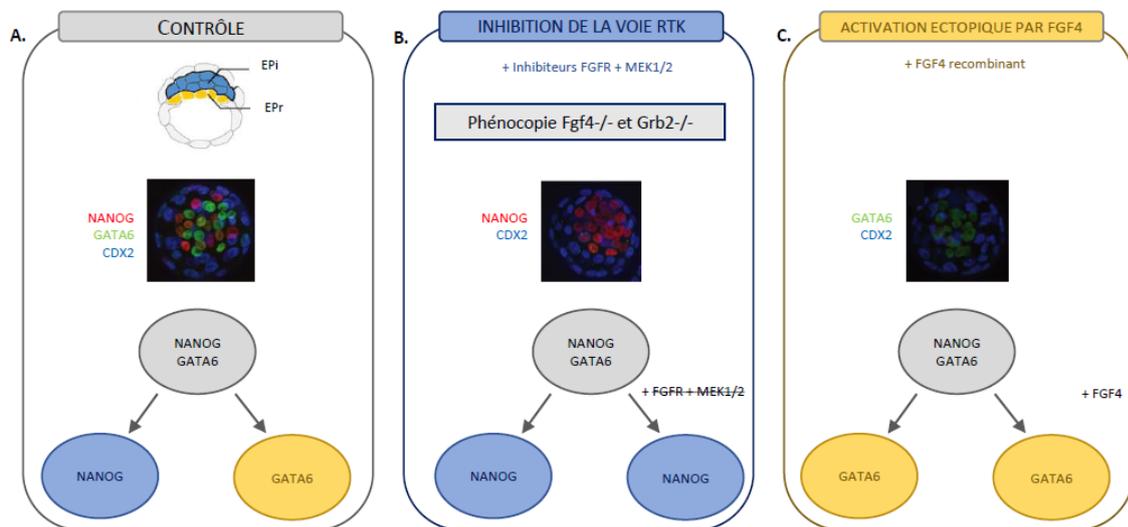
La proportion entre TE *versus* MCI au sein de ces embrions mutants est dérégulée en faveur du nombre de cellules de la MCI montrant le rôle de la signalisation RTK-FGF à travers les récepteurs FGFR1 et FGFR2 pour la régulation, non pas de la spécification mais de la prolifération de ce compartiment (Kang et al., 2017), confirmant les résultats obtenus par traitement d'embryons sauvages avec un inhibiteur des protéines MEK-ERK (Nichols et al., 2009). Enfin, FGFR1 est aussi essentiel pour la différenciation des cellules ES dans les cellules XEN (« Cellules Souches de l'Endoderme EXtra-embryonnaire » voir Chapitre 2) et pour le maintien de l'état de pluripotence de ces cellules (Molotkov et al., 2017).



**Figure 12 : Les mutants *Grb2*<sup>-/-</sup> ne produisent pas d'EPr**

(Issue de Chazaud and Rossant 2006)

Hybridation *in situ* de l'expression de *Gata6* (A), *Nanog* (B) ou *Dab2* (C) (en rouge) et de *Oct4* (en bleu) dans des embryons sauvages ou mutants *Grb2*<sup>-/-</sup> aux stades E3.5 (A, B) et E4.75 (C).



**Figure 13 : La modulation de la signalisation RTK-FGF module l'acquisition du destin cellulaire par les cellules de la MCI**

**A.** Les embryons sauvages cultivés en condition contrôle développent une MCI normale avec un patron en « poivre et sel ».

**B.** Les cellules de la MCI des embryons traités en présence d'inhibiteurs de la voie RTK-FGF/MEK-ERK (inhibiteurs FGFR + MEK1/2 soit PD17 + PD032) expriment toutes NANOG et se spécifient en Epi.

**C.** Les cellules de la MCI des embryons traités en présence de FGF4 recombinant exogène expriment toutes GATA6 et se spécifient en EPr.

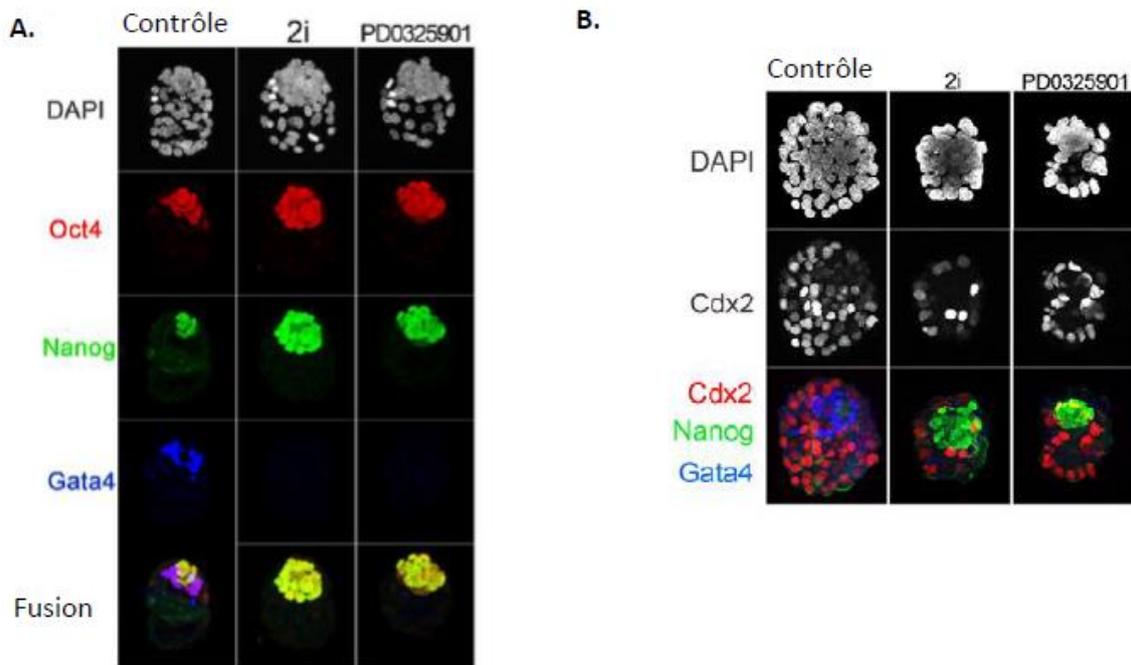
### III.B.3 Activation de la branche RTK-FGF/MEK-ERK

Si l'on s'intéresse à l'induction par le FGF, le récepteur considéré est le FGFR et son activation va induire celle de différentes sous parties de la voie RTK-FGF appelées ici « branches » dont la branche MEK-ERK mais aussi les branches JAK/STAT (« Janus Kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription »), PLC $\gamma$  (« Phosphoinositide Phospholipase C  $\gamma$ ») et PI3K (« Phosphatidylinositol 3-Kinase ») (**Figure 8** - pour revue Lanner et Rossant 2010; Ornitz et Itoh 2015).

L'activation de la signalisation RTK-FGF par fixation d'un des ligands, tels que les FGF, sur un de ces récepteurs, tels que les FGFR, permet à ce dernier de s'homo- ou s'hétéro-dimériser avec d'autres récepteurs et d'induire la phosphorylation des tyrosines positionnées dans la région intracellulaire du récepteur. Ces résidus phosphorylés jouent le rôle d'ancrage à des protéines adaptatrices à domaine SH2 (« Src Homology-2 ») telles que les protéines du complexe GRB2 (« Growth Factor Receptor Bound Protein 2 ») et SOS (« Son Of Sevenless »). Il existe aussi un complexe formé entre FRS2 (« Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2 »), SHP2 (« Src Homology region 2 domain containing Phosphatase 2 ») et GRB2.

GRB2 est un co-activateur ou molécule adaptatrice contenant un domaine SH2 entouré de deux domaines SH3 (« Src Homology-3 »). Ces domaines lui permettent de fixer les régions riches en prolines d'autres protéines telles que SOS. GRB2 joue un rôle essentiel en aval de nombreux récepteurs tyrosine kinases (Pawson and Scott, 1997). Une fois GRB2 fixé sur ces protéines co-effectrices, du GDP est relargué ce qui favorise la fixation de GTP sur la protéine RAS permettant ainsi son activation par hydrolyse de ce GTP. De ce fait, la voie RTK-FGF/Ras-MEK-ERK est activée par induction d'une cascade d'activation de différentes protéines.

La première étude en corps embryonnaires de la mutation *Grb2*<sup>-/-</sup> montre leur incapacité à former le lignage EPr (Cheng et al., 1998). Les mutants *Grb2*<sup>-/-</sup> meurent au stade E4.5 du fait de leur défaut d'établissement des lignages EPr et ExE (**Figure 12** - Chazaud et al., 2006). Aucune expression des marqueurs de l'EPr n'est observée pour les facteurs *Gata6*, *Dab2*, *Hex* (« Hematopoietically expressed homeobox ») et *Pem* (aussi appelé *Rhox5*), et l'ensemble des cellules de la MCI exprime le facteur NANOG montrant que ces cellules adoptent un destin Epi. Ainsi, GRB2 est requis pour la ségrégation des progéniteurs Epi et EPr, au stade E3.5 (Chazaud et al., 2006; Cheng et al., 1998). Les cellules *Grb2*<sup>-/-</sup> ne forment pas de dérivés endodermiques mais cela peut être sauvé par l'expression de la protéine RAS constitutivement activée (Cheng et al., 1998). Le phénotype identique des embryons mutants *Fgf4*<sup>-/-</sup> et *Grb2*<sup>-/-</sup>, est similaire à celui observé en utilisant deux inhibiteurs dirigés contre les protéines MEK1/2 et FGFR1 ou contre MEK1/2 seul sur embryons sauvages. Cela signifie que pour un même nombre de cellules de la MCI, celles-ci expriment NANOG montrant un choix privilégié en faveur du destin Epi (**Figure 13A-B et 14A** - Nichols et al., 2009; Yamanaka et al., 2010) . A l'inverse, le



**Figure 14 : Le traitement au cocktail 2i (inhibiteurs contre GSK3 + MEK1/2) entraîne une perte du lignage EPr et du TE**

(Modifiée de Nichols et al 2009)

- A. Expressions de NANOG (*en vert*), de OCT4 (*en rouge*) et de GATA4 (*en bleu*) détectées par immunofluorescence dans des embryons cultivés pendant 2 jours à partir du stade 8 cellules avec un cocktail 2i (inhibiteurs contre GSK3 + MEK1/2) ou PD03225901 (inhibiteur MEK1/2 seul).
- B. Expressions de NANOG (*en vert*), de CDX2 (*en rouge*) et de GATA4 (*en bleu*) détectées par immunofluorescence dans des embryons cultivés pendant 6 jours à partir du stade zygote avec un cocktail 2i (inhibiteurs contre GSK3 + MEK1/2) ou PD03225901 (inhibiteur MEK1/2 seul).

traitement avec du FGF4 exogène à partir du stade E2.5 montre l'acquisition du destin opposé d'EPr avec l'expression dans toute la MCI de GATA6 et GATA4 (**Figure 13C** - Yamanaka et al., 2010).

En aval de la signalisation RTK-FGF/MEK, on trouve les protéines ERK. ERK1 et ERK2 sont essentielles dans le processus d'inhibition de l'auto-renouvellement des cellules ES. L'inhibition pharmacologique de ces protéines par le PD098059 ou le PD0325901, spécifiques des protéines MEKs, bloque ainsi la phosphorylation et donc l'activation des protéines ERK et engendre une stimulation, dose-dépendante, de l'auto-renouvellement des cellules ES. De plus, la réalisation de chimères avec ces cellules inhibées montre que ces dernières conservent leur pouvoir de pluripotence supposant que les protéines ERK, inactivées, ne sont pas nécessaires dans le maintien de cette caractéristique (Burdon et al., 1999). Les souris *Erk1*<sup>-/-</sup> sont viables et fertiles avec comme seul défaut une altération de la prolifération et de la maturation des thymocytes (Pagès et al., 1999), alors que les souris *Erk2*<sup>-/-</sup> meurent au stade E8.5 au cours de l'embryogenèse du fait de l'absence de cône ectoplacental et d'ectoderme extra-embryonnaire (Saba-El-Leil et al., 2003). Cela pourrait suggérer une redondance de ERK2 pour ERK1 mais la réciproque ne semble pas vraie et laisserai penser à une expression maternelle de ERK2 qui compenserait un phénotype potentiel jusqu'au stade E8.5.

#### **III.B.4 Régulation de la branche RTK-FGF/MEK-ERK**

Au niveau extracellulaire, les ligands sont potentialisés par des co-facteurs tels que les héparanes sulfates protéoglycans (**Figure 8**). Cette potentialisation renforce ainsi la liaison du ligand avec son récepteur et par conséquent favorise son activité en augmentant la demi-vie du complexe FGF/FGFR (Ornitz, 2000; Shimokawa et al., 2011; Yaron et al., 1991).

Au niveau intracellulaire, on trouve les protéines Sprouty (SPRY), des régulateurs négatifs de certains récepteurs comme les FGFR, PDGFR, etc. Au nombre de 4 chez la souris, les protéines SPRY sont connues pour interagir avec GRB2 afin d'inhiber la branche RTK-FGF/ MEK-ERK et favoriser la branche RTK-FGF/PI3K-AKT (**Figure 8** - Yang et al. 2013; Thisse et Thisse 2005). Les mutants SPRY montrent un rôle essentiel et compensatoire dans les processus développementaux et la croissance. Le KO *Spry4* chez la souris entraîne des retards de croissance accompagnés d'une réduction de la taille du corps et de défauts cranio-faciaux (Percival et al., 2017; Taniguchi et al., 2007). Le KO *Spry2/Spry4* présente une létalité embryonnaire au stade E12.5 (Taniguchi et al., 2007) montrant des rôles redondants et non redondants de SPRY2 et SPRY4 au cours du développement embryonnaire. De plus, chez le Zébrafish, la perte de fonction *Spry4* met en évidence, lors du développement post-gastrulatoire, le rôle de SPRY4 dans la modulation de la voie RTK-FGF en antagonisant l'activité *Fgf8* et *Fgf3* et en agissant en aval du récepteur FGFR1 (Fürthauer et al., 2001). Chez la souris, le FGF8 a été suggéré comme unique inducteur de *Spry4* (Minowada et al., 1999). Dans les cellules ES, SPRY4 réprime ERK1/2 puisque les cellules *Spry4 Knockdown* montrent une phosphorylation et donc une activation



élevée de ERK (Lee et al., 2016). Cependant, malgré une diminution de la prolifération des cellules qui s'accompagne d'une diminution au niveau ARNm et protéique de l'expression des marqueurs *Sox2* et *Oct4* (Lee et al., 2016), l'auto-renouvellement de ces cellules n'est pas affecté ce qui est en adéquation avec les cellules *Fgf4-null* lorsqu'elles sont cultivées en absence de LIF (Kunath et al., 2007).

De plus, les protéines DUSP (« DUal Specificity Phosphatases ») régulent négativement la cascade de la voie RTK-FGF/MEK-ERK par déphosphorylation de ERK (**Figure 8** - pour revue Lanner and Rossant, 2010). Parmi ces protéines on retrouve DUSP1, pour laquelle sa délétion chez la souris n'entraîne pas d'anomalies phénotypiques majeures (Dorfman et al., 1996) et DUSP4 (MKP-2), pour laquelle des souris homozygotes mutantes ont été générées mais aucun phénotype péri-implantatoire n'a été détaillé (Al-Mutairi et al., 2010). En revanche, chez le Zébrafish, la perte de DUSP4 révèle son rôle essentiel dans le développement précoce et la spécification de l'endoderme (Brown et al., 2008).

L'expression de *Dusp4* et de *Spry2/4* est transcriptionnellement activée par le signal FGFR-ERK. Cependant, *Dusp4* s'associe au destin PrE alors que *Spry2/4* est relatif aux gènes cibles impliqués dans le destin Epi (Dailey et al., 2005; Kang et al., 2017).

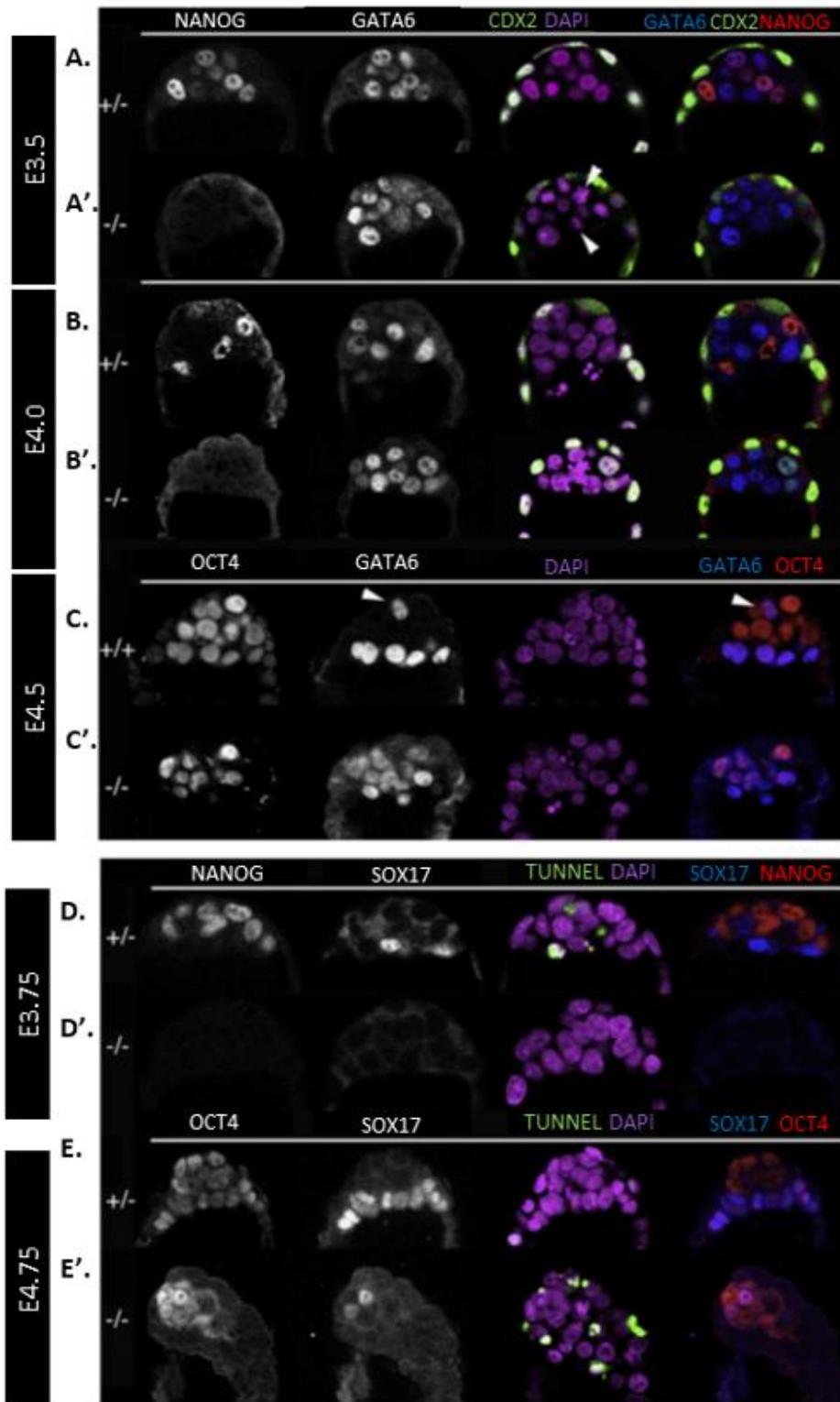
L'ensemble de ces résultats montre le rôle essentiel de la voie RTK-FGF/MEK-ERK pour le choix du destin Epi *versus* EPr. Or, d'autres voies de signalisation sont aussi impliquées dans ce choix de devenir cellulaire.

### **III.B.5 Implication des autres voies : BMP, RTK-PDGF et RTK-FGF/JAK-STAT**

D'autres voies sont impliquées dans la spécification des lignages Epi et EPr et dans le contrôle de leur prolifération et leur survie.

Tout d'abord, il est à noter l'implication de la voie BMP (« Bone Morphogenetic Protein ») dans la différenciation de certains lignages comme l'EPr. Le ligand *Bmp4* est exprimé dès le stade E3.75 au sein des cellules Epi (Boroviak et al., 2015; Graham et al., 2014; Guo et al., 2010). En outre, le récepteur BMPR2 est aussi important puisque l'expression du dominant négatif pour BMPR2 engendre une diminution du nombre de cellules d'EPr (Graham et al., 2014). Ce phénotype est propre aux cellules d'EPr puisque les cellules d'Epi ne sont pas altérées en nombre et en patron d'expression génique ce qui s'explique par un épuisement du nombre de précurseurs d'EPr associé à une vague d'apoptose (Graham et al., 2014).

La voie de signalisation RTK-PDGFR joue un rôle dans la survie cellulaire. Le ligand PDGF $\alpha$  est exprimé dans les deux lignages de la MCI tandis que le récepteur PDGFR $\alpha$  est retrouvé spécifiquement exprimé au sein de l'EPr au stade E3.75 (Artus et al., 2013; Boroviak et al., 2015; Guo et al., 2010; Plusa et al., 2008). L'inactivation de la voie RTK-PDGF dans les embryons *Pdgfra*<sup>-/-</sup> provoque une apoptose massive des cellules d'EPr sans affecter la spécification initiale des cellules de la MCI (Artus et al., 2013).



**Figure 15 : Analyse de l'expression des marqueurs de l'EPr dans les embryons *Nanog*<sup>-/-</sup>**  
(Modifiée de Frankenberg et al 2011)

A- B'. Immunocolocalisation de l'expression des marqueurs NANOG ou OCT4 (en rouge), GATA6 (en bleu) et CDX2 (en vert) dans les embryons à E3.5 (A, A') et à E4.0 (B, B') dans des embryons contrôle et *Nanog*<sup>-/-</sup>. Les têtes de flèches indiquent les cellules mitotiques dans lesquelles GATA6 n'est pas exprimé dans le noyau.

C-C'. Expression d'OCT4 et GATA6 dans des embryons contrôle et *Nanog*<sup>-/-</sup> à E4.5.

D-E'. Marquage TUNNEL et expression des marqueurs NANOG ou OCT4 (en rouge) et SOX17 (en bleu) dans des embryons contrôle et *Nanog*<sup>-/-</sup> à E3.75 (D, D') et à E4.75 (E, E').

Ensuite, la voie RTK-FGF/JAK-STAT activée par le LIF, de façon dose-dépendante, joue aussi un rôle puisque la mutation *Stat3* n'entraîne de phénotype qu'à partir du stade de l'implantation E4.5 avec des défauts dans la MCI dus à l'entrée des cellules en apoptose (Do et al., 2013).

### III.C Engagement des cellules de la MCI : Epi et NANOG versus EPr et GATA6

#### III.C.1 NANOG est requis pour la spécification en Epi

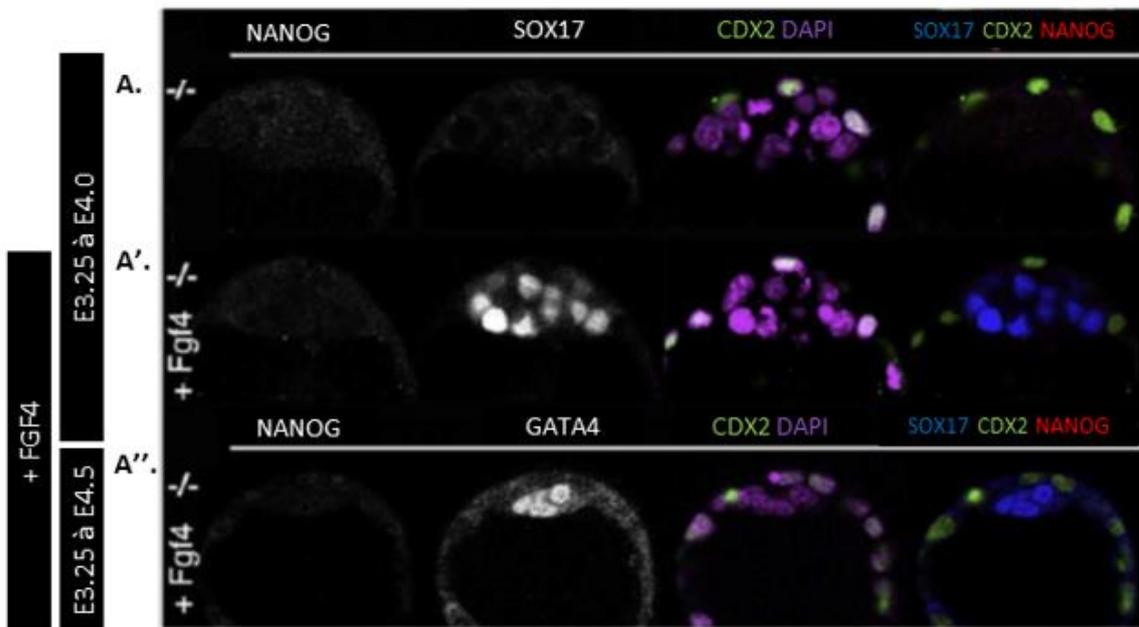
- Expression de Nanog

NANOG a été identifié au sein de deux laboratoires. *Mitsui et al* ont observé le transcriptome des cellules ES non différenciées et différenciées permettant de mettre en lumière des gènes clés empêchant le processus de différenciation de ces cellules identifiant ainsi le gène *Nanog* (Mitsui et al., 2003). D'un autre côté, *Chambers et al* identifient le gène *Nanog* par la technique de recherche d'homologie de séquence *via* l'étude de l'auto-renouvellement de clones de cellules ES cultivées en absence de LIF et transfectées avec différents ADNc (Chambers et al., 2003).

*Nanog* est un facteur de transcription à homéodomaine. Au sein des cellules ES indifférenciées, son expression est particulière puisqu'elle fluctue que ce soit en présence ou non d'inhibiteurs, appelé cocktail 2i, contenant un inhibiteur contre les protéines MEK et la protéine GSK3 (« Glycogen synthase kinase 3 » - Abranches et al., 2014; Chambers et al., 2007). L'invalidation de l'expression de *Nanog* au sein des cellules ES induit une diminution de la pluripotence combinée à une réduction de l'expression de *Pou5f1* qui s'allie à l'activation de *Gata6* et de *Gata4* avec une morphologie de type endodermique des cellules (Chambers et al., 2007; Mitsui et al., 2003). De plus, il est impossible de dériver des cellules ES à partir d'embryons mutants pour *Nanog*. Ainsi, *Nanog* est requis pour la mise en place de la pluripotence et pour renforcer le maintien de celle-ci.

Durant le développement embryonnaire, *Nanog* est exprimé suivant 3 phases. La phase d'expression précoce de *Nanog* est progressive. Elle débute au stade 8 cellules et se poursuit jusqu'au stade morula pour se maintenir lors de la spécification des cellules Epi (**Figure 7** – Guo et al., 2010; Plusa et al., 2008). Son expression est, dans un second temps, réprimée, de manière dépendante à la signalisation RTK-FGF/MEK-ERK, dans les cellules spécifiées en EPr et est maintenue dans les cellules d'EPI (**Figure 7** - Chazaud et al., 2006; Guo et al., 2010; Plusa et al., 2008). La troisième phase d'expression de *Nanog* concerne sa répression au sein des cellules Epi à partir du stade blastocyste à E4.5 (**Figure 7** - Chambers et al., 2003; Kang et al., 2013).

L'expression de *Nanog* est cruciale pour l'établissement des lignages au sein de la MCI. Les mutants *Nanog*<sup>-/-</sup> expriment correctement OCT4 et CDX2 montrant que la première spécification entre les cellules du TE et celles de la MCI s'opère correctement. Chez les embryons hétérozygotes *Nanog*<sup>+/-</sup>, aucun phénotype n'est détecté au cours du développement précoce montrant que seule



**Figure 16 : Sauvetage de l'expression de SOX17 et GATA4 par traitement au FGF4 recombinant dans les embryons *Nanog*<sup>-/-</sup>**

(Modifiée de Frankenberg et al 2011)

A-A''. Culture d'embryons *Nanog*<sup>-/-</sup> en absence (A) ou présence (A', A'') de FGF4 exogène des stades E3.25 à E4.0 (A, A') ou E4.5 (A'') et immo-numarqués avec NANOG (en rouge), SOX17 ou GATA4 (en bleu) et CDX2 (en vert).

une copie du gène est suffisante pour remplir les fonctions du gène au stade blastocyste précoce (Frankenberg et al., 2011; Messerschmidt and Kemler, 2010; Miyanari and Torres-Padilla, 2012).

- Phénotype des embryons homozygotes *Nanog*<sup>-/-</sup>

*Nanog* est requis pour la spécification de l'Epi puisque au sein des embryons homozygotes, la totalité des cellules de la MCI exprime le marqueur GATA6 et aucune altération majeure du nombre de cellules dans la MCI n'est constatée (**Figure 15 A à C'** - Frankenberg et al., 2011). Cependant, malgré la spécification des cellules en EPr due à l'expression de GATA6, seulement quelques cellules expriment des marqueurs tardifs de maturation de l'EPr tels que SOX17 et GATA4. Cela suggère que NANOG est requis pour la spécification en Epi mais aussi lors de la différenciation et la maturation des cellules d'EPr de façon paracrine (**Figure 15D à E'** - Frankenberg et al., 2011; Messerschmidt and Kemler, 2010).

Cependant, il est à noter que l'expression de *Fgf4*, normalement spécifique des cellules d'Epi dans les embryons sauvages, n'est pas conservée dans les embryons *Nanog*<sup>-/-</sup> montrant que l'expression du *Fgf4* dépend de celle de NANOG (**Figure 9C** - Frankenberg et al., 2011). Des expériences de CHIP dans les cellules ES, montrent que cette régulation semble directe puisque NANOG peut se fixer sur les régions régulatrices du gène *Fgf4* (Shi et al., 2011). Ainsi, après comparaison des embryons *Fgf4*<sup>-/-</sup> et *Nanog*<sup>-/-</sup> on peut voir que, malgré l'expression de GATA6 dans la totalité des cellules de la MCI, le maintien de cette expression n'est observé que dans les embryons *Nanog*<sup>-/-</sup>. Cela signifie que, dans les embryons mutants *Fgf4*<sup>-/-</sup>, le déclin d'expression de GATA6 n'est pas dû à la déplétion en *Fgf4* mais est une conséquence de la surexpression de NANOG qui inhibe GATA6.

Le traitement des embryons mutants *Nanog*<sup>-/-</sup> avec du FGF4 exogène, montre que l'expression des marqueurs tardifs SOX17 et GATA4 est sauvée ce qui implique que le FGF4 est nécessaire pour leur expression et la différenciation de l'EPr (**Figure 16** - Frankenberg et al., 2011). Ainsi, NANOG joue un rôle lors de la maturation de l'EPr *via* l'expression paracrine du FGF4 et donc de la signalisation RTK-FGF/MEK-ERK.

- Régulation de l'expression de Nanog

*Nanog* est régulé par plusieurs éléments. En premier lieu, la signalisation RTK-FGF/MEK-ERK inhibe Nanog. En effet, *Yamanaka et al* ont traité des embryons sauvages avec du FGF4 exogène observant une inhibition ubiquitaire de l'expression de NANOG dans l'ensemble des cellules de la MCI (Yamanaka et al., 2010) potentiellement causée par la surexpression concomitante de GATA6 dans ces cellules. Cependant, deux équipes, dont la nôtre, se partagent l'explication de ce résultat puisque, suite à un traitement d'embryons *Gata6*<sup>-/-</sup> avec du FGF4 exogène, *Shrode et al* montrent que l'expression de NANOG est réduite mais persiste, menant à la conclusion suivante : GATA6 est nécessaire à l'inhibition de NANOG *via* le voie RTK-FGF/MEK-ERK (Schrode et al., 2014). Or, au sein de notre équipe,



*Bessonnard et al* ont montré que NANOG était exprimé suivant plusieurs phases. Sa première phase d'expression précoce est sensible au FGF4 indépendamment de GATA6 expliquant l'absence de NANOG dans les embryons *Gata6*<sup>-/-</sup> traités au FGF4 exogène. Mais, lorsque les embryons hétérozygotes et homozygotes pour *Gata6* sont cultivés jusqu'à des stades tardifs à E4.5 avec du FGF4 exogène, aucune différence significative n'est observée entre les conditions contrôle ou avec traitement. Cela révèle que l'activation de la signalisation RTK-FGF/MEK-ERK n'est pas suffisante pour la conversion des cellules Epi en EPr dans les embryons hétérozygotes à partir du stade E3.25. Ainsi, lors d'une seconde phase, NANOG reste insensible au FGF4 et persiste donc au stade E3.25 ce qui rend GATA6 nécessaire pour réprimer NANOG à ce stade (Bessonnard et al., 2014). Ainsi, il reste à décrypter le mécanisme d'interaction et de potentielle régulation de NANOG par la voie RTK-FGF/MEK-ERK.

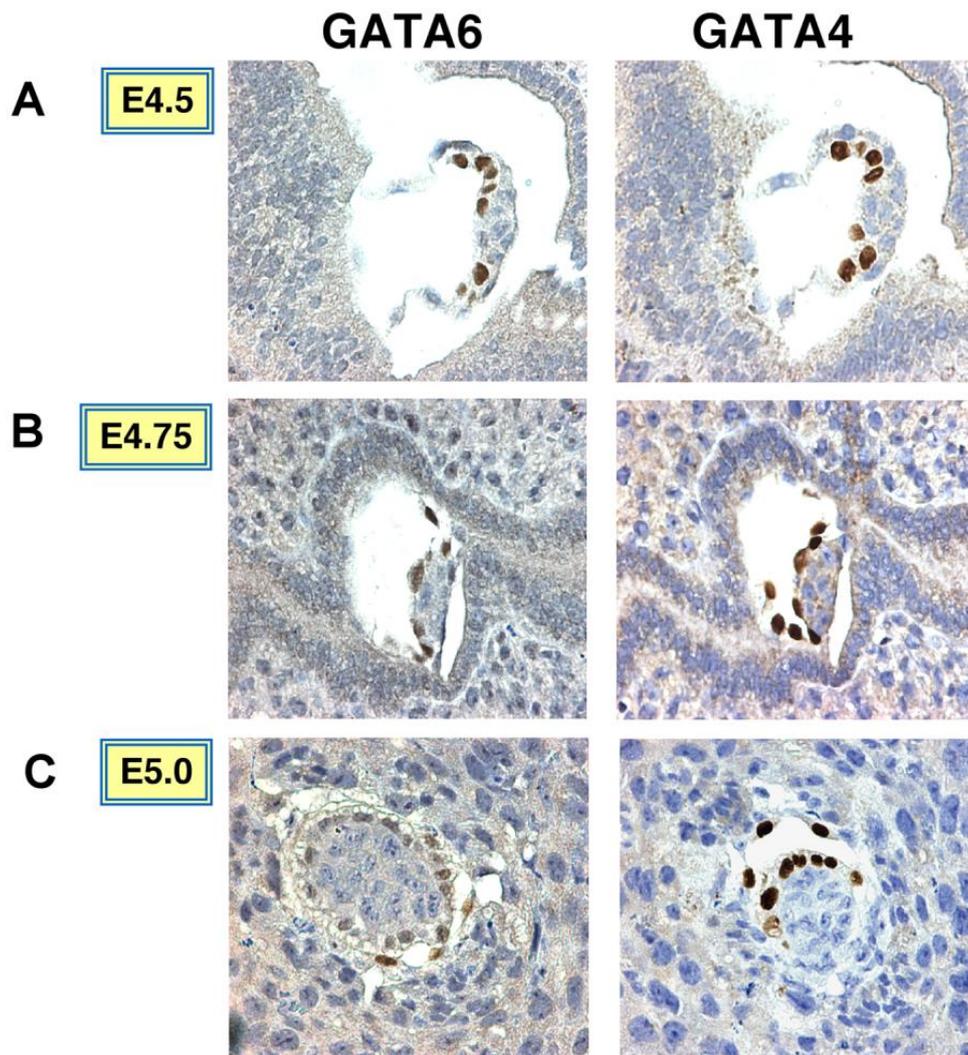
La modulation de l'expression de *Nanog* passe aussi par la fixation du complexe SOX2/OCT4 au niveau d'un site spécifique HMG/POU situé dans son promoteur (Rodda et al., 2005). Ces deux facteurs SOX2 et OCT4 sont exprimés au sein des embryons mutants. De plus, *Nanog* peut s'auto-réguler puisque son promoteur présente une séquence spécifique consensus qui permet la fixation de sa propre protéine sur son locus (Loh et al., 2006). Dans les cellules ES, il a été mis en évidence que la répression transcriptionnelle de *Nanog* induisait une augmentation de sa propre transcription montrant que *Nanog* s'auto-réprime (Fidalgo et al., 2012; Navarro et al., 2012).

L'expression de *Nanog* est donc en balance avec l'expression du marqueur *Gata6* et ces facteurs de transcription jouent un rôle clé lors de l'engagement des cellules vers un destin d'Epi ou d'EPr. En effet, le gène *Nanog* possède une cassette GATA permettant la fixation directe du facteur GATA6 engendrant la répression de celui-ci (Wamaitha et al., 2015). De manière réciproque, le gène *Gata6* contient une séquence dans son promoteur, à 1,6kb en amont du site d'initiation de la transcription, reconnue par NANOG et permet sa répression dans les cellules ES (Mitsui et al., 2003; Singh et al., 2007).

### **III.C.2 GATA6 est requis pour la spécification en EPr**

- Expression de *Gata6*

Comme précédemment décrit, *Gata6* est exprimé au niveau ARNm et protéine, *via* des expériences de RT-qPCR sur cellule unique et d'immunomarquages, à partir du stade 2-4 cellules (Guo et al., 2010). L'expression ARNm de *Gata6* précède légèrement dans le temps son expression protéique. En effet, des travaux réalisés au sein de notre équipe montrent que l'ARNm de *Gata6* commence à être exprimé faiblement entre les stades E1.5 et E2.75 dans la MCI entière d'embryons sauvages (**Figure 7A** - Guo et al., 2010 - *données non publiées*– travail de thèse de Sabine Chauveau et de N. Allègre). La protéine GATA6 commence, quant à elle, à être détectée dans le noyau à partir du stade 4 cellules où quelques cellules de rares embryons commencent à être marquées.



**Figure 17 : Expression des marqueurs GATA6 et d'un autre marqueur de l'EPr, GATA4, aux stades E4.5 et E5.0**

(Issue de Cai et al 2008)

Les embryons ont été fixés et des coupes ont été réalisées en paraffine aux stades E4.5 (A), E4.75 (B) et E5.0 (C). L'expression des marqueurs GATA6 et GATA4 est visible après immuno-marquage.

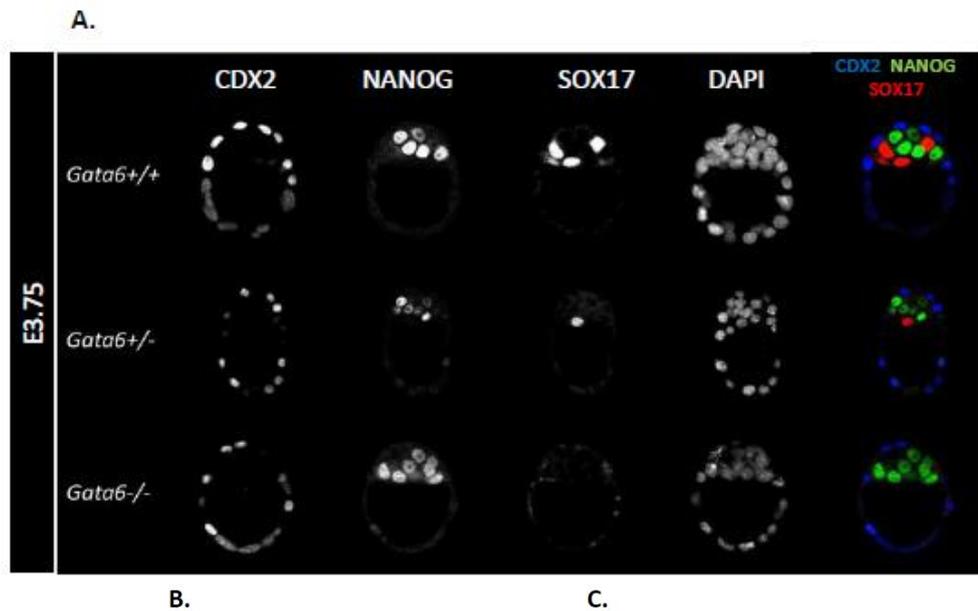
Le marquage devient clair et précis dans l'ensemble des cellules des embryons à 8 cellules (Plusa et al., 2008). Les patrons d'expression, au niveau ARNm et protéique, se confondent entre les stades E3.25 et E3.75. De plus, l'ARNm de *Gata6* est co-exprimé avec l'ARNm de *Nanog* et leurs expressions deviennent exclusives conduisant au patron « en poivre et sel », entre les stades E3.25 et E3.75 soit entre 32 et 64 cellules (**Figure 7A** – Chazaud et al., 2006; Guo et al., 2010; Plusa et al., 2008).

Ensuite, l'expression protéique de GATA6 est restreinte aux cellules de l'EPr au stade E4.5 (**Figure 7C** – Chazaud et al., 2006; Plusa et al., 2008; Saiz et al., 2016). Puis, au stade E4.75, les cellules exprimant GATA6, forment une couche épithélialisée de cellules d'EPr qui commence à s'étendre au-delà de l'aire de la MCI à la surface du blastocoèle (**Figure 17** – Cai et al., 2008). Enfin, au stade E5.0, la protéine GATA6 est exprimée à la fois dans l'endoderme pariétal (EP), un des dérivés de l'EPr, notamment au niveau de la membrane de Reichert's et est réprimée au sein des cellules de l'EV, second dérivé de l'EPr (Cai et al., 2008).

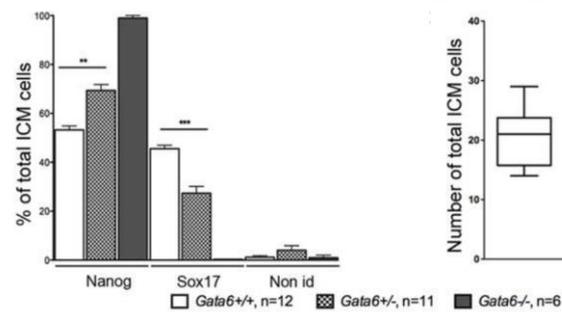
- Phénotype des embryons homozygotes *Gata6*<sup>-/-</sup>

Dans les embryons homozygotes mutants *Gata6*<sup>-/-</sup>, l'épithélium d'EPr n'est pas produit à E4.5 et une perte d'expression des marqueurs SOX17 et GATA4 est observée (Cai et al., 2008). Cela engendre la mort des embryons au stade E5.5 qui s'explique par le fait qu'au stade E3.75, les embryons n'arrivent pas à spécifier les cellules en EPr puisque les cellules de la MCI n'ont pas d'autre choix que d'adopter un destin d'Epi exprimant NANOG (**Figure 18** - Bessonard et al., 2014; Schrode et al., 2014). Cela montre que GATA6 est nécessaire à la spécification des cellules d'EPr. Enfin, le nombre de cellules de la MCI ne varie pas ce qui montre qu'il n'y a pas d'apoptose ou d'augmentation de la prolifération des cellules d'Epi au sein de ces embryons.

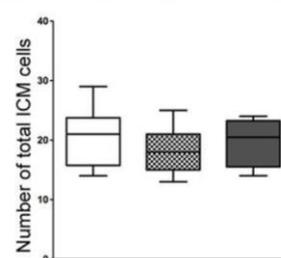
Ces résultats sont confirmés dans les cellules ES puisque l'isolement de cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> à partir d'embryons mutants montrent que ces cellules peuvent contribuer à la formation de ce lignage lorsque des chimères sont réalisées avec ces cellules. Ainsi, GATA6 n'est pas requis pour la formation de ce lignage (Koutsourakis et al., 1999). De plus, GATA6 est requis pour la différenciation de l'EPr *in vitro* puisque ces mêmes cellules mutantes échouent dans leur différenciation en EPr (Capo-Chichi et al., 2005; Morrissey et al., 1998). Les embryons homozygotes *Gata6* *H2B-Venus*/*H2B-Venus* (*Gata6*<sup>-/-</sup>) présentent une expression de *Venus* sous la dépendance du promoteur de *Gata6*. Il a été observé qu'une expression de VENUS est visible malgré l'absence de GATA6 montrant que *Gata6* n'est potentiellement pas nécessaire pour sa propre expression et suggère que l'expression constatée de *Venus* serait due à la machinerie d'activation de *Gata6* toujours présente dans ces embryons (Freyer et al., 2015).



B.



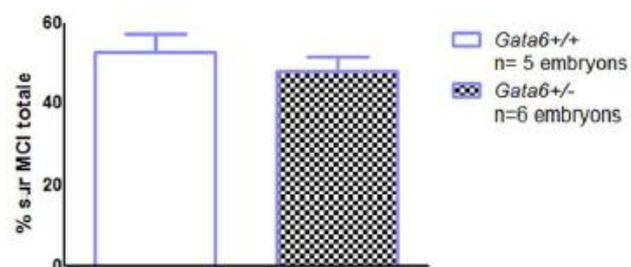
C.



**Figure 19 : Analyse phénotypique des embryons *Gata6*<sup>-/-</sup>**

(Modifiée de Bessonard et al 2014)

- Immunolocalisation de l'expression des protéines NANOG (en vert), SOX17 (en rouge) et CDX2 (en bleu) dans les embryons sauvages (n=12), hétérozygotes *Gata6*<sup>+/-</sup> (n=11) et homozygotes *Gata6*<sup>-/-</sup> (n=6).
- Pourcentage de cellules Epi et EPr dans les embryons mutants ou sauvages au stade E3.75 (\*\*P<0.01 et \*\*\*P<0.001; Mann-Whitney test)
- Nombre de cellules dans les MCI de ces embryons au stade E3.75.



**Figure 18 : Le phénotype de perte d'EPr est sauvé au stade E4.5 dans les embryons *Gata6*<sup>+/-</sup>**

(Issue de Bessonard et al 2014)

Pourcentage de cellules d'EPr dans les embryons sauvages et hétérozygotes au stade E3.75.

- Phénotype des embryons hétérozygotes *Gata6*<sup>+/-</sup>

La perte d'un seul allèle de *Gata6* entraîne un effet dose dépendant qui se traduit par une diminution des cellules de l'EPr en faveur d'une augmentation des cellules de l'Epi dans des embryons à E3.75 pour un même nombre de cellules de la MCI entre les embryons hétérozygotes *Gata6*<sup>+/-</sup> et sauvages (**Figure 18B et 18C** - Bessonnard et al., 2014; Schrode et al., 2014). Cependant, le phénotype observé dans les embryons hétérozygotes *Gata6*<sup>+/-</sup> est transitoire entre le stade E3.75 et E4.5. En effet, le pourcentage du nombre de cellules de l'EPr, exprimant SOX17, est semblable à celui observé dans les embryons sauvages au stade E4.5 (**Figure 19** - Bessonnard et al., 2014; Schrode et al., 2014).

Les embryons hétérozygotes *Gata6*<sup>+/-</sup> présentent aussi un nombre plus faible de cellules co-exprimant NANOG et GATA6 que dans les embryons sauvages au stade E3.25 (Bessonnard et al., 2014; Schrode et al., 2014). Cela témoigne d'un engagement plus précoce des cellules de la MCI vers un destin Epi. Le phénotype des embryons *Gata6*<sup>+/-</sup> semble donc être dépendant de NANOG et la spécification des cellules de l'EPr serait retardée par la diminution de GATA6 (Bessonnard et al., 2014; Schrode et al., 2014). Cependant, les embryons hétérozygotes sont viables montrant que le retard constaté n'altère pas la fonctionnalité de l'EPr et suggérant une tolérance de l'EPr pour une variabilité du nombre de cellules du lignage.

La signalisation RTK-FGF a été suggérée comme étant celle capable de sauver la spécification dans ces embryons. Or, on ne retrouve pas d'expression normale de SOX17 et GATA4 après administration de FGF4 dans les embryons *Gata6*<sup>+/-</sup> en culture au stade E3.25 comparé aux embryons sauvages (Bessonnard et al., 2014). L'activation de la signalisation RTK-FGF n'est donc pas suffisante à E3.25 pour transdifférencier les cellules d'Epi dans les embryons hétérozygotes. Les cellules d'Epi de ces embryons sont donc insensibles aux traitements FGF4 montrant un engagement plus précoce de ces cellules hétérozygotes dû à une perte de plasticité des cellules de l'Epi comparé aux cellules sauvages (Schrode et al 2014 ; Bessonnard et al 2014).

Ainsi lors de la spécification en EPr, il est nécessaire d'avoir à la fois la signalisation RTK-FGF et GATA6 pour ce processus (Bessonnard et al., 2014).

### **III.C.3 Plasticité au sein du blastocyste**

Différents travaux montrent qu'il existe une co-existence des cellules précurseurs exprimant à la fois NANOG et GATA6 et des cellules spécifiées exprimant NANOG ou GATA6 seulement lors du développement blastocyttaire, ce qui témoigne de l'asynchronie de spécification (Gerbe et al., 2008; Plusa et al., 2008).

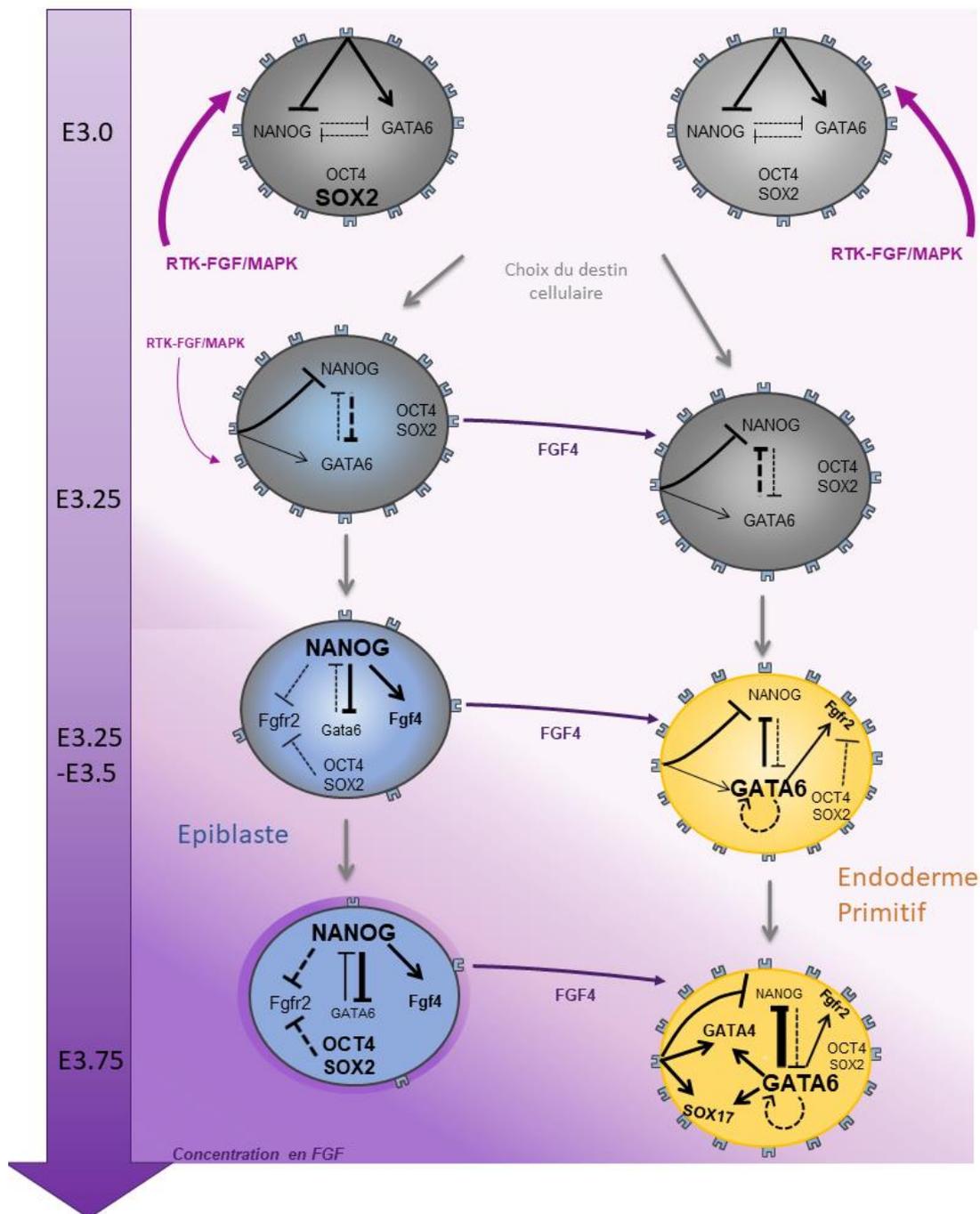
Différents types d'expériences ont été menées pour détailler précisément le mécanisme de plasticité cellulaire au sein de l'embryon ainsi que la temporalité d'apparition et de modulation de celle-ci.



Les expériences de culture d'embryons réalisées par *Yamanaka et al*, grâce à l'alternance des inhibiteurs de la voie RTK-FGF/MEK-ERK, en particulier les inhibiteurs du FGFR1 et des protéines MEK1/2 et de l'ajout de FGF4 exogène, montrent que 80 à 100% des cellules conservent une plasticité lors de leur engagement vers un destin ou un autre au cours de la spécification de la MCI. Ces expériences révèlent que la plasticité cellulaire a lieu entre E2.5 et E3.75 puisque au-delà de ce stade, les cellules ne répondent plus aux traitements avec les inhibiteurs et leur destin reste inchangé (Yamanaka et al., 2010). Ainsi, malgré le potentiel équivalent des précurseurs de la MCI à contribuer aux lignages Epi et EPr, certaines cellules peuvent modifier leur devenir lorsque la signalisation RTK-FGF/MEK-ERK est modulée (Krupa et al., 2014; Morris et al., 2010; Yamanaka et al., 2010).

De plus, des expériences de chimères entre cellules de la MCI isolées, exprimant le rapporteur *Pdgfra* H2B-GFP, injecté au sein de morula hôtes, montrent que les cellules exprimant le transgène participent aux trois lignages du blastocyste, ce qui témoigne de leur pluripotence (Grabarek et al., 2012). Il apparaît que les cellules Epi présentent une plasticité réduite comparée à celle observée dans les cellules d'EPr ce qui est corrélé au fait que les cellules d'Epi sont spécifiées avant celles de l'EPr (Bessonard et al., 2014; Grabarek et al., 2012; Xenopoulos et al., 2015). Cette plasticité des cellules de la MCI est modulée à la fois par la signalisation RTK-FGF, par des signaux de différenciation et par la position des cellules au sein de l'embryon (Grabarek et al., 2012). Ainsi, la spécification des cellules qui a lieu de manière asynchrone entre E2.5 et E3.75 débouche sur une fenêtre de temps courte entre E3.25 et E3.75 durant laquelle la plasticité cellulaire permet de moduler le destin des cellules pour adopter n'importe lequel d'un des trois lignages au sein de la MCI. Ce destin ainsi fixé entre les stades E3.75 et E4.5 permet de former un blastocyste mature au sein duquel les destins sont acquis et où aucun changement de devenir ne peut s'opérer (Grabarek et al., 2012).

Enfin, des travaux récents menés par *Saiz et al* complètent ceux obtenus précédemment par *Yamanaka et al* (Saiz et al., 2016; Yamanaka et al., 2010). En effet, les fenêtres de temps appliquées par *Saiz et al* sont plus précises et permettent de montrer que la population de précurseurs exprimant à la fois NANOG et GATA6 réponds à la signalisation RTK-FGF mais qu'une fois engagées, ces cellules ne sont plus affectées par les changements en FGF4 extracellulaire. De plus, les cellules précurseurs s'adaptent au ratio entre le nombre de cellules Epi et EPr et la modulation de la signalisation RTK-FGF peut être prédite suivant ce ratio et donc la taille de la population de cellules précurseurs (Saiz et al., 2016).



**Figure 20 : Mécanismes de spécification des lignages Epi et EPr en trois étapes**

(Adaptée de Frankenberg et al 2011)

Initialement les cellules précurseurs de la MCI co-expriment NANOG et GATA6 au stade E3.0. Une diminution du signal RTK-FGF/MEK-ERK et un déséquilibre d'expression entre ces deux facteurs va favoriser dans certaines cellules l'expression de NANOG au détriment de l'expression de GATA6. Cela va permettre de spécifier, en premier lieu, certaines cellules en Epi provoquant la sécrétion de Fgf4 qui va aller se fixer aux récepteurs des cellules voisines au stade E3.25. Ce signal va déclencher la spécification des cellules en EPr et va favoriser cette fois-ci l'expression de GATA6 au détriment de celle de NANOG. Pendant la maturation de l'Epr, l'expression de *Gata6* est maintenue par la signalisation RTK-FGF/MEK-ERK. L'expression des marqueurs tardifs de la différenciation de l'EPr, *Sox17* et *Gata4*, est induite, de manière paracrine, par une activation directe via le Fgf4, sécrété par les cellules d'Epi. Les cellules ne sont pas synchronisées lors des étapes de spécification et de différenciation des lignages ce qui révèle l'asynchronie et le poivre et sel observés dans l'embryon à partir du stade E3.25.

### III.C.4 Modèle de spécification : hypothèses d'établissement du poivre et sel

Différents modèles d'établissement du poivre et sel ont été proposés pour expliquer l'induction de la spécification (pour revue Hermitte and Chazaud, 2014).

Les quatre modèles impliquent, tous, les facteurs NANOG, GATA6 et FGF4 (**Figure 20**-Hermitte and Chazaud, 2014). Chacun de ces modèles montre qu'il existe une répression mutuelle entre NANOG et GATA6 avec l'induction, directe ou indirecte, de leur propre expression *in vitro*.

A cela s'ajoute que l'activation de la voie RTK-FGF/MEK-ERK induite par la fixation du FGF4, produit par les cellules Epi, sur le récepteur FGFR1 (Kang et al., 2017; Molotkov et al., 2017), présent au niveau membranaire des cellules d'EPr et d'EPI, renforce l'expression de GATA6 et réprime l'expression de NANOG (Singh et al. 2007; Guo et al. 2010; Bessonard et al. 2014; Schröter et al. 2015 ; pour revue Chazaud and Yamanaka, 2016).

Un modèle a été proposé par *Ohnishi et al* et repose sur une hétérogénéité due au hasard de l'expression des marqueurs clés au sein de chaque cellule. En effet, l'ensemble des études transcriptomiques d'expression au sein des cellules au stade E3.25 montre que le patron d'expression des marqueurs clés n'est pas clairement défini, ou du moins, des variations sont constatées entre chaque cellule analysée et aucune corrélation évidente entre les gènes ne ressort (Guo et al., 2010; Ohnishi et al., 2014). A cela s'ajoute qu'aucune corrélation spatiale entre les cellules spécifiées dans le même devenir n'a été mise en évidence (Schrode et al., 2014). Ce modèle tient compte de la sécrétion en FGF4, potentiellement stochastique, qui renforce l'identité cellulaire acquise au stade E3.5 et déterminée de manière non réversible au stade E3.75 (Ohnishi et al., 2014).

Un second modèle, établi au sein de l'équipe par *Bessonard et al* et complété par d'autres équipes, permet la simulation de l'établissement et de la résolution totale de l'état de co-expression NANOG/GATA6 et de la dynamique, très importante, d'expression/sécrétion du FGF4 dans certaines cellules (Bessonard et al., 2014; De Mot et al., 2016; Grabarek et al., 2012; Kang et al., 2013; Krawchuk et al., 2013; Ohnishi et al., 2014; Schröter et al., 2015; Yamanaka et al., 2010). Ainsi, 3 états stables différents sont définis : (i) un état « MCI » où NANOG et GATA6 sont co-exprimés, (ii) un état « Epi » où l'expression de NANOG prime sur l'expression de GATA6 et (iii) un état « EPr » où à l'inverse l'expression de GATA6 prime sur l'expression de NANOG (**Figure 20**). Ainsi, au cours de la spécification, *Nanog* est le premier facteur à être augmenté dans les cellules précurseurs ce qui va entraîner l'inhibition de *Gata6* et la sécrétion de FGF4. Ce FGF4 sécrété va s'accumuler et se fixer sur les cellules voisines afin de les mener vers un destin d'EPr. Ainsi, des différences de concentrations en FGF4 sécrété vont s'établir et former une hétérogénéité d'expression de la voie RTK au sein des cellules de la MCI. La diminution initiale de la signalisation RTK-FGF/MEK-ERK, nécessaire pour l'induction du destin Epi, pourrait être due à la diminution de p-ERK qui permettrait l'acquisition asynchrone dans les cellules du destin Epi en premier puis du destin EPr (Bessonard et al., 2014; De Mot et al., 2016).



Basés sur le modèle mathématique réalisé par *Bessonnard et al*, les travaux récents de *Schröter et al* montrent, dans les cellules ES, des interactions répressives des programmes d'acquisition des destins Epi et EPr. Ces interactions, modulées dès l'initiation par la voie RTK-FGF/MEK-ERK au niveau du programme Epi, intègrent un seuil d'expression requis de GATA6/4 pour la différenciation en EPr des cellules ES (Schröter et al., 2015). En effet, le traitement par l'inhibiteur de MEK de cellules ES en cours de différenciation provoque une diminution du nombre de cellules exprimant GATA6. De fait, la signalisation RTK-FGF/MEK-ERK détermine le seuil de GATA6 nécessaire à la spécification des cellules en EPr. Cette détermination du seuil s'effectue par le contrôle de l'expression de *Nanog* par la voie RTK-FGF/MEK-ERK (Schröter et al., 2015).

Un troisième modèle repose sur le fait que l'ordre de la vague de division et d'internalisation déterminerait le devenir des cellules avec un biais engendré par une différence moléculaire intrinsèque héritée des cellules mères (Morris et al., 2013). Les cellules internes issues de la première vague de divisions asymétriques lors de la transition 8 à 16 cellules (Vague 1) exprimeraient le *Fgf4*, alors que les cellules générées lors de la seconde vague, lors de la transition 16 à 32 cellules, exprimeraient le *Fgfr2* (Vague 2). Ces cellules de la Vague 2 sont plus réceptives au signal *Fgf4* que les cellules issues de la première vague de divisions ce qui les biaise vers un destin EPr. La force du biais reposerait sur la composition de la MCI. La balance entre les Vagues 1 et 2 va donc être modulée pour tendre vers un équilibre de production des lignages et des embryons correctement formés. En revanche, dans les embryons où la Vague 1 montre une fréquence inférieure à 30%, le *Fgf4* produit est moindre et l'impact de celui-ci sur les cellules présentant une expression élevée de *Fgfr2* n'est pas assez fort ce qui dirige les cellules vers un destin Epi (Morris et al., 2013). A l'inverse, dans les embryons où la Vague 1 montre une fréquence supérieure à 70%, le *Fgf4* produit est élevé ce qui conduit les cellules présentant une expression élevée de *Fgfr2* vers un destin d'EPr.

Enfin, un quatrième modèle repose sur la quantité de cellules internes des Vagues 1 et 2 (In1 et In2 respectivement) au stade 16 cellules (Krupa et al., 2014). Les blastomères dérivés de la première vague de divisions asymétriques expriment des niveaux potentiellement plus élevés de *Fgf4* et des niveaux plus faibles de *Fgfr2* que les niveaux observés dans les cellules issues de la seconde vague de divisions au stade 16 à 32 cellules (Krupa et al., 2014). Néanmoins, si le nombre de cellules In1 est élevé, les niveaux d'expression du *Fgf4* seront élevés et capables de conduire les cellules naïves vers un destin EPr. Les cellules In1 seront donc dirigées vers un destin Epi ou EPr et les quelques cellules In2 produites seront guidées vers un destin EPr. En revanche, si le nombre de cellules In1 est faible, les niveaux d'expression du *Fgf4* seront faibles et insuffisants pour guider les cellules vers un destin EPr. Ainsi, la plupart des cellules In1 contribueront au lignage Epi et les cellules In2 compenseront le biais créé et produiront des cellules EPr.



Ainsi, malgré les différentes possibilités d'explication de l'établissement du poivre et sel, l'ensemble de ces hypothèses montre une communication nécessaire et efficace entre les cellules (Krupa et al., 2014; Morris et al., 2013) résultant de l'expression hétérogène en FGF4.

#### **IV La formation d'un blastocyste mature**

Une fois la décision prise entre le destin Epi ou EPr, aucune modification dans l'environnement extracellulaire ne peut changer cette décision. Cela a été confirmé par différents types d'expériences telles que la réalisation de chimères entre une cellule unique marquée issue de la MCI d'un blastocyste placée dans un blastocyste récepteur (Chazaud et al., 2006; Grabarek et al., 2012) ou les expériences de traçage des lignages cellulaires *via* des rapporteurs de protéines fluorescentes sous le contrôle des régions régulatrices des facteurs clés du développement tels que *Nanog* (Xenopoulos et al., 2015) ou *Gata4/6* (Freyer et al., 2015; Schröter et al., 2015).

##### **IV.A Les dérivés de l'EPr**

Les cellules d'EPr, lors de leur maturation, vont se ségréger et se polariser vers la surface de la MCI pour former un épithélium à l'interface de la cavité blastocoelique. Ces cellules vont alors exprimer, durant cette maturation, des marqueurs plus tardifs à l'expression de GATA6. L'expression de ces autres facteurs de transcription se fait dans un ordre bien précis, contrôlé au niveau temporel : GATA6 > SOX17 > PDGFR $\alpha$  > GATA4 > SOX7 (**Figure 1** - Artus et al., 2011; Niakan et al., 2010; Ohnishi et al., 2014).

##### **IV.A.1 Les marqueurs de l'EPr mature**

- PDGFR $\alpha$

La signalisation RTK-PDGF est aussi impliquée lors du développement précoce de l'embryon au cours de la maturation de l'EPr. *Plusa et al* montrent que le *Pdgfra* est exprimé faiblement dans les cellules externes et internes au stade morula, puis son expression se restreint à la MCI pour finalement être présente uniquement dans les cellules d'EPr au stade E3.75/E4.0 (Plusa et al., 2008). De plus, *Kurimoto et al* détectent son expression ARNm au sein des cellules uniques des précurseurs de l'EPr au stade E3.5 (Guo et al., 2010; Kurimoto, 2006). Le micro-array réalisé au sein de notre équipe par *Gerbe et al* confirment ce résultat (Gerbe et al., 2008). Il a été mis en évidence que le récepteur PDGFR $\alpha$  est exprimé dans les cellules souches XEN (Kunath et al., 2005). Dans les cellules ES, l'expression du PDGFR $\alpha$  est dépendante de celle de GATA6 puisque dans les cellules déplétées en *Gata6*, PDGFR $\alpha$  n'est pas exprimé (Artus et al., 2010).



- SOX17

*Sox17* est un facteur de transcription activé précocement dans l'EPr après GATA6. Au sein de l'embryon, l'ARNm de *Sox17* est exprimé au niveau maternel et zygotique et son expression se poursuit jusqu'au stade 64 cellules avec une légère augmentation au sein des cellules EPr (Guo et al., 2010; Wang et al., 2004). En revanche, au niveau protéique, SOX17 s'exprime au sein des cellules d'EPr exprimant GATA6, à partir du stade 32 cellules, bien qu'une expression soit à noter dès l'initiation de la différenciation de ces cellules mais de manière très faible (Artus et al., 2011; Morris et al., 2010; Niakan et al., 2010). La hiérarchie entre SOX17 et GATA6 est confirmée par l'analyse des embryons *Gata6*<sup>-/-</sup> déplétés en expression de SOX17 et les cellules ES *Sox17*<sup>-/-</sup> qui expriment GATA6, montrant que SOX17 est bien en aval de GATA6 dans la hiérarchie d'expression des marqueurs d'EPr (Niakan et al., 2010). En embryons, GATA6, SOX17 et GATA4 sont colocalisés au sein de la MCI (Morris et al., 2010; Niakan et al., 2010).

La déplétion génétique de *Sox17* entraîne, lors de la première analyse de ces embryons, des défauts sévères de formation de l'endoderme définitif et de l'intestin primitif (Kanai-Azuma et al., 2002; Shimoda et al., 2007) mais l'absence de phénotype plus précoce a été attribuée à l'expression possiblement redondante de SOX7 (Artus et al., 2011). Or, une analyse plus fine des mutants *Sox17*<sup>-/-</sup> lors d'expériences de diapause, révèle une désorganisation et un détachement prématuré des cellules d'EPr avec une migration des cellules du PE le long du TE mural suggérant un rôle de SOX17 non pas dans la spécification de l'EPr mais lors de sa maturation, de son épithélisation et du maintien de son intégrité (Artus et al., 2011). La formation de membrane basale est normale (Niakan et al., 2010).

SOX17 renforcerait, en stimulant l'expression de *Gata6* et *Gata4*, la différenciation des cellules ES vers un destin d'EPr et en inhibant les gènes de pluripotence tels que *Sox2*, *Nanog* et *Oct4* pour contrer la capacité d'auto-renouvellement des cellules (Niakan et al., 2010; Qu et al., 2008; Shimoda et al., 2007). Cependant, l'ensemble de ces résultats ne permet pas de savoir si la surexpression de SOX17 est suffisante pour différencier les cellules ES en endoderme ou s'il facilite seulement la formation d'endoderme extra embryonnaire (ExEn) lorsque les cellules ES sont poussées à se différencier (Niakan et al., 2010; Qu et al., 2008; Shimoda et al., 2007).

- GATA4 et GATA5

Outre le facteur GATA6, les facteurs GATA4 et GATA5 sont aussi impliqués dans la maturation de l'EPr mais ils ne sont pas requis pour sa différenciation. GATA4 est exprimé à partir du stade E3.75 ou E4.0 au sein de l'EPr (Cai et al., 2008; Plusa et al., 2005). Les embryons homozygotes mutants pour *Gata4* ou *Gata5* ne présentent aucun défaut dans l'initiation de l'EPr (Molkentin, 2000; Narita et al., 1997; Soudais et al., 1995). Cela montre que les facteurs *Gata4* et *Gata5* ne sont pas requis pour la



différenciation de l'EPr. Ainsi, une redondance fonctionnelle, basée sur des mécanismes de compensation, peut être déduite de ces analyses entre les facteurs GATA. Néanmoins, une nuance est à apporter par l'étude phénotypique des embryons mutants *Gata6*<sup>+/-</sup> et *Gata4*<sup>+/-</sup> qui montre que cette redondance n'est pas totale puisque des défauts cardiaques sont observés (Xin et al., 2006).

Des expériences réalisées en modèles cellulaires *in vitro* ont permis de mieux comprendre le(s) rôle(s) des facteurs GATA et leur(s) relation(s) hiérarchique(s) lors de la maturation de l'EPr.

L'expression ectopique des facteurs *Gata4* et *Gata6* est suffisante pour induire la différenciation spontanée des cellules ES en EPr (Cho et al., 2012; Fujikura, 2002; Kunath et al., 2005; Shimosato et al., 2007; Wamaitha et al., 2015). L'inactivation du gène *Gata4* rend impossible la différenciation des cellules ES en EPr. Néanmoins, la culture de corps embryonnaires (CE) établis à partir de ces cellules mutantes avec de l'acide rétinoïque (ATRA ou RA, dérivé de la vitamine A), acteur de la différenciation en EPr (Grover and Adamson, 1986), induit l'expression de *Gata6* et *Gata5* pour sauver le phénotype (Capo-Chichi et al., 2005, 2010; Soudais et al., 1995). Ce phénotype peut aussi être restauré par l'expression induite de *Gata5* par transfection (Capo-Chichi et al., 2005).

Cependant, la culture de CE mutants pour *Gata6* traités au RA ne permet pas de sauver le phénotype puisque les marqueurs de l'EPr tel que GATA4 ne sont pas trouvés exprimés (Capo-Chichi et al., 2005). Cela montre que *Gata4* n'est pas induit par le RA ; ce qui n'est pas le cas de *Gata5* qui lui est activé dans les cellules mais n'est en revanche pas suffisant pour mener à bien la différenciation de l'EPr puisqu'elles ne forment pas d'EP (Capo-Chichi et al., 2005, 2010). Il a été déduit de cela que GATA6 est requis pour la sensibilité au RA (Capo-Chichi et al., 2005).

Enfin, il a été mis en évidence que GATA6 pouvait réguler par fixation directe le facteur *Gata4* via la présence dans sa séquence de régions consensus W-GATA-R reconnues par GATA6 (Wamaitha et al., 2015).

Ainsi, ces expériences révèlent une redondance fonctionnelle entre certains facteurs GATA et expliquent l'absence de phénotype des embryons mutants *Gata4*<sup>-/-</sup> et *Gata5*<sup>-/-</sup>.

#### **IV.A.2 Ségrégation, polarisation et tri du lignage EPr**

La poursuite de la différenciation des populations de cellules d'Epi et d'EPr nécessite leur tri et l'adoption d'une position précise au sein de l'embryon. Les divisions cellulaires provoquent des mouvements passifs de déplacement et de changements de position des cellules pour permettre de libérer de la place au sein de la MCI compacte pour les cellules filles produites. Cependant, ces mouvements passifs n'expliquent pas les modifications de distance importantes (Meilhac et al., 2009). Des mouvements actifs sont requis et les travaux de Meilhac et al montrent que ces mouvements sont régis par l'actine (Meilhac et al., 2009; Moore et al., 2009). Ainsi, ces mouvements actifs peuvent être



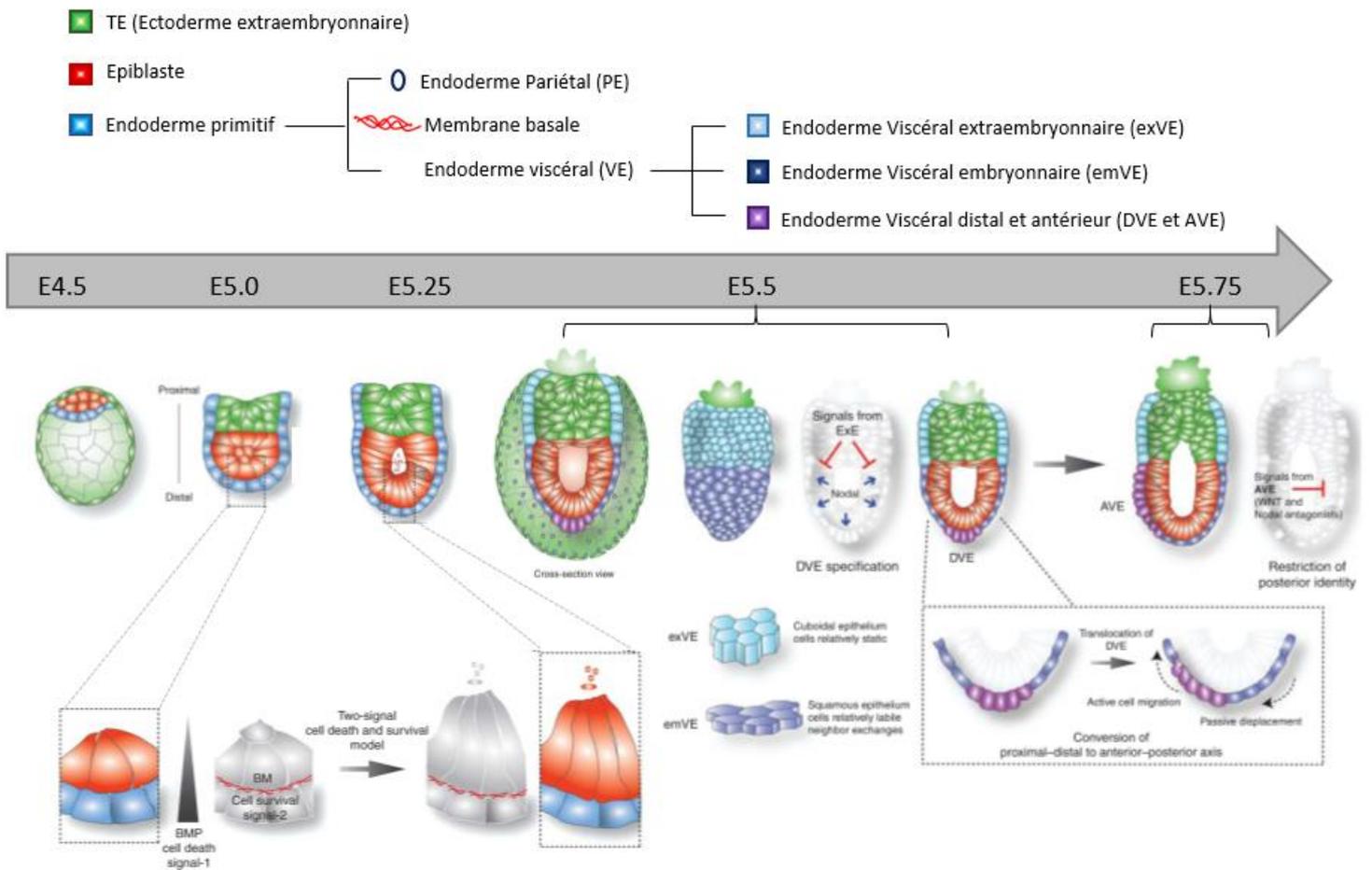
compatibles avec la migration, la diminution de l'adhésion cellulaire, les modifications dans la contraction corticale, l'intercalation cellulaire et la mort cellulaire entre E3.75 et E4.0 et contribuent au tri des lignages. Lors du positionnement des cellules d'EPr à la surface de la MCI, on assiste à une production de laminine et de composants de la membrane basale qui sont déposés entre l'épiblaste et l'endoderme.

Un micro-array réalisé dans l'équipe par *Gerbe et al* identifie *Lrp2* (« Low density lipoprotein receptor-related protein 2 ») comme nouveau marqueur de l'EPr. L'expression de ce marqueur permet de visualiser l'acquisition d'une polarité au stade E3.75 des cellules de l'EPr lors de l'implantation de l'embryon (Artus et al., 2011; Gerbe et al., 2008; Saiz et al., 2016; Yamanaka et al., 2006).

En effet, LRP2 est exprimée aux stades E3.5 et E4.5. Au stade E3.5, LRP2 est exprimée dans le cytoplasme des cellules alors que son expression est membranaire et polarisée du côté apical au stade E4.5 (Gerbe et al., 2008). L'expression de LRP2 est retrouvée au sein des cellules du TE et de l'EPr au stade E3.5 pour être finalement perdue au sein du TE mais maintenue dans l'EPr au stade E4.0 (Assémat et al., 2005). La polarisation des cellules d'EPr a lieu de manière asynchrone et individuelle dans chaque cellule, au moment où celles-ci se positionnent à la surface de la cavité blastocœlique (Gerbe et al., 2008).

Un autre marqueur, DAB2 (« Disabled Homolog 2 »), permet de visualiser cette polarisation des cellules EPr. DAB2 interagit avec LRP2 (Gallagher et al., 2004; Oleinikov et al., 2000). L'expression de *Dab2* révèle son rôle dans la ségrégation des cellules d'EPr. Au niveau ARNm, *Dab2* est exprimé dès le stade 8 cellules dans l'embryon (Guo et al., 2010) puis cette expression se maintient dans le TE et dans l'EPr au stade E4.0. Chez la souris, les embryons *Dab2*<sup>-/-</sup> présentent une désorganisation de la MCI avec des cellules d'EPr GATA4 positives situées au sein de la MCI. Cette désorganisation engendre un arrêt du développement des embryons au stade E5.5 (Yang et al., 2002, 2007). La différenciation en corps embryonnaires (CE) montre une expression de *Dab2* au sein des cellules d'épithélium externe (Smith et al., 2001a, 2001b). *Dab2* est requis pour la polarisation des cellules d'EPr (Smith et al., 2001b), notamment en excluant l'E-CADHERINE du pôle apical ce qui provoque la polarisation de LRP2 (Gerbe et al., 2008; Yang et al., 2007). Enfin, DAB2 est capable de lier certaines protéines de type intégrine justifiant son rôle dans l'ancrage et la ségrégation des cellules d'EPr (Huang et al., 2006).

Enfin, le marqueur SOX7 est un des marqueurs les plus tardifs lors de la maturation de l'EPr. SOX7 s'exprime spécifiquement dans les cellules dans l'embryon à 64 cellules au sein d'une sous population de cellules PDGFR $\alpha$  positives localisées à la surface de la MCI en contact avec la cavité blastocœlique (Artus et al., 2011) ce qui suggère qu'il serait probablement colocalisé avec les marqueurs DAB2 et LRP2. Ainsi, son expression succède à celle des marqueurs d'EPr et permet d'établir la chronologie suivante: GATA6 > SOX17 > PDGFR $\alpha$  > GATA4 > LRP2 – DAB2 – SOX7 (Artus et al., 2011; Niakan et al., 2013; Ohnishi et al., 2014). Ainsi, le positionnement des cellules et leur polarité sont dus



**Figure 21 : Développement tardif de l'embryon**  
(Adaptée de Rivera-Perez and Hadjantonakis 2015)

à l'expression de régulateurs spécifiques des différents lignages mais leur contribution pour l'induction du tri cellulaire n'est pour le moment pas connue. La probable co-expression des marqueurs DAB2 et LRP2 au stade E3.75 suggèrerait un rôle de SOX7 dans la régulation ou le maintien des signaux de positionnement pour les cellules ayant une destinée d'EPr.

Enfin, les protéines aPKC jouent un rôle central dans la polarisation des cellules externes de la morula tout d'abord pour induire le devenir du TE (Dard et al., 2009; Eckert et al., 2004; Johnson and Ziomek, 1981; Plusa et al., 2005; Ralston and Rossant, 2008). L'étude récente de Saiz *et al* montre que l'identité des cellules joue un rôle déterminant sur leur polarisation notamment avec les cellules EPr qui sont enrichies en protéine aPKC avant leur tri et leur polarisation (Saiz et al., 2013). La polarisation de la protéine aPKC au domaine apical n'a lieu seulement lorsque la cellule EPr a atteint la surface. Ainsi, l'inhibition de ces protéines engendre des défauts de ségrégation des cellules EPr, des défauts dans leur maturation et dans l'expression des marqueurs tardifs ainsi que des défauts dans la polarité épithéliale (Saiz et al., 2013). Cela suggère un défaut d'ancrage des cellules plutôt qu'un défaut dans le tri des cellules.

#### **IV.A.3 La différenciation de l'EPr en endoderme pariétal ou viscéral**

L'EPr, exprimant ainsi ses marqueurs tardifs, va ensuite se différencier, au stade E4.75, en deux lignées cellulaires présentant des caractéristiques morphologiques et moléculaires différentes (**Figure 1** - pour revue Stower and Srinivas, 2014).

D'une part, les cellules épithéliales d'Epi vont croître et s'étendre au sein de la cavité blastocoelique. Les cellules de l'EPr attachées à la membrane basale de ces cellules d'Epi vont s'organiser en monocouche et se différencier en cellules cuboïdales d'endoderme viscéral (EV) qui constitue un des lignages dérivés de l'EPr. Ces cellules d'EV sont aussi en contact avec les cellules d'Ectoderme Extraembryonnaire (ExE) qui correspond aux cellules du TE polaire qui ont proliféré et qui se sont différenciées (**Figure 21**). Deux populations d'EV sont à distinguer au niveau morphologique et au niveau moléculaire : les cellules d'endoderme viscéral extraembryonnaire (exVE) et d'endoderme viscéral embryonnaire (emVE) respectivement en contact de l'ExE ou en contact avec l'Epi (**Figure 21**).

L'EV est requis pour la mise en place de l'axe proximo-distal (P/D) défini par la zone distale constituée par l'EV (DVE) correspondant à une région où les cellules sont épaissies (Rivera-Pérez et al., 2003) et qui expriment les marqueurs *Hex*, *Cerberus-like (Cer1)* et *Lefty-1* (**Figure 21** - Ang and Constam, 2004; Chazaud et al., 2006). Le DVE va ensuite migrer dans la partie antérieure et former l'EV antérieur ou AVE (**Figure 21** - Srinivas et al., 2004) caractérisé par l'expression d'inhibiteurs des structures antérieures tels que *Dkk1*, antagoniste de la voie WNT, *Cer1*, pour la voie BMP et *Lefty-1* pour la voie TGFβ (« Transforming Growth Factor ») (Ang and Constam, 2004). Cela va permettre d'induire la partie antérieure de l'embryon.

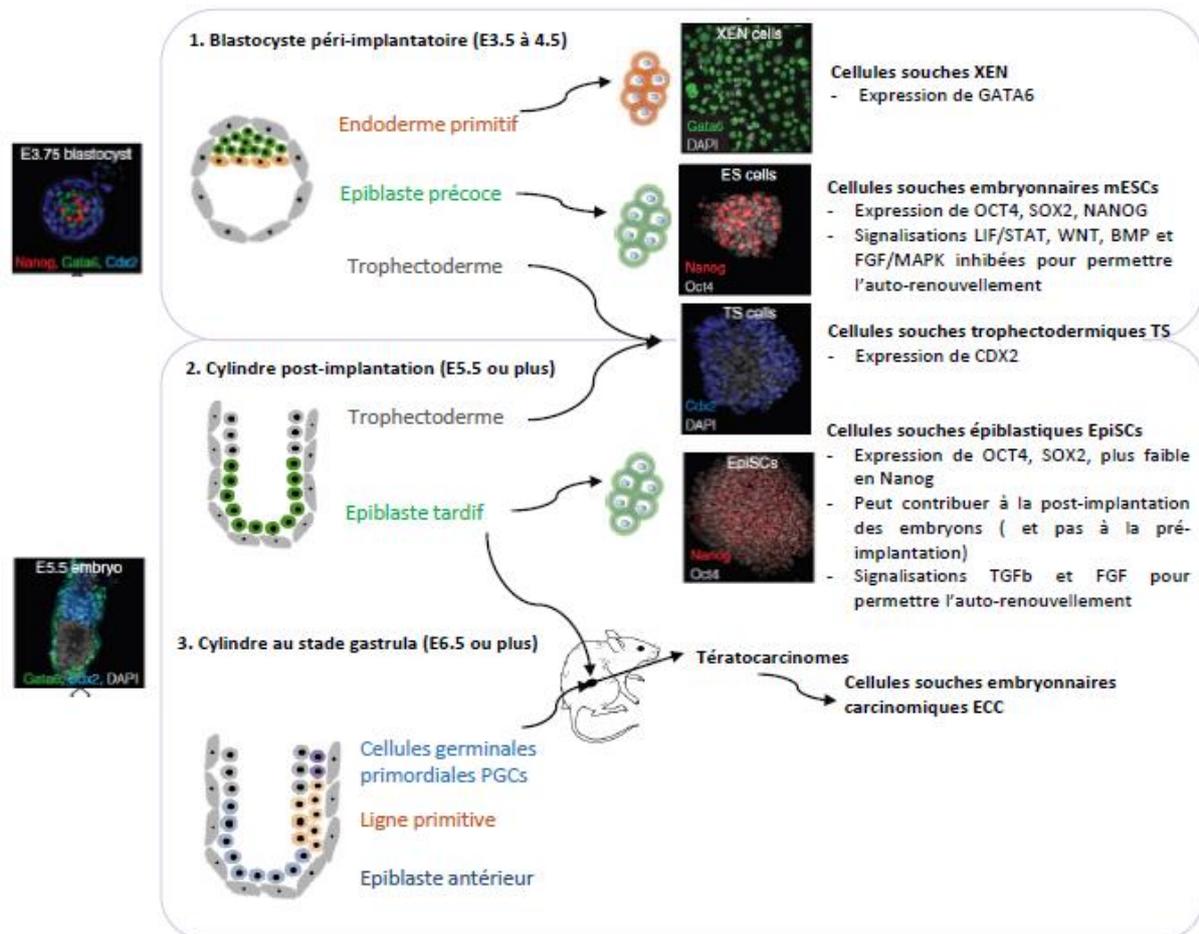


D'autre part, l'autre sous population de cellules d'EPr va subir un processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) pour devenir des cellules d'endoderme pariétal (EP). Ces cellules d'EP vont ensuite migrer le long de la membrane basal du TE et vont former la membrane de Reichert du sac vitelin. A ce jour, le mécanisme régissant le choix de l'EPr entre le destin EV et EP reste à clarifier.

#### **IV.B Les dérivés de l'Epi**

La maturation de l'Epi débute au stade E4.5, moment avant lequel les cellules d'Epi forment une masse de cellules apolaires qui est séparée de la cavité blastocoelique par une monocouche de cellules d'EPr. A ce stade, l'expression de NANOG va diminuer de manière hétérogène et dépendante au FGF4 (Chambers et al., 2003; Kang et al., 2013). Cependant, cette diminution est réalisée indépendamment de la présence des cellules d'EPr. En effet, dans les embryons *Gata6*<sup>-/-</sup>, l'expression de NANOG diminue elle aussi en absence de cellules d'EPr (Bessonard et al., 2014).

La pluripotence des cellules de l'Epi, au stade E4.5, est nécessaire pour former l'ensemble des cellules du futur individu y compris la lignée germinale. Ainsi, au sein des embryons post-implantation et pré-gastrulation, les cellules matures d'Epi expriment différents marqueurs tels que OCT4, SOX2 (Avilion et al., 2003; Chambers et al., 2003), NANOG à des niveaux faibles, OCT6, marqueur de l'Epi naïf (Buecker et al., 2014), OTX2 et FGF5.



**Figure 22 : Origine (à gauche) et formation (à droite) des différentes catégories de cellules souches pluripotentes *in vivo* et *in vitro***

(Modifiée de Loh et al 2015; Kieffer et al 2010)

Les différents types de cellules souches pluripotentes sont isolés à différents stades de l'embryogenèse, à partir de différents tissus.

## CHAPITRE 2 - L'embryon murin : un modèle de choix pour l'isolement et la dérivation de modèles de cellules souches *in vitro*

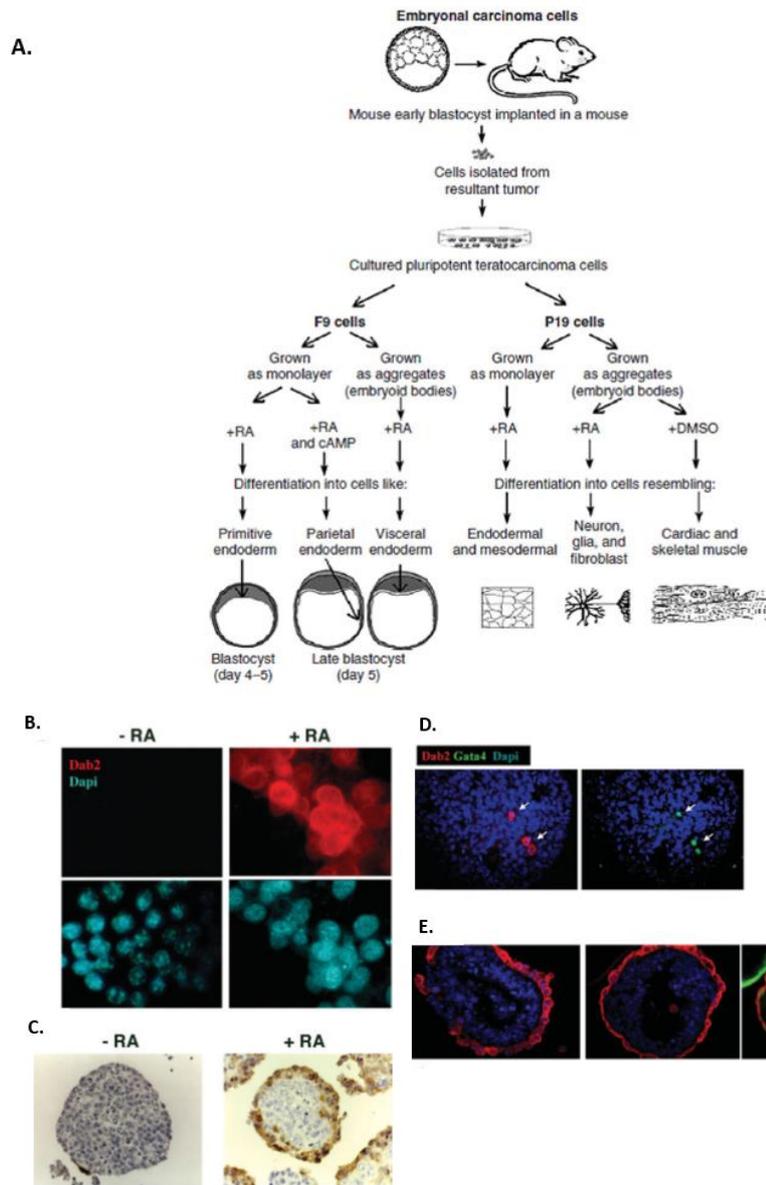
---

---

Différents modèles de cellules souches *in vitro* sont issues du blastocyste et correspondent aux trois tissus présents lors du développement embryonnaire (TE, Epi et EPr): les cellules souches issues du trophoblaste (TS), les cellules souches épiblastiques précoces et tardives (ES et EpiSC (« Cellules Souches Embryonnaires épiblastiques»)) et les cellules souches d'EPr (XEN) (**Figure 22**). Le modèle le plus étudié est celui des cellules souches épiblastiques précoces et tardives (ES et EpiSCs) qui sont capables de donner les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme) après différenciation (**Figure 22**). L'embryon au stade gastrula (6 à 7 jours après fécondation) permet, lorsqu'il est implanté dans une souris, de produire des cellules embryonnaires carcinomiques (ECC) résultant de la formation de tératocarcinomes (**Figure 22**). Ce type d'expérience a ouvert la voie au champ d'étude sur les cellules souches embryonnaires (pour revues Kieffer et al., 2010; Loh and Lim, 2015).

A partir des données sur les cellules souches issues de l'embryon, il a été possible de développer des modèles « artificiels » résultant, après reprogrammation d'une cellule adulte via le remodelage de l'expression de certains facteurs de transcription clés de la pluripotence, de l'acquisition d'un nouvel état dit « souche »(Yamanaka et al., 2006). Ces cellules sont qualifiées de cellules souches pluripotentes induites ou iPS pour « Induced Pluripotent Stem Cells » (**Figure 22**).

Ainsi, dans ce chapitre, je vais procéder au détail de ces différentes catégories de cellules souches issues de l'embryon et décrire leurs caractéristiques afin de mieux comprendre leurs intérêts biologique et scientifique.



**Figure 23 : Les cellules de carcinomes embryonnaires ECC**

A. Différenciation des modèles cellulaires de carcinomes embryonnaires P19 et F9 (Issue de Soprano et al 2007)

**B à E.** Différenciation en endoderme primitif, après traitement au RA, des F9 cultivées en monocouche ou en corps embryoides (CE) ou de cellules ES : (Issue de Rula et al 2007)

B. Immunomarquage de DAB2 dans les cellules F9 en monocouche avec ou sans RA pour 4 jours.

C. Immunomarquage de DAB2 dans des CE produits à partir de cellules F9 après 4 jours de traitement avec ou sans RA.

D. Immunomarcages de sections de CE de 2 jours suivant l'agrégation de cellules ES sans traitement au RA: l'expression de DAB2 est visualisée en rouge et celle de GATA4 en vert. Le DAPI a été utilisé pour marquer les noyaux (en bleu)

E. Immunomarquage de DAB2 (en rouge) et GATA4 (en vert) dans des CE issus de cellules ES sans traitement au RA de 4 (à gauche) et 7 jours (à droite).

## I Tératocarcinomes et cellules embryonnaires de carcinome ECC (Figure 22)

La recherche sur cellules souches embryonnaires débute dans les années 1970, lorsque des embryons totaux sont implantés, par Leroy Stevens, avant leur gastrulation, dans des testicules adultes (Stevens and Little, 1954). Cela a permis la dérivation de cellules de carcinomes embryonnaires appelées ECC (Pierce et al., 1967; Solter et al., 1970; Stevens, 1966), cellules précurseurs de l'ensemble des travaux sur les cellules souches embryonnaires.

### I.A Description

Les cellules ECC, souvent aneuploïdes, sont des cellules indifférenciées qui peuvent être propagées en culture de manière continue et qui ont la capacité de former les trois lignages embryonnaires (ecto-, méso-, et endoderme). Elles ont une origine épiblastique et en possèdent les caractéristiques, démontré par le fait qu'elles peuvent être dérivées à partir de greffes contenant de l'Epi (Martin, 1980). La majorité des lignées ECC présentent une pluripotence réduite, *in vitro* et *in vivo*, ce qui les rend très peu efficaces dans la production de chimères puisqu'elles ne colonisent généralement pas la lignée germinale (Brinster, 1974). Les cellules ECC les plus utilisées et les plus étudiées sont: les cellules F9 et P19, en particulier pour étudier le rôle du RA au cours de leur différenciation (Soprano et al., 2007).

- Les cellules F9

Les cellules F9 ont été isolées à partir d'un tératocarcinome issu de l'implantation d'embryons au stade E6.0-E6.5 dans des testicules de souris (**Figure 23A** - Alonso et al., 1991; Soprano et al., 2007; Stevens, 1970). Cultivées dans un état indifférencié, elles adoptent des caractéristiques épiblastiques et sont nullipotentes de par leur incapacité à se différencier spontanément. Cultivées en suspension, elles forment des corps embryonnaires (CE) (**Figure 23A**). Lorsque l'on traite avec du RA des CE formés à partir d'agrégats de cellules F9 cultivées en suspension ou en boîte de Pétri, les cellules externes de ces CE se différencient en EV (E5.0 - **Figure 23** - Grover et al., 1983; Hogan and Tilly, 1981; Rula et al., 2007). Ces CE peuvent, ensuite, produire, après dépôt sur une surface gélatinée en présence de dbcAMP, des cellules d'EP semblables à celles d'un blastocyste tardif (E5.0 – Grover and Adamson, 1986b; Grover et al., 1983; Solter et al., 1970; Strickland and Mahdavi, 1978; Strickland et al., 1980) ou en différents phénotypes cellulaires issus des trois feuillets comme les cardiomyocytes par exemple. L'adoption de l'acquisition d'un phénotype d'EP induit l'expression de protéines de la matrice extracellulaire telles que la laminine et le collagène de type IV ou la synthèse de tPA (« tissu plasminogen activator »), qui sont des marqueurs et acteurs spécifiques de l'EP (Sherman and Miller, 1978; Strickland et al., 1980).



## **II Les XEN : cellules souches de l'endoderme extra-embryonnaire (Figure 22)**

Les cellules XEN correspondent au lignage d'endoderme extra embryonnaire (ExEn) issu l'EPr au sein du blastocyste précoce.

### **II.A Caractéristiques moléculaires des XEN**

Au niveau moléculaire les XEN expriment des marqueurs de l'EP et de l'EV tels que GATA4, GATA6, FOXA2, SPARC, HhEX et DKK1 (Artus et al., 2011; Kunath et al., 2005; Niakan et al., 2010; Schrode et al., 2014). Cependant concernant d'autres marqueurs, des différences d'expressions sont observées entre lignées XEN issues de blastocystes de souris ou de rat et même entre lignées différentes de XEN de rat. Les marqueurs concernés sont les marqueurs de l'Epi tels qu'*Oct4* et les marqueurs du TE comme *Cdx2* et *Hand1* (Chuykin et al., 2010; Galat et al., 2009).

Ce destin EPr est potentiellement biaisé par la technique expérimentale lors des expériences de chimères qui montrent une participation des cellules XEN à la formation de l'EP principalement et plus rarement à l'EV sans participation à l'Epi et au TE (Galat et al., 2009; Kruithof-de Julio et al., 2011; Kunath et al., 2005). Le manque de contribution au destin EV par les cellules XEN pourrait être expliqué par de nombreux facteurs incluant l'interaction avec le TE mural (Artus et al., 2012), l'altération de voies de signalisation impliquées dans le processus de dérivation ou une dérivation de cellules ayant perdu leur « potentialité ».

### **II.B Isolement des XEN**

#### **II.B.1 Protocoles d'isolement**

Les XEN ont été isolées récemment par *Kunath et al* (Kruithof-de Julio et al., 2011; Kunath et al., 2005; pour revue Rossant, 2007) à partir de blastocystes cultivés sur cellules nourricières en présence du ligand FGF4 et d'héparine mais l'isolement des cellules XEN peut s'effectuer de différentes manières. Cela explique les différentes observations précédentes et suggère que les cellules XEN ne requièrent pas l'activation ou la répression d'une voie de signalisation particulière pour leur dérivation.

Des XEN ont été isolées à partir de blastocystes de rat (Chuykin et al., 2010; Debeb et al., 2009; Galat et al., 2009). Ces cellules présentent un état endodermique immature puisqu'elles expriment des marqueurs d'ES tels que OCT4, REX1, AP et SSEA1 et qu'elles peuvent contribuer de manière équivalente à l'EP et l'EV dans les expériences de chimères. Cela leur attribue un état « plastique/primaire » dans l'engagement vers les cellules ExEn ; précurseurs des cellules souches d'endoderme extraembryonnaire et montre une forte dynamique dans leur contribution aux différents lignages d'une chimère par exemple.



Ces cellules ExEn sont dérivées de cellules mES via une activation artificielle des facteurs GATA pour l'acquisition des propriétés similaires aux XEN, « XEN-like », aussi appelée gExEn (Shimosato et al., 2007). Ainsi, les facteurs de transcription GATA6 et GATA4 jouent un rôle important dans la différenciation des cellules XEN, en amont du facteur SALL4. L'expression forcée et maintenue de ces facteurs dans les cellules mESC permet de mimer les caractéristiques des cellules XEN *in vivo* et *in vitro* (Fujikura, 2002; Shimosato et al., 2007) révélant le rôle suffisant des facteurs GATA dans la spécification de ces XEN. Les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> échouent dans leur différenciation en EPr et en endoderme extraembryonnaire ainsi que dans l'expression de marqueurs précoces et tardifs de l'EV (Koutsourakis et al., 1999; Morrisey et al., 1998). En revanche, l'expression ectopique de GATA6 dans les cellules ES entraîne leur différenciation en endoderme extraembryonnaire (Fujikura, 2002). Les corps embryonnaires dérivés des cellules ES *Gata4*<sup>-/-</sup> traités au RA arrivent à se différencier en EV et EP (Bielinska and Wilson, 1997; Soudais et al., 1995) suggérant une compensation par GATA6 dont l'expression est abondante dans les couches endodermiques de ces corps embryonnaires (Bielinska and Wilson, 1997).

De plus, il est possible à partir de cellules ES d'obtenir des cellules XEN par traitement au RA et par l'activine A (Cho et al., 2012; Niakan et al., 2013). Les concentrations en RA et activine sont primordiales.

Il est aussi possible de dériver des XEN (cXEN) à partir de cellules mES maintenues en LiF + sérum ou en cocktail 2i (Cho et al., 2012). Ces cellules cXEN présentent une expression nulle d'*Oct4* et *Nanog* ainsi qu'une expression élevée des gènes du programme de différenciation ExEn ce qui diffère des cellules XEN-like qui présentent de faibles niveaux d'*Oct4* et *Nanog* et des niveaux intermédiaires des gènes du programme de différenciation ExEn. De plus, le FGF exogène n'est pas requis sauf altération du FGF4 endogène contrairement aux cellules mES qui requièrent une signalisation RTK-FGF/MEK-ERK activée pour la différenciation en XEN (Cho et al., 2012).

Le facteur SOX17 est aussi nécessaire puisqu'il est impossible d'isoler des cellules XEN à partir de ces embryons *Sox17*<sup>-/-</sup> (Niakan et al., 2010) alors qu'il a été observé que l'inhibition de *Sox17* par injection d'ARN interférents, inhibe le maintien des cellules XEN en culture (Lim et al., 2008). Cependant, différentes études n'arrivent pas aux mêmes observations et conclusions. En effet, La surexpression de SOX17 permet de convertir des ES en XEN qui contribuent au destin ExEn lorsqu'elles sont injectées en embryons précoces (McDonald et al., 2014). Les travaux de *Niakan et al* montrent que les corps embryonnaires dérivés des cellules *Sox17*<sup>-/-</sup> échouent dans la spécification en ExEn (Niakan et al., 2010) alors que *Shimoda et al* montrent que la différenciation de ces cellules en EPr est normale sauf pour la différenciation en EV et EP (Shimoda et al., 2007). Le rôle de SOX17 dans les cellules XEN reste donc à élucider.



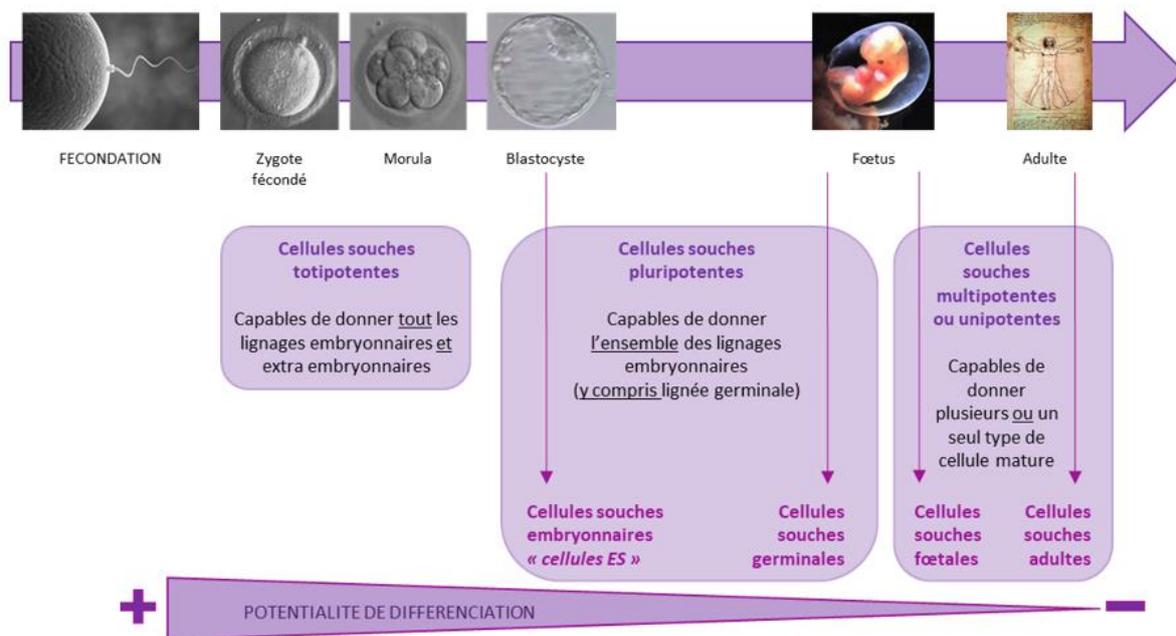
## II.B.2 Voies de signalisation clés dans la différenciation des XEN

Diverses voies de signalisation RTK-FGF, TGF $\beta$  et BMP jouent un rôle clé dans la différenciation des cellules XEN. La signalisation RTK-PDGF est requise pour cet isolement (Artus et al., 2010) et notamment pour l'expansion et la prolifération des XEN.

L'importance de la voie RTK-FGF a été mise en évidence par différents travaux. En routine, le FGF4 ou le FGF2 sont généralement ajoutés dans le milieu lors de la dérivation de cellules XEN à partir d'embryons (Kunath et al., 2005). Dans les cellules mES, les FGF, dont le FGF4, ne sont pas requis pour leur maintien mais seulement pour la différenciation (Kunath et al., 2007; Stavridis et al., 2007; Wamaita et al., 2015). Or, il a été mis en évidence que les cellules *Fgf4*<sup>-/-</sup> survivantes, isolées dans un milieu de dérivation des XEN, ne produisent pas de cellules XEN sous traitement avec du RA et activine (Cho et al., 2012). Les inhibitions de FGF ou de ERK alliées à l'inhibition de la GSK3 permettent d'ailleurs le maintien de l'auto-renouvellement des cellules ES pluripotentes (Ying et al., 2008). Il est impossible de surexprimer à un niveau élevé des marqueurs XEN-spécifiques tels que *Gata6*, *Gata4* et *Sox17* dans des cellules ES mutantes issus d'embryons *Fgfr1*<sup>-/-</sup> *Fgfr2*<sup>-/-</sup> (Molotkov et al., 2017).

Il est à noter que l'EPr exprime de manière hétérogène les marqueurs de DVE/AVE comme *Cerberus1* et *Lefty1* (Takaoka et al., 2006; Torres-Padilla et al., 2007) et la signalisation Nodal/Activine est aussi active (Granier et al., 2011). Cette voie est finement contrôlée par des inhibiteurs tels que CERBERUS1 et LEFTY1. En 2012, *Cho et al* ont été capables de dériver des cellules XEN à partir de cellules ES en ajoutant de l'activine et du RA en culture dont les caractéristiques ressemblent en tout point à celles des cellules XEN dérivées des embryons (Cho et al., 2012). Une forte dose de RA ou d'Activine promeut la différenciation des mES en neurones ou endoderme définitif respectivement (Bibel et al., 2004; Kubo et al., 2004) alors qu'une faible dose est gage de conversion efficace en XEN.

Les traitements des cellules XEN avec des protéines recombinantes NODAL ou du CRIPTO, son récepteur, membres de la famille TGF $\beta$ , entraînent un phénotype d'EV *in vivo* et *in vitro* en activant l'expression du marqueur AFP et du marqueur du DVE/AVE CERBERUS1 (Artus et al., 2012; Kruithof-de Julio et al., 2011; Paca et al., 2012). Si l'on utilise ces cellules XEN traitées avec du NODAL ou CRIPTO recombinant, pour la formation de chimères, elles participent à la formation de l'exEX, de l'emVE et l'AVE (Kruithof-de Julio et al., 2011). L'activation de la signalisation WNT par inhibition de la GSK3 ou par élévation du niveau de  $\beta$ -CATENINE induit la formation de contacts cellulaires et l'expression des complexes ZO-1/E-cadhérine/Actine corticale dans les cellules XEN ce qui est consistant avec la formation d'un épithélium d'EV (Chuykin et al., 2013). Enfin, les cellules XEN traitées avec du BMP2/4 présentent une différenciation rapide avec des caractéristiques de l'EV et notamment d'exVE et d'emVE (Artus et al., 2012; Paca et al., 2012). Le blocage de la voie SMAD1/5/8, transmettant le signal d'activation de la voie BMP, renforcé par le blocage de la voie RTK-FGF/MEK-ERK, entraîne une



**Figure 24 : Potentialité de différenciation des cellules souches au cours du développement embryonnaire et de la vie adulte**

diminution de l'expression des marqueurs de l'EV tels que l'AFP, HNF4a, et une augmentation de GATA6 et de la TRHOMBOMODULINE, marqueur de l'EP.

Ainsi, les cellules XEN sont capables d'être différenciées en cellules d'EP, exVE, emVE et AVE en jouant sur les voies WNT, BMP, NODAL et RTK-FGF/ MEK-ERK.

### **III Cellules souches embryonnaires: m(urines)ES (Figure 22)**

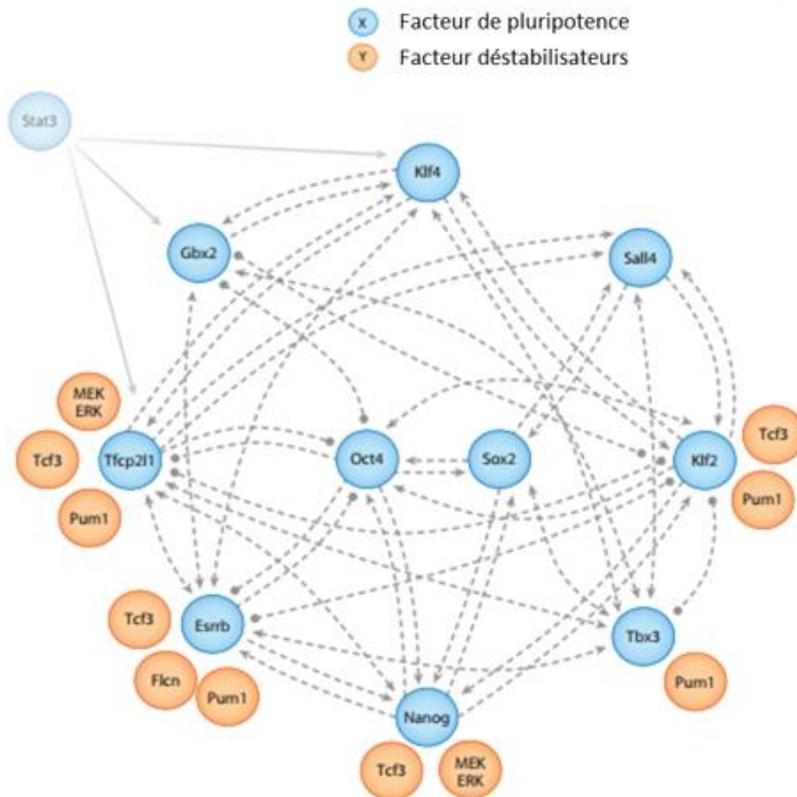
#### **III.A Définition**

Les cellules souches embryonnaires ou cellules ES (« stem cells »), ont été isolées en 1981 chez la souris (mES), à partir de cultures primaires de blastocystes en présence de cellules nourricières (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Les cellules ES ressemblent fortement aux cellules ECC de par leur morphologie, leur comportement en culture et leur expression génique. En l'absence de marqueurs moléculaires spécifiques actuellement caractérisés, la définition d'une cellule souche embryonnaire est essentiellement fonctionnelle et repose sur sa capacité ou « potentialité » à se différencier en différents types cellulaires (**Figure 24**). De ce fait, il a été retenu deux caractéristiques fondamentales : l'auto-renouvellement et la pluripotence. Ces deux propriétés sont définies comme suit :

- ♦ *la pluripotence* : les cellules sont capables de se différencier *in vitro* dans les trois lignages à l'origine des tissus composant l'organisme adulte : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme et de coloniser la lignée germinale lors de la création de chimères.
- ♦ *l'auto-renouvellement* : les cellules peuvent se multiplier de façon illimitée, de manière physiologique, tout en conservant leur propriété de pluripotence ce qui les qualifie de cellules immortelles, indifférenciées, par opposition aux cellules cancéreuses qui acquièrent cette propriété au cours d'un processus pathologique.

#### **III.B Propriétés des cellules souches pluripotentes**

La pluripotence des cellules souches embryonnaires murines est définie par leur capacité, si elles sont injectées dans un blastocyste, à développer un embryon chimérique et à coloniser l'ensemble des tissus somatiques et germinaux. Ces approches de manipulation des cellules souches ES ont permis de produire des animaux chimériques sauvages, KO (par inactivation de gènes ciblés) ou transgéniques et ont été couronnées par le prix Nobel de médecine en 2007 (*Décerné à M. Evans, M. Capecchi et O. Smithies*).



**Figure 25 : Relations d'activation ou d'inhibition entre les différents facteurs clés contrôlant l'état de pluripotence**  
 (Issue de Martello and Smith 2014)

En 2006, Yamanaka et son équipe ont révolutionné le domaine des cellules souches en ramenant à un état pluripotent, dé-différencié, *via* des agents viraux, des cellules différenciées grâce à l'expression forcée des 4 gènes (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) codant pour des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'expression de l'ADN (**Figure 25** - Takahashi and Yamanaka, 2006). L'état dé-différencié des cellules est un état pluripotent caractéristique du stade embryonnaire et semblable aux cellules ES.

Le facteur NANOG, identifié pour sa capacité à soutenir l'auto-renouvellement des cellules ES en absence de LIF (Chambers et al., 2003), permet le maintien de la pluripotence dans les cellules ES en promouvant l'expression d'*Oct4* et *Sox2* et en inhibant les programmes d'expression des gènes impliqués dans la différenciation en EPr (Niakan et al., 2010). Dans les cellules ES, les niveaux d'expression de *Nanog* fluctuent et il a été proposé qu'une régulation mono-allélique du gène *Nanog* pourrait contribuer à son patron hétérogène d'expression dans ces cellules (Chambers et al., 2007; Kalmar et al., 2009; MacArthur et al., 2012; Mitsui et al., 2003; Miyanari and Torres-Padilla, 2012; Singh et al., 2007).

Cependant, cette hypothèse fait toujours l'objet de discussions suite à la réalisation d'études en cellule unique utilisant des rapporteurs alléliques ou par hybridation *in situ* qui ont révélé qu'il était fort probable que la régulation allélique de *Nanog* ne contribue pas à la variation de son expression (Faddah et al., 2013; Filipczyk et al., 2013). Or, *Chambers et al* démontrent que *Nanog* n'est pas essentiel pour le maintien des cellules ES mais qu'il est nécessaire à l'établissement de nouvelles lignées ES ou IPS à partir de blastocystes (Chambers et al., 2007).

La découverte faite par S. Yamanaka a ouvert la possibilité d'obtenir des cellules souches à partir de n'importe quel individu et non pas à partir d'un embryon et lui a permis d'obtenir en 2012 le prix Nobel de Médecine. Depuis, d'autres facteurs régulateurs activateurs et répresseurs ont été décrits (**Figure 25** – Martello and Smith, 2014).

### **III.C Isolement, dérivation et culture des cellules ES**

L'isolement des cellules souches ES est réalisé à partir d'embryon lors des toutes premières étapes de l'embryogenèse. Ces cellules, de par leur capacité infinie d'auto-renouvellement, constituent de manière théorique une source inépuisable de cellules. Or, il est nécessaire de maintenir l'état indifférencié des ES au fil de leur amplification *in vitro*. Des conditions de cultures particulières permettent la conservation de la pluripotence et des propriétés intrinsèques de ces cellules « souches ». Cependant, ces conditions biologiques et techniques relatives et nécessaires à leur entretien et à leur amplification ne sont pas encore complètement définies et maîtrisées ce qui, actuellement, ouvre la voie à de nombreux projets de recherche.



En effet, les lignées de cellules souches issues de l'embryon sont génétiquement instables et sujettes à des dérives au cours des passages successifs qui favorisent l'apparition de diverses anomalies chromosomiques comme les duplications. De plus, certaines de ces cellules nécessitent la présence de « cellules nourricières » comme par exemple les fibroblastes embryonnaires (MEF). Des facteurs essentiels sont produits par ces cellules dites « nourricières ».

L'amélioration des conditions de culture permet de nos jours de se passer de la présence de cellules nourricières. Il a été mis en évidence que l'utilisation d'autres composés permettait de conserver la pluripotence des cellules *in vitro*. Le LIF (« Leukemia Inhibitory Factor »), membre de la famille des Interleukines-6 (IL-6), a été le premier facteur identifié dans ce maintien de l'état de pluripotence par technique de fractionnement du milieu de culture conditionné (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988) et son action passe par STAT3 dont la phosphorylation est nécessaire pour l'activité ADN dépendante du LIF (Boeuf et al., 1997). L'analyse des mutants *Lif* confirme que la phosphorylation et l'activation de STAT3 est sous la dépendance du LIF au stade 4 cellules en embryon (Do et al., 2013; Tebbutt et al., 2002). Les mutants *Stat3* révèlent que STAT3 est nécessaire non pas pour la spécification mais pour le maintien des lignages Epi et EPr au sein de la MCI au stade E4.5 (Do et al., 2013).

L'ajout de BMP4 (ou BMP2) allié au LIF, permet de s'affranchir du sérum et des cellules nourricières (Ying et al., 2003). L'analyse des embryons mutants pour les gènes *Bmp4* et *Lif* ne montre que des phénotypes postérieurs à la mise en place de l'Epi (Lawson et al., 1999; Takeda et al., 1997; Winnier et al., 1995).

Cela suggère plusieurs hypothèses sur le maintien de la pluripotence dans le blastocyste : (i) cela utilise d'autres voies de signalisation, (ii) des phénomènes de compensation ont lieu entre ces voies, (iii) une implication maternelle est possible. Le développement du cocktail d'inhibiteurs 2i, des voies RTK-FGF/MEK-ERK et WNT, agissant au niveau de la cascade MEK/ERK et GSK3, permet de maintenir les cellules dans un état indifférencié dans un milieu sans LIF, ni BMP4 ni sérum (Nichols et al., 2009; Ying et al., 2008). En effet, l'ajout de sérum, de composition variable et imprécise, à la culture, était un frein à la caractérisation des molécules impliquées dans le maintien de la pluripotence et de l'auto-renouvellement de ces cellules *in vitro*. Or, la culture de cellules ES ne se fait pas obligatoirement en cocktail 2i : le maintien des caractéristiques mères des cellules ES peut s'effectuer sans ces facteurs.

Dans les cellules ES, l'expression forcée des facteurs Gata6 ou Gata4 est suffisante pour induire une trans-différenciation des cellules en ExE (Fujikura, 2002; Schröter et al., 2015; Shimosato et al., 2007; Wamaitha et al., 2015). Enfin, le retrait du LIF dans des ES cultivées sur plusieurs semaines, entraîne la formation de corps embryonnaires exprimant, en outre, à leur surface le marqueur endodermique GATA4 (Choi et al., 2005).



## CHAPITRE 3 - La famille GATA : membres, mise en évidence, rôle des facteurs de transcription GATA6 et GATA4 et de leur implication lors de la différenciation de l'EPr

---

---

### I La famille GATA

#### I.A Généralités

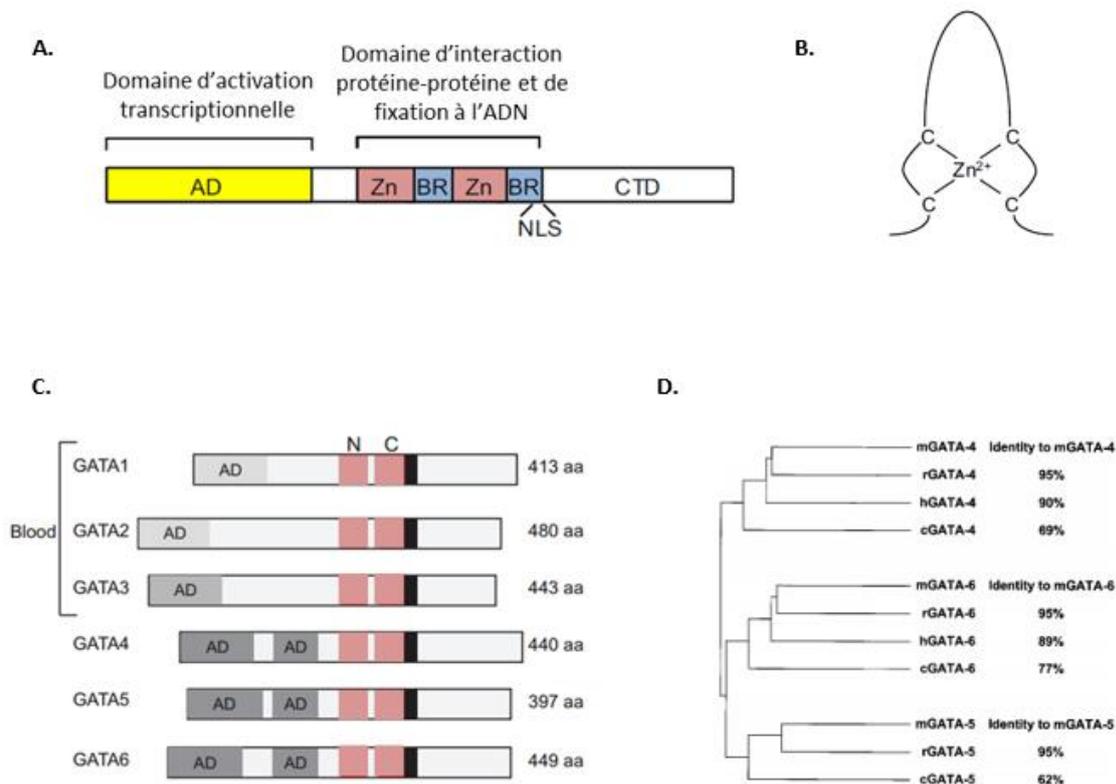
La famille GATA représente une classe importante des facteurs de transcription chez les eucaryotes de tous les règnes (Lowry and Atchley, 2000) et cela dans les différents types cellulaires. Chez les vertébrés, cette famille comporte 6 membres désignés par GATA1 à GATA6. Les végétaux expriment un nombre important de gènes codant pour les facteurs GATA : pas moins de 29 membres sont dénombrés pour *Arabidopsis Thaliana* par exemple alors que l'on en trouve 5 pour *Drosophila melanogaster* et 11 pour *Caenorhabditis elegans* (Patient and McGhee, 2002; Reyes et al., 2004).

Les facteurs GATA doivent leur nom au fait qu'ils reconnaissent et se lient à des motifs spécifiques de l'ADN tels que : 5' – (T/A)GATA(A/G) – 3', séquence consensus autrement nommée WGATAR (ou W=A ou T et R=A ou G). Cette séquence se retrouve le plus souvent dans les régions promotrices de gènes cibles ce qui permet aux facteurs GATA de réguler leur transcription.

Comme développé précédemment, ces facteurs de transcription GATA sont impliqués dans de nombreux processus de différenciation cellulaire incluant des mécanismes parallèles comme les régulations épigénétiques (Stefanovic and Christoffels, 2015).

Les 6 membres de la famille GATA chez les vertébrés peuvent être sous divisés en deux sous-groupes suivant leur homologie et leur profil d'expression : un groupe hématopoïétique comprenant les facteurs GATA1, 2 et 3 et un groupe endodermique ou cardiaque qui regroupe les facteurs GATA4, 5, et 6 ; groupe auquel je m'intéresse plus particulièrement.

Les gènes *Gata4/5/6* codent pour des protéines de 48, 42 et 45 kDa respectivement (Arceci et al., 1993; Morrisey et al., 1996, 1997). Les protéines GATA4 à 6 sont exprimées de manière prédominante dans les tissus endodermiques et mésodermiques (Arceci et al., 1993; Chazaud et al., 2006; Laverriere et al., 1994; Morrisey et al., 1996, 1997, 1998; Plusa et al., 2008) et participent à des régulations transcriptionnelles au cours du développement embryonnaire précoce et plus tardif. Ces facteurs de transcription ont des profils d'expression distincts qui peuvent cependant se chevaucher. Ils sont tous exprimés au niveau du cœur et de l'épithélium intestinal.



**Figure 26 : Structure de la séquence protéique des facteurs GATA chez les Vertébrés.**

- Structure générale des facteurs GATA chez les vertébrés. Les facteurs GATA présentent un domaine d'activation transcriptionnelle (TAD ou AD) en NH2 terminal (indiqué par « AD » - en **jaune**), deux domaines à doigts de zinc, hautement conservés, (Zn - en **rose**) avec les séquences adjacentes (BR- en **bleu**), une séquence signal de localisation nucléaire (NLS) et un domaine COOH terminal (CTD) (Issue de Aronson et al 2014).
- Structure d'un doigt de zinc chez les facteurs GATA. Le doigt de zinc est composé de 4 résidus cystéine de type IV, Cys-X2-Cys-X17 -Cys-X2-Cys, (où C représente un résidu cystéine et X représente n'importe quel autre acide aminé) qui coordonne la fixation d'un ion zinc bivalent (Issue de Aronson et al 2014).
- Forte homologie de structure entre les membres de la famille GATA. (Issue de Chlon et Crispino 2012).
- Conservation des facteurs GATA4/5 et 6 chez différentes espèces: souris (mouse), rat (rat), homme (human), poulet (chicken). Le pourcentage d'identité d'homologie entre les séquences murine, rat, humaine et poulet des facteurs GATA4/5 et 6 sont indiqués et rapportés par rapport à la protéine murine. (Issue de Charron et Nemer 1999)

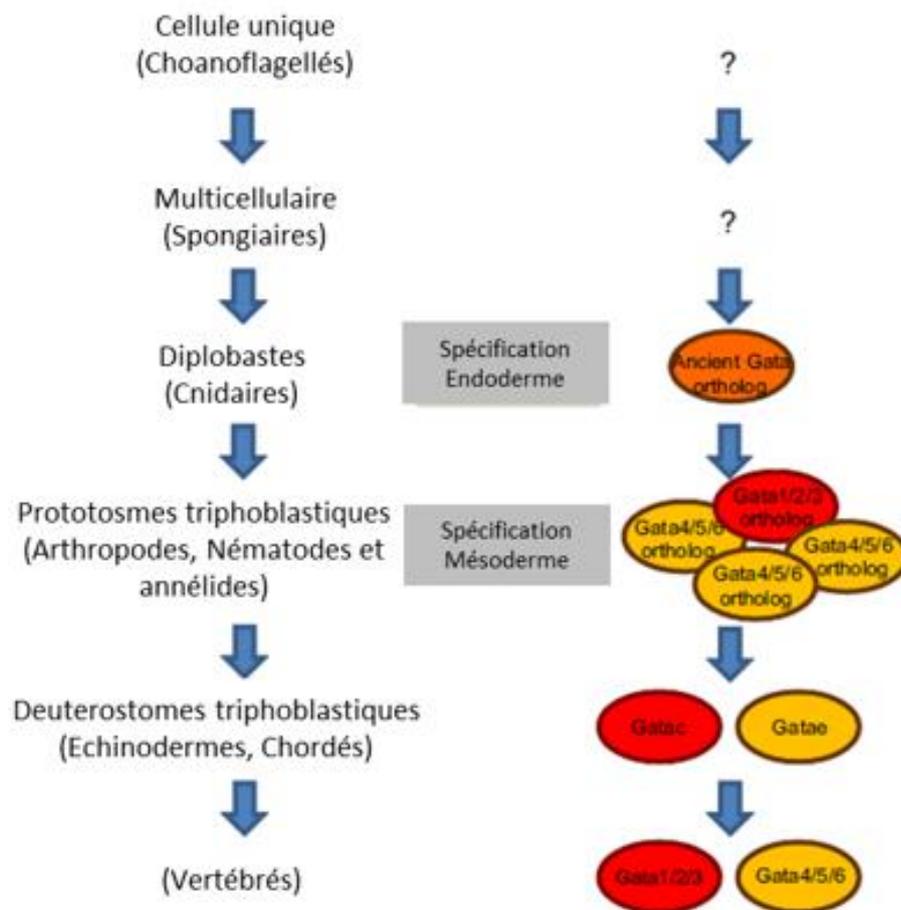
## **I.B Structure et homologie des membres de la famille GATA (pour revue Aronson et al., 2014)**

### **I.B.1 Structure**

Chez les vertébrés, les 6 membres GATA présentent des domaines trans-activateurs (TAD ou AD) et deux domaines à doigts de zinc de type IV (**Figure 26A et 26B** - Patient and McGhee, 2002). Le domaine à doigt de zinc en COOH-terminal reconnaît et médie avec une haute affinité la fixation à l'ADN *via* la séquence consensus WGATAR. Le domaine en NH<sub>2</sub>-terminal, quant à lui, stabilise l'interaction de la protéine GATA avec l'ADN (**Figure 26A et 26B** - Yang and Evans, 1992). De plus, les domaines à doigts de zinc permettent de médier des interactions physiques et fonctionnelles avec d'autres partenaires transcriptionnels ce qui va préciser la spécificité d'action des facteurs GATA (Aronson et al., 2014; Durocher et al., 1997; Eisbacher et al., 2003; Fox et al., 1998; Morin et al., 2000; Svensson et al., 1999; Tremblay et al., 2002). Le mode d'action précis de ces doigts de zinc et de l'interaction avec l'ADN reste cependant méconnu sur certains aspects. Des analyses biochimiques et structurales par cristallographie, révèlent deux mécanismes d'action (Bates et al., 2008). Le premier passerait par une interaction/dimérisation protéine-protéine impliquant deux protéines GATA pour la fixation à l'ADN. Le second mécanisme impliquerait une fixation simultanée des deux doigts de zinc en NH<sub>2</sub>- et COOH-terminal du même facteur GATA sur l'ADN.

### **I.B.2 Homologie**

Les deux classes des facteurs GATA sont issues, au même moment, d'événements de duplication du gène GATA et entraînent une divergence fonctionnelle (**Figure 27**). De ce fait, les facteurs GATA1/2/3 sont engagés dans la différenciation hématopoïétique et les facteurs GATA4/5/6 sont engagés dans la différenciation endodermique. Chez les vertébrés, les membres de la famille GATA présentent une très forte homologie entre eux : tous les membres sont hautement conservés chez de nombreuses espèces au cours de l'évolution avec en moyenne 85% d'homologie au niveau protéique au niveau des régions de fixation à l'ADN contenant les doigts de zinc et les régions basiques (**Figure 26C et 26D** - Charron and Nemer, 1999; Molkentin, 2000) ; comparées aux autres motifs - les domaines trans-activateurs - qui sont moins conservés au cours de l'évolution dans la famille GATA (Chlon and Crispino, 2012). Ainsi, les différents membres de la famille GATA se lient avec la même affinité à la molécule d'ADN (Ko and Engel, 1993; Merika and Orkin, 1993).



**Figure 27 : Evolution des facteurs GATA au cours du temps chez les Métazoaires**  
 (Issue de Aronson et al 2014)

Les facteurs GATA sont apparus chez les cnidaires diploblastiques lors de la spécification endodermique avec la présence d'un ancien orthologue (en orange). Puis lors de la spécification mésodermique, il est apparu deux classes de facteurs GATA: les orthologues des facteurs GATA1/2/3 (en rouge) qui donneront la classe cardiaque et les orthologues des facteurs GATA4/5/6 (en jaune) qui donneront la classe endodermique.

### I.B.3 Recrutement et interaction avec des co-facteurs activateurs et répresseurs

En 2007, *Ferreira et al* montrent l'importance de la dynamique, finement régulée spatio-temporellement, des niveaux d'expression de facteurs clés régulateurs d'éléments *cis*. C'est notamment le cas des facteurs GATA dans le processus de différenciation spécifique des lignages comme par exemple le facteur hématopoïétique GATA1 dans le contexte de l'érythropoïèse (*Ferreira et al., 2007*).

De plus, la complexité de régulation de ces facteurs et l'impact sur l'expression de leurs gènes cibles s'observent dans l'étude du phénotype des souris doubles mutantes *Gata4/Gata6* (*Xin et al., 2006*). En effet, d'après cette étude, la délétion des gènes *Gata4* et *Gata6* séparément, à l'état hétérozygote, ne provoque pas de phénotype particulier chez les souris suggérant une compensation de ces deux facteurs. En revanche, les travaux de *Xin et al*, montrent que les niveaux d'expression combinés des protéines GATA4 et GATA6 doivent être très précisément contrôlés puisque à l'état hétérozygote pour les deux protéines GATA en simultanément (*Gata4+/- Gata6+/-*), on observe une létalité au niveau embryonnaire des souris (*Xin et al., 2006*). Ainsi, cela suggère un rôle complémentaire mais divergent de ces deux protéines. Cela a été confirmé par l'effet dose de la présence d'un allèle de *Gata6* observé dans les embryons hétérozygotes *Gata6+/-* (*Bessonard et al., 2014; Schrode et al., 2014*).

Afin de réguler leur activité transcriptionnelle, les facteurs GATA se lient à des cofacteurs qui vont moduler soit leur affinité et donc leur attachement à leur motif WGATAR soit leur interaction protéine-protéine à d'autres cofacteurs ce qui permet d'ajouter un autre niveau de spécificité pour l'induction ou l'inhibition transcriptionnelle de gènes cibles. Différentes études montrent une interaction physique entre le doigt de zinc en NH<sub>2</sub>-terminal des facteurs GATA et des co-régulateurs transcriptionnels. Parmi ces derniers, on retrouve les facteurs FOG1/2/3 (« Friend of GATA »), qui interagissent uniquement avec les facteurs GATA1/2/3 ; NKX2.5, dHAND, BMI1, PU-1, PIT1, CYCLINE D2, NF-AT3, CBP/p300, etc. Ainsi, peu ou pas de partenaires « PrE-spécifique » sont connus à ce jour.

## II Focus sur le facteur GATA6

### II.A Description génomique, transcriptionnelle et traductionnelle

La séquence génomique codant pour GATA6 est localisée sur le bras long du chromosome 18. La transcription du gène produit un pré-ARN messager possédant 7 exons (**Figure 28**).

Les gènes murins et humains *Gata6* ont la caractéristique de présenter un exon alternatif non codant, exon 1 (exon1a et exon 1b chez *Brewer et al., 1999*), en partie 3' ; caractéristique similaire chez les autres membres de la famille GATA. L'exon 1a est situé à 1426bp chez l'homme et 1297bp chez la souris de l'exon II et contient différents sites d'épissage alternatif (**Figure 28**). Situé le plus en



**Figure 28 : Organisation génomique du gène *Gata6*, formes transcriptionnelles et traductionnelles (Ensembl)**

A-B. Le gène *Gata6* est composé de 7 exons dont l'exon 2 qui comprends deux codons « start » méthionines illustrés en C et D.

B. Les formes transcriptionnelles sont diverses et sont indiquées en B. Les sites d'épissages alternatifs principaux produisant ces formes ARN ont été indiqués entre les exons 1 et 2 et entre les exons 2 et 3 (en noir).

C-D. Les formes protéiques sont au nombre de deux chez la souris, une forme longue (C) et une forme courte (D).

amont côté 5', il est très conservé au cours de l'évolution suggérant une potentielle fonction régulatrice de celui-ci. Cela a été confirmé par expériences de transfection transitoire dans lesquelles il est observé que cet exon 1a stimule positivement la transcription de l'exon 1b (Brewer et al., 1999). L'exon 1b, quant à lui, est exprimé par un évènement isolé d'initiation de la transcription 616bp en aval de l'extrémité 3' de l'exon 1a et est lui aussi entouré de site donneur-accepteur pour l'épissage alternatif (**Figure 28**). Bien que les exons 1a et 1b aient été vus comme étant fortement conservés, les régions introniques situées entre ceux-ci ne le sont pas.

Seuls les exons II à VI sont codants avec comme particularité pour les exons III et IV de coder les régions à doigts de zinc (**Figure 28**). Différents sites d'épissage alternatifs sont présents entre les exons II et III chez la souris et entre les exons IV, V et VI chez l'homme (**Figure 28** - Brewer et al., 1999). Ainsi, différentes isoformes transcriptionnelles sont possibles (formes longue et courte) et détectées avec une prévalence pour celles transcrites de l'exon 1a (Brewer et al., 1999).

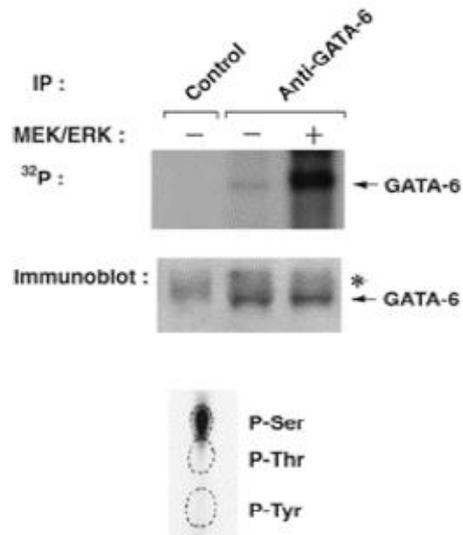
Au niveau traductionnel, il existe deux isoformes différentes produites par deux codons méthionine initiateurs situés dans l'exon II (**Figure 28**). Ces isoformes protéiques sont les suivantes : une isoforme longue de 595 acides aminés produisant une protéine de 64 kDa chez l'homme et de 59 kDa chez la souris et une isoforme courte de 449 acides aminés produisant une protéine de 52 kDa chez l'homme et de 44,7 kDa chez la souris. Ces deux isoformes protéiques possèdent, comme l'ensemble des facteurs GATA, les mêmes domaines caractéristiques (**Figure 26** - Takeda et al., 2004). Chez la souris, les doigts de zinc de GATA6 sont situés en position 384-408 pour le premier et 438-462 pour le second. En revanche, l'activité trans-activatrice des deux isoformes est différente puisque la forme longue de GATA6 présente une efficacité plus forte comparée à la forme courte (Brewer et al., 1999; Takeda et al., 2004). En effet, il a été mis en évidence que 83 acides aminés en position N-terminale sur la forme longue de GATA6 sont responsables de l'augmentation de l'efficacité trans-activatrice de *Gata6*. Cependant, dans les expériences de *Brewer et al*, en cellules d'hépatoblastome HepG2, la forme longue est favorisée (Brewer et al., 1999).

## **II.B Rôle de GATA6**

GATA6 joue un rôle essentiel pour lors de la pré-implantation comme précisé précédemment.

## **II.C GATA6 et pathologies**

De nombreuses pathologies et cancers impliquent le facteur de transcription GATA6. Dans les adénocarcinomes oesophagiques, une amplification génomique des facteurs *Gata6* et *Gata4* est fréquemment retrouvée (Dulak et al., 2012). Les niveaux de GATA6 sont élevés dans les cryptes intestinales murines et la prolifération cellulaire est réduite dans les souris *Gata6*<sup>-/-</sup>.



**Figure 29 : Mise en évidence de la phosphorylation *in vitro* de la protéine GATA6 par le cocktail MEK/ERK sur des résidus sérines dans des cellules CaCo2**

(Issue de Adachi et al 2008)

Immunoprécipitation de GATA6 avec un anticorps anti-GATA6 et incubation avec un mélange de protéines kinases MEK/ERK et d'ATP marqué radioactivement ( $\gamma$ - $^{32}$ P) ATP et visualisation soit par autoradiographie ou par Western blot. L'astérisque (\*) désigne l'IgG à chaîne lourde.

(Beuling et al., 2008, 2011). Ces modifications d'expression de *Gata6* notamment dans ces cellules à haut potentiel proliférant, peut entraîner de nombreuses pathologies telles que des pathologies gastro-intestinales et des cancers de l'osophage et de l'estomac (Ayanbule et al., 2011; Haveri et al., 2008) De plus, il a été montré que *Gata6* est amplifié dans les cancers pancréatiques (Fu et al., 2008; Kwei et al., 2008; Sulahian et al., 2014). Des mutations dans le gène de *Gata6* ont été trouvées comme causant des défauts dans la formation cardiaque chez l'homme *via* une dérégulation de la signalisation sémaphorine-dépendante (Kodo et al., 2009).

### **III Modifications post-traductionnelles des facteurs GATA**

La traduction des protéines est complétée par des modifications chimiques ou biologiques appelées « modifications post-traductionnelles » (MP-T) permettant d'affiner la conformation, la fonction, l'activité et/ou la localisation des protéines (Bah and Forman-Kay, 2016). En effet, les MP-T permettent de moduler l'activité activatrice ou inhibitrice de certaines protéines et sont catalysées, la majeure partie du temps, par des enzymes particulières.

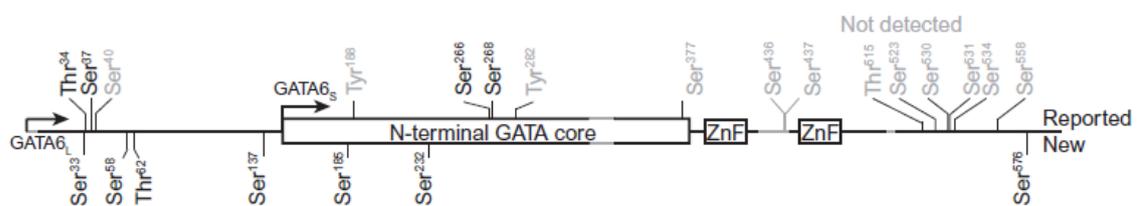
#### **III.A Les facteurs GATA et la phosphorylation**

La phosphorylation consiste en l'ajout d'un groupement phosphate sur des résidus sérine, thréonine ou tyrosine. Cette réaction est catalysée par des protéines appelées kinases qui ont un motif de phosphorylation spécifiques comme les protéines MAPK de la voie RTK-FGF (ERK, JNK, p38, etc.) ou les kinases cyclines dépendantes (Cdk).

Les effets d'une phosphorylation sur une protéine sont très variables : ils dépendent à la fois de la protéine ciblée mais aussi de la kinase responsable de cette modification (Cheng et al., 2011). La phosphorylation d'une protéine peut altérer sa fonction *via* la régulation de son activité enzymatique, sa structure/repliement, sa stabilité, sa localisation cellulaire, ou sa fixation à des partenaires ou à l'ADN.

Ainsi, l'ajout d'une ou plusieurs phosphorylation(s) sur une protéine peut induire des effets négatifs ou positifs comme par exemple :

- ♦ moduler son activité transcriptionnelle *via* une diminution/augmentation de l'affinité de fixation sur ces gènes cibles tel qu'observé pour GATA3 (Furusawa et al., 2013) ou GATA4 (Charron et al., 2001; Liang et al., 2001; Tremblay and Viger, 2003)
- ♦ permettre/bloquer l'ajout d'une autre MP-T telle que l'ubiquitination ce qui entraîne ou bloque la dégradation par le protéasome tel qu'observé pour GATA1 (Hernandez-Hernandez et al., 2006), GATA2 (Koga et al., 2007) ou GATA3 (Shinnakasu et al., 2006, 2008; Yamashita et al., 2005).



**Figure 30 : Représentation schématique de nouveaux sites de phosphorylation potentiels par la GSK3 sur la forme longue de la protéine GATA6 humaine**  
(Issue de Chitforoushzadeh et al 2016)

Des expériences de spectrométrie de masse ont permis d'identifier 11 sites de phosphorylation de la forme longue de GATA6 (GATA6L). Les nouveaux sites (New) sont inscrits en dessous de la séquence alors que les sites déjà reportés (Reported) dans la littérature sont inscrits au dessus de la séquence. Les sites non détectés dans l'étude (Not detected) sont inscrits en gris au dessus de la séquence. Les codons « start » méthionines sont désignés par des flèches pour la forme longue et la forme courte. Les domaines à doigts de zinc (ZnF) et transactivateur (N-terminal GATA core) sont aussi illustrés.

- ♦ Favoriser/bloquer la translocation de la protéine GATA dans le noyau et empêcher son activité transcriptionnelle au vu de son impossibilité à se fixer sur l'ADN comme constaté pour GATA2 (Menghini et al., 2005) ou GATA3 (Maneechotesuwan et al., 2007).
- ♦ Favoriser/inhiber le recrutement de cofacteurs tel que GATA4 et la protéine STAT (Wang et al., 2005).

La phosphorylation engendre aussi des modifications dans l'intégrité de la fonction protéique. Les changements peuvent apparaître dès qu'un certain seuil dans le nombre de sites de phosphorylation phosphorylés, est atteint et dépassé ; ou alternativement lors d'une réponse graduelle et proportionnelle au nombre de sites phosphorylés.

L'équipe d'*Adachi et al* en 2008, a montré que GATA6 est phosphorylée, au sein de cellules d'adénocarcinomes colorectaux CaCo2, par les protéines MEK1/2 sur la Sérine 120 de la forme courte de GATA6 chez l'Homme (Sérine 266 sur la forme longue de GATA6) correspondant à la Sérine 264 de la forme longue chez la souris (**Figure 29** - Adachi et al., 2008). Dans ces travaux, des expériences d'inhibition de la phosphorylation par mutagenèse dirigée (Ser120>Ala) ont permis de voir que l'activité transcriptionnelle de GATA6 ainsi que l'activation du promoteur *Nox1*, GATA6-dépendant, étaient abolies (Adachi et al., 2008).

GATA6 peut aussi être phosphorylée par AKT2 sur la Sérine 290 chez la souris, lorsque la voie mTORC est inhibée, ce qui stabilise GATA6, permet son accumulation dans le noyau et l'augmentation de son affinité pour l'ADN engendrant la trans-activation de promoteurs codants pour des protéines impliquées dans la contractilité pour *in fine* inhiber la prolifération (Xie et al., 2015).

Enfin, de nombreux autres sites sérines et thréonines phosphorylés ont été mis en évidence récemment au sein de la forme longue de GATA6 humaine (**Figure 30** - Chitforoushzadeh et al., 2016).

### **III.B Les facteurs GATA et l'ubiquitination**

L'ubiquitinylation est une réaction covalente d'ajout d'ubiquitine, protéine d'environ 76 amino-acides soit 8,5 kDa (Swatek and Komander, 2016). Cette MP-T permet l'adressage de la protéine ciblée au complexe de dégradation cellulaire qu'est le protéasome. De nombreux autres rôles lui sont attribués dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'embryogenèse, la régulation de la transcription, l'apoptose par exemple (pour revue Guharoy et al., 2016).

Chaque facteur GATA présente des résidus capables d'être ubiquitinés. Différentes équipes ont montré que l'ubiquitination de ces facteurs entraînait leur dégradation par le protéasome.

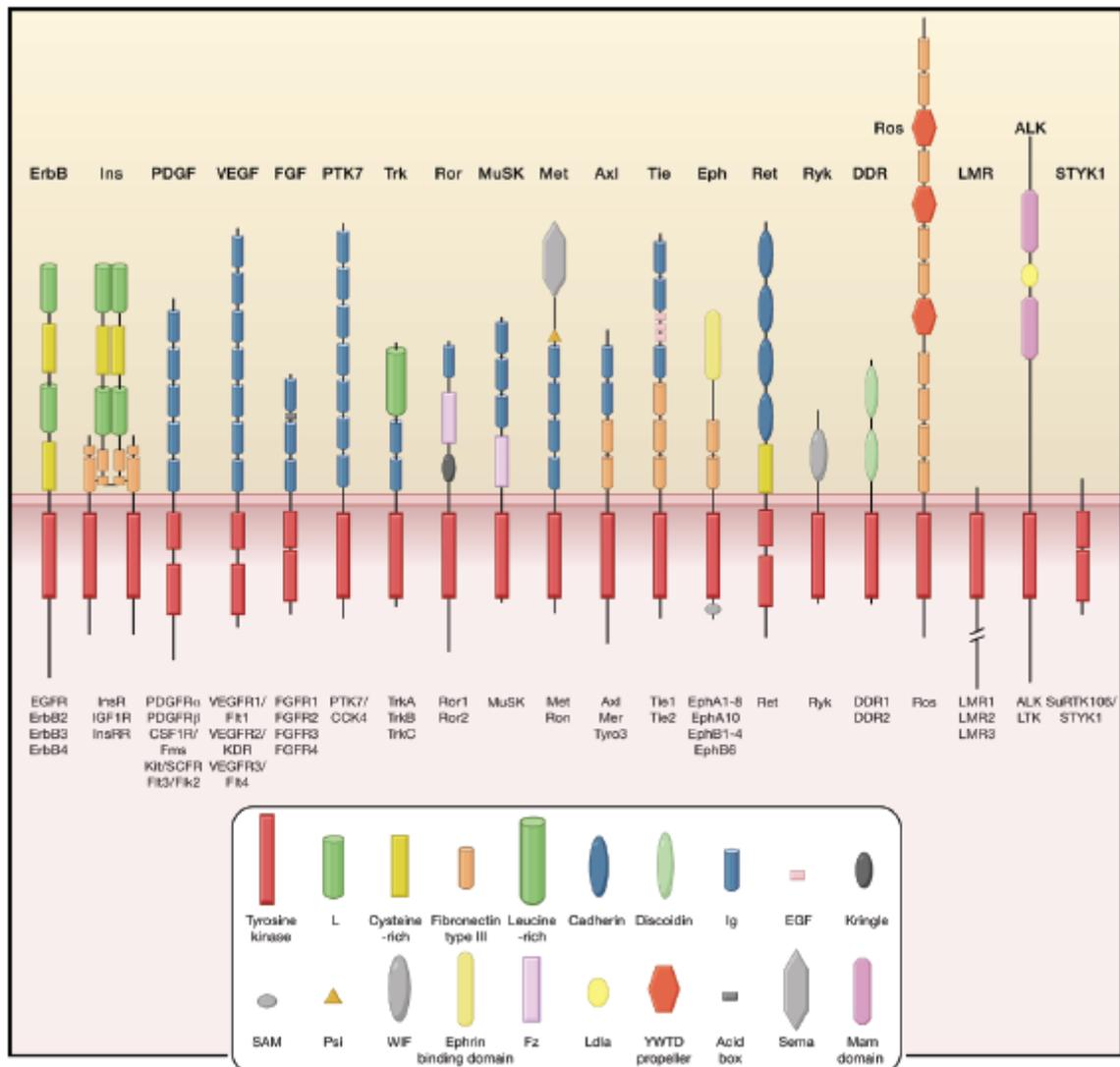
Il a été mis en évidence, en cellules XEN, que GATA6 interagit avec la protéine BMI1



notamment *via* le doigt de zinc et la partie C-terminale pour GATA6 et le domaine Ring à doigt de zinc pour la protéine BMI1 (Lavial et al., 2012). Cette interaction promeut la différenciation en EPr en stabilisant GATA6 pour empêcher son ubiquitination et donc sa dégradation *via* le protéasome. La délétion des domaines à doigts de zinc et C-terminal pour GATA6 entraîne une augmentation de sa stabilité et une diminution de l'ubiquitination lui conférant une protection contre sa dégradation par le protéasome (Lavial et al., 2012). De la même manière la délétion du domaine Ring de BMI1 par mutagenèse entraîne une perte de l'interaction GATA6/BMI1 (Lavial et al., 2012).

### **III.C Les facteurs GATA et autres MP-T**

D'autres MP-T peuvent être retrouvées sur les facteurs GATA telles que l'acétylation (Boyes et al., 1998; Hung et al., 1999; Lamonica et al., 2006), la sumoylation (Collavin et al., 2004; Ferreira et al., 2005), la glycosylation (Martín et al., 2001), etc., mais n'étant pas le sujet principal de ma thèse, je ne développerai pas ces MP-T.



**Figure 31 : Famille des récepteurs tyrosine kinase (RTK)**

(Issue de Lemmon and Schlessinger 2010)

Représentation schématique des 20 différentes sous familles de récepteurs tyrosine kinase humains. Les domaines structuraux des régions extracellulaires, identifiées par leur séquence ou leur organisation structurale sont détaillés dans l'encadré dessous le schéma. Les domaines intracellulaires sont montrés par des rectangles rouges désignant le domaine tyrosine kinase.

De plus, il est à noter que d'autres récepteurs tels que les récepteurs de la famille des intégrines, acteurs de l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire au sein de structures appelées « plaques d'adhérence focales », coopèrent structurellement avec les RTK, comme par exemple l'EGFR, le PDGFR ou le VEGFR, lors de processus variés tels que le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaires. Les intégrines, non représentées sur ce schéma, peuvent néanmoins s'associer aux RTK pour moduler leur activité et interférer dans la transmission du signal de la voie.

## CHAPITRE 4- La voie de signalisation des Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK)

---

---

### **I Structure des récepteurs RTK**

L'ensemble des récepteurs RTK est regroupé en 7 familles principales et réparti en 20 sous populations (**Figure 31** pour revues Lemmon and Schlessinger, 2010; Schlessinger, 2000) comme par exemple les familles ErbB ou EGFR, IGFR, PDGFR et FGFR.

Les récepteurs RTK sont composés de trois domaines distincts : (1) le domaine extracellulaire qui permet la fixation du/des ligands sur le récepteur (Heldin, 1995) ; (2) le domaine transmembranaire qui permet l'ancrage du récepteur à la membrane (Webster and Donoghue, 1996) ; (3) le domaine intracellulaire qui comprend l'activité catalytique tyrosine kinase du récepteur. Ce domaine est fortement conservé entre les différents récepteurs RTK (Hubbard, 2002; Hubbard and Till, 2000; Hubbard et al., 1998). Il a été observé que la mutation d'un seul résidu dans ce domaine entraîne la perte de fonctionnalité du récepteur. Par conséquent, une boucle d'activation fonctionnelle est requise pour la stabilisation de la configuration activée du récepteur ainsi que pour la déstabilisation des interactions en *cis* pour l'auto-inhibition du récepteur (Nolen et al., 2004).

### **II Activation des récepteurs RTK**

L'activation des récepteurs RTK se fait généralement par dimérisation, non covalente, après fixation du ligand mais il est possible d'activer le récepteur sans fixation de son ligand (pour revue Schlessinger, 2000). De manière générale, l'interaction du ligand avec le domaine extracellulaire de son récepteur engendre la dimérisation du récepteur se traduisant par la formation d'un complexe protéique composé de deux chaînes de récepteurs et de deux molécules de ligands. Cependant, la stabilisation suite à la dimérisation peut varier suivant les complexes. La dimérisation du complexe FGF-FGFR ne le rend pas stable et nécessite la présence de molécules d'héparines pour sa stabilisation (Spivak-Kroizman et al., 1994). Il a été mis en évidence que la surexpression du récepteur même en absence de la liaison du ligand ou l'utilisation d'inhibiteurs des protéines tyrosines phosphatases, permet d'augmenter l'autophosphorylation des récepteurs RTK montrant que des dimères peuvent être actifs en absence de la liaison du ligand. Il existe donc plusieurs états d'équilibre entre dimères actifs et inactifs (pour revue Schlessinger, 2000).



La dimérisation non covalente du récepteur RTK (2 molécules de récepteur) fait suite à la fixation du ligand sur le domaine extracellulaire, ce qui entraîne un changement de conformation du récepteur et induit une augmentation de l'activité kinasique par autophosphorylation des tyrosines du récepteur (Heldin, 1995; Lemmon and Schlessinger, 2010; Schlessinger, 2000; Ullrich and Schlessinger, 1990). Il a été mis en évidence, pour le FGFR1, le FGFR2, l'EGFR et le récepteur à l'insuline par exemple, que le processus d'autophosphorylation se fait suivant une réaction ordonnée et séquentielle (Bae and Schlessinger, 2010; Cheng et al., 2011; Furdul et al., 2006; Kobashigawa et al., 2015).

### **III Les récepteurs RTK : focus sur la famille FGFR**

#### **III.A Structure des FGFR**

Chez les mammifères les récepteurs FGFR sont au nombre de 5 nommés FGFR1 à FGFR5, dont le FGFR5 a été découvert récemment (**Figure 31** - Blume-Jensen and Hunter, 2001; Johnson and Williams, 1993; Johnson et al., 1991; Sleeman et al., 2001; Ullrich and Schlessinger, 1990).

Les récepteurs au FGF sont composés de trois domaines immunoglobulines « Ig-like » dans leur partie extracellulaire en N-terminal de la protéine : un domaine D1, et deux domaines D2 et D3, qui médient la fixation du ligand et la spécificité de celle-ci (Jaye et al., 1992; Johnson and Williams, 1993; Plotnikov et al., 1999). L'activité kinase de ces récepteurs est cruciale pour l'induction de réponses intracellulaires et il est donc nécessaire de réguler au mieux celle-ci afin de réduire le potentiel mitogène des FGFRs (Wang et al., 1994).

#### **III.B Ligands et activation normale des FGFR**

L'activation des FGFR combine à la fois la fixation du ligand, les contacts directs récepteurs-récepteurs et l'implication de cofacteurs (Schlessinger, 2000; Stauber et al., 2000).

Les ligands FGF sont des petites protéines monomériques, sécrétées vers le milieu extracellulaire *via* une séquence signal en N-terminal, de 17 à 34 kDa. Ils sont regroupés dans une famille de 22 membres (Ornitz and Itoh, 2001). Un même ligand peut aller se fixer sur plusieurs récepteurs et inversement. Il a été mis en évidence que le ligand FGF1 pouvait se lier aux récepteurs FGFR1 et FGFR2 avec une interaction directe avec les dimères de récepteurs mais sans interaction directe avec un autre ligand (Plotnikov et al., 1999, 2000; Stauber et al., 2000) suggérant le mécanisme commun d'activation des FGFRs.

L'activation du FGFR requiert à la fois le ligand FGF qui connecte une des deux molécules récepteur avec une affinité plus forte pour l'un que pour l'autre, mais aussi de l'héparine ou de l'héparane sulfate protéoglycane, aussi nommé HSPGs, constituants de la matrice extracellulaire,



(Ornitz et al., 1992; Spivak-Kroizman et al., 1994; Yayon et al., 1991) qui connectent pour leur part le ligand ainsi que les deux molécules récepteurs *via* le domaine D2, servant aussi de site d'interaction entre les deux molécules récepteurs (Jaye et al., 1992; Johnson and Williams, 1993). L'ensemble de ces interactions entraîne un changement de conformation et une stabilisation du dimère de récepteurs FGFR. Les sulfates d'héparine jouent un rôle majeur dans la localisation des FGFRs (Klagsbrun, 1990; Matsuo and Kimura-Yoshida, 2013; Shimokawa et al., 2011), dans l'affinité du ligand FGF pour son FGFR ainsi que dans la stabilisation du dimère (Schlessinger et al., 2000). D'autres configurations alternatives peuvent être observées mais ne seront pas développées ici (pour revue Lemmon and Schlessinger, 2010).

### **III.C Rôles de la signalisation RTK-FGF**

La signalisation RTK-FGF est impliquée au cours du développement embryonnaire précoce lors de la spécification et de la différenciation des lignages de la MCI comme détaillé précédemment avec un rôle majeur du ligand FGF4 et du récepteur FGFR1.

Les FGF et FGFR peuvent être retrouvés exprimés dans le noyau où ils ont une fonction non relative à leur activité tyrosine kinase (Arese et al., 1999). FGF1 peut stimuler la synthèse d'ADN de manière indépendante du FGFR. Cependant il n'est pas clair pour le moment si cela implique une fonction transcriptionnelle directe ou une interaction avec d'autres molécules du noyau.

Quant aux récepteurs, ils peuvent être internalisés *via* l'importine  $\beta$ . En effet, le FGFR1 est requis pour la différenciation neuronale et engendre une activation transcriptionnelle *via* son interaction avec la protéine CREB (Fang et al., 2005; Stachowiak et al., 2007).

### **III.D Régulation des FGFR**

L'autophosphorylation du récepteur a pour conséquence de stimuler l'activité catalytique de ce dernier mais aussi de phosphoryler des tyrosines qui permettent la reconnaissance et le recrutement de protéines nécessaires à la transduction du signal en aval de l'activation du récepteur.

Les FGFRs existent sous plusieurs isoformes résultant d'un épissage alternatif dont les sites sont localisés dans la partie extracellulaire du récepteur. Plusieurs types d'isoformes sont recensées: des isoformes ne présentant que la partie extracellulaire et constituant les formes sécrétées des récepteurs, des isoformes où la seconde partie de la dernière immunoglobuline a été modifiée (3 exons, 3 formes IIIa, IIIb, IIIc) des isoformes avec 2 ou 3 domaines Ig. Il est aussi possible de trouver des isoformes qui diffèrent dans la partie intracellulaire du récepteur : dans ce cas deux acides aminés, valine et thréonine (Twigg et al., 1998), sont insérés dans le domaine juxta-membranaire. En outre, dans FGFR1, ces acides aminés sont cruciaux pour l'activation de la voie RTK-FGF/MEK-ERK par exemple (Burgar et al., 2002).



Ces différentes combinaisons d'isoformes permettent de moduler finement la spécificité de liaisons des ligands FGF.

Ainsi, les récepteurs FGFR vont pouvoir activer, après fixation du ligand, différentes branches en aval (**Figure 8**) telles que les branches RAS/RAF/MEK-ERK et RAS/PI3K-AKT.

#### **IV Branches RAS/RAF/MEK-ERK et RAS/PI3K-AKT de la voie RTK-FGF**

La branche RAS/RAF/MEK-ERK est une partie essentielle de la voie RTK-FGF régulant la prolifération cellulaire et la survie notamment mais aussi de nombreux autres processus (pour revues Chang and Karin, 2001; Pearson et al., 2001). Elle constitue la voie canonique induite par la protéine RAS. Cependant, la protéine RAS peut aussi induire une autre branche celle de la PI3K-AKT, considérée comme une voie secondaire.

##### **IV.A Voie canonique MEK-ERK**

La voie canonique de la signalisation RTK-FGF passe par la voie ou « branche » RAS/MAPK comprenant la sous-branche RAS/MEK-ERK. Cette branche est très conservée au cours de l'évolution et est composée de différents niveaux formant la cascade d'activation. Une fois le récepteur à activité tyrosine kinase stimulé, des cofacteurs tels que les protéines FRS2a, CRKL, GRB2, SOS et RAS GTPases (« hydroxylase Guanosine TriPhosphate ») sont activés (**Figure 8** - Bernards and Settleman, 2004; Cheng et al., 1998; Repasky et al., 2004) ce qui active ainsi 3 niveaux de différentes protéines kinases (pour revue Coulombe and Meloche, 2007). Les dernières MAPK vont phosphoryler leurs substrats en ciblant spécifiquement les résidus tyrosine et thréonine. La famille la plus connue et étudiée est la famille ERK1/2 (« Extracellular signal-Regulated Kinase ») (**Figure 8**).

##### **IV.A.1 Les protéines MEK1/2 (Figure 8)**

MEK est une kinase spécifique des résidus sérine, thréonine et tyrosine présentes sous deux isoformes MEK1 et MEK2 (Zheng and Guan, 1993). Leur seul substrat spécifique est la protéine ERK, elle aussi exprimée sous deux isoformes ERK1 et ERK2.

L'activation des protéines MEK1/2 passe par leur phosphorylation *via* les protéines RAS-RAF. Divers inhibiteurs spécifiques de ces protéines tels que le PD0325901 (Barrett et al., 2008; Frankenberg et al., 2011; Lanner and Rossant, 2010; Nichols et al., 2009; Yamanaka et al., 2010) sont utilisés et correspondent à des inhibiteurs de type allostérique qui ne se fixent pas à la poche d'ATP d'où leur forte spécificité. Les phénotypes observés sur embryons lors du traitement avec cet inhibiteur ont été décrits précédemment. L'invalidation de *Mek1* chez la souris provoque la mort embryonnaire au stade E10.5 (Giroux et al., 1999) alors que l'invalidation de *Mek2* n'a pas d'effet durant l'embryogenèse et



ne modifie pas l'activation des kinases ERK1/2 suggérant un effet compensatoire de la protéine MEK1 (Bélanger et al., 2003).

#### **IV.A.2 Les protéines ERK1/2 (Figure 8)**

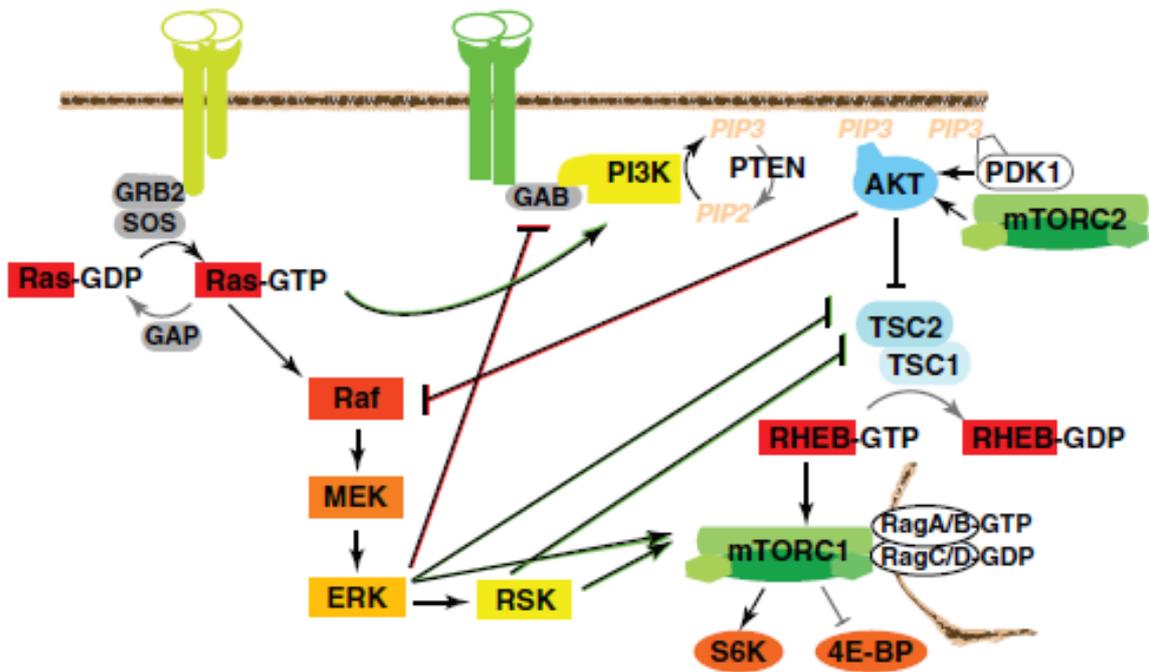
Caractérisées en premier au sein de la famille MAPK, ce sont des kinases sérine, thréonine spécifiques, qui régulent de nombreux processus variés dans divers types cellulaires. L'inactivation du gène codant pour la protéine ERK1 n'a aucun effet sur le développement embryonnaire et adulte chez la souris contrairement à celle de la protéine ERK2 qui engendre une létalité embryonnaire précoce entre les stades E6.5 et E8.5 (Pagès et al., 1999). En effet, ces embryons échouent dans la formation de l'ExE et du cône ectoplacentaire formant un TE mature. L'incapacité de ERK1 à sauver le phénotype de la délétion montre la fonction spécifique de ERK2 lors du développement du TE (Saba-El-Leil et al., 2003). Cependant, il est à noter que cette incapacité pourrait aussi être due au fait que ERK1 ne soit pas exprimée. Enfin, l'activité ERK peut aussi être indépendante des branches RTK-FGF/RAS-RAF-MEK1/2 et PI3K-AKT notamment lors de la prolifération stimulée par IGF-1 au sein des cellules HepG2 (Cuevas et al., 2007). En effet, la déplétion de l'expression du récepteur à l'insuline IRS-4 diminue la phosphorylation et donc l'activité de ERK et ces effets sont médiés par l'εPKC agissant sur ERK après stimulation par l'IRS-4 (Cuevas et al., 2007).

#### **IV.B Voie non canonique de la PI3K**

La branche PI3K-AKT est impliquée dans les processus de métabolisme cellulaire, de croissance cellulaire, de résistance à l'apoptose, de trafic vésiculaire, d'invasion et de migration cellulaire (pour revues (Engelman et al., 2006; Shaw and Cantley, 2006; Vivanco and Sawyers, 2002). La famille PI3K est divisée en trois classes de protéines, classes I, II et III, qui divergent selon la structure, la distribution d'expression dans les tissus, le mécanisme d'activation et la fonction des protéines (**Figure 8** - Cantley, 2002; Deane and Fruman, 2004; Wymann et al., 2003). En embryon, la branche PI3K est active puisque les sous unités p85 et p110 de la protéine PI3K sont exprimées durant les stades pré-implantatoires et l'activité de la branche est observée par la phosphorylation de la protéine AKT (Riley et al., 2005).

#### **V Interconnexion des branches RAS-RAF-MEK-ERK et RAS-PI3K-AKT-mTOR**

Les branches RAS-RAF-MEK-ERK et RAS-PI3K-AKT-mTOR sont interconnectées et la communication entre ces branches s'établit dans les deux sens : de la branche MEK-ERK vers la branche PI3K-AKT ou en sens inverse de la branche PI3K-AKT vers la branche MEK-ERK. Les communications entre ces deux branches sont de différents types (pour revues Aksamitiene et al., 2012; Mendoza et al., 2011): soit activatrices soit inhibitrices.



**Figure 32 : Communications de la voie MEK-ERK vers la voie PI3K-AKT et inversement de la PI3K-AKT vers MEK-ERK**

(Issue de Mendoza et al 2011)

Les voies PI3K-AKT et MEK-ERK communiquent entre elles pour se réguler négativement (rouge) notamment au niveau de la régulation de la forme active phosphorylée de ERK sur GAB ou de la forme active phosphorylée d'AKT sur RAF; ou positivement (vert) notamment de la protéine RAS active vers la protéine PI3K lors de son interaction avec GAB ou du complexe actif ERK sur différents effecteurs de la voie PI3K tels que les protéines du complexe mTORC1. Les régulations positives des protéines substrats sont indiquées par des flèches alors que les régulations négatives sont indiquées par des lignes à bout franc ( —| )

### **V.A De la branche MEK-ERK vers la branche PI3K-AKT**

Il existe environ 2000 protéines interactives dans la signalisation RTK impliquant les protéines MAPK dont 284 font partie du complexe ERK1 endogène (Bandyopadhyay et al., 2010).

La protéine ERK active peut contrôler l'activité de la branche PI3K-AKT par différents moyens. Le premier moyen passe par la modulation par ERK du niveau de phosphorylation des résidus sérine et thréonine de la protéine GAB (**Figure 32**). Ces résidus phosphorylés de GAB sont adjacents aux résidus des sites de fixation de la sous unité p85 de PI3K (**Figure 32** - Lehr et al., 2004). Ainsi, suivant le signal d'induction, les niveaux d'expression du complexe GAB/p85 PI3K sont soit augmentés soit diminués (Kiyatkin et al., 2006; Yu et al., 2001, 2002).

A l'inverse de la boucle de rétro-contrôle négatif entre PI3K et GAB, une boucle de rétro-contrôle positif est induite entre RAS-GTP et PI3K (Jimenez et al., 2002; Vivanco and Sawyers, 2002). L'inhibition des protéines MEK entraîne une stimulation du signal induit par l'EGF et par conséquent une augmentation de l'activation d'AKT (Hoeflich et al., 2009). Cette activation serait due à l'inhibition du recrutement de la PI3K, médié par la protéine GAB1 qui serait elle-même phosphorylée par ERK (**Figure 32** - Mendoza et al., 2011). Enfin, il a été constaté que la protéine RAS interagit avec la sous unité p110 de la PI3K, ce qui active, par augmentation de son activité lipide kinase, la PI3K (**Figure 32** - Kodaki et al., 1994; Rodriguez-Viciano et al., 1994). Ainsi, il existe une communication de la branche MeK-ERK vers la branche PI3K-AKT afin de moduler l'activité qui en découle.

### **V.B De la branche PI3K-AKT vers la branche MEK-ERK**

Au sein de la branche PI3K-AKT environ 802 protéines interactives sont recensées (Pilot-Storck et al., 2010). L'inhibition de la PI3K résulte en une répression des protéines ERK1/2 montrant le rôle de PI3K dans l'activation de la voie MEK-ERK (Wandzioch et al., 2004; Yart et al., 2001). La communication issue de l'activation de la PI3K médiée par GAB1, entraînant l'activation des MAPK, est une communication positive mais il existe aussi des communications négatives telles que celle régie par AKT et ses effecteurs en aval tels que les protéines TSC1 et TSC2 ou le complexe mTORC1 (**Figure 32**).

En effet, la protéine AKT peut réguler négativement la branche MEK-ERK, en particulier en prenant pour cible, *via* RAF, la protéine ERK, protéine qu'elle phosphoryle sur des sites de liaison à la protéine RAF en N-terminal (**Figure 32** - Cheung et al., 2008; Guan et al., 2000; Zimmermann and Moelling, 1999 pour revue Dhillon and Kolch, 2002). De manière intéressante, l'activation des protéines ERK au niveau transcriptionnel peut être positive et médiée par AKT (Junttila et al., 2008; Wang et al., 2010). Enfin, AKT régule négativement d'autres protéines de la signalisation RTK telles que les protéines p38 MAPK, une classe de protéines MAPK répondant aux stimuli de stress et facteurs



environnementaux, et la protéine GSK3 via la régulation de protéine phosphatases de la voie. Ces phosphatases une fois inhibées ne peuvent plus remplir leur rôle de régulateur négatif de ERK ce qui prolonge la durée d'expression de celui-ci (Aksamitiene et al., 2010; Vivanco and Sawyers, 2002).

En conclusion, l'ensemble de ces données montrent de manière générale que PI3K régule positivement la branche RAS/MEK-ERK et augmente l'activité ERK alors que l'activation d'ERK régule négativement la branche PI3K-AKT. Le contexte de la communication entre ces branches est primordial et la stimulation par les facteurs de croissance est caractéristique de la primauté de l'une des branches sur l'autre.



---

*RESULTATS EXPERIMENTAUX*

---



## Projets de thèse

---

---

Au sein de notre équipe, nous étudions les mécanismes génétiques qui régissent l'acquisition et la régulation de l'identité cellulaire, entre cellules Epi et EPr principalement, lors de l'embryogenèse murine. L'étude des processus de différenciation cellulaire de ces lignages et des mécanismes génétiques qui les régulent, permet de mieux comprendre comment des dérégulations peuvent intervenir et provoquer, par exemple, des processus tumoraux. Au long terme, des stratégies thérapeutiques, basées sur ces observations, pourront être mises en place. Pour l'étude de ces mécanismes, nous utilisons au laboratoire des modèles *in vivo* d'embryon murin ou *in vitro*, en culture, de ces embryons et de cellules souches embryonnaires (ES) murines pour analyser les étapes de la différenciation cellulaire. Dans ce contexte, mon doctorat a porté sur l'étude de cette organisation spatiale et temporelle de réseaux de régulations géniques, permettant l'acquisition de l'identité cellulaire et le déroulement de processus morphogénétiques.

Mes travaux se déclinent en deux parties :

- a) une partie principale portant sur l'étude de la coopération entre le facteur de transcription GATA6 et la voie de signalisation RTK-FGF (branches MEK-ERK et PI3K-AKT) au cours de la différenciation de l'EPr (**Projet 1**).
  
- b) une seconde partie abordant la maturation de l'EPr et la formation de ses dérivés *via* l'étude du(es) rôle(s) de deux autres facteurs que sont *Dickkopf* (DKK1) et *Noggin*. Ainsi pour cette seconde partie, j'introduirai, pour plus de clarté, le contexte bibliographique avant de détailler les résultats obtenus lors de cette étude (**Projet 2**).



---

*Projet 1 : Etude de la coopération entre la voie de signalisation RTK-FGF et le facteur de transcription GATA6 au cours de la différenciation de l'EPr.*

---



---

## Objectifs – Projet 1

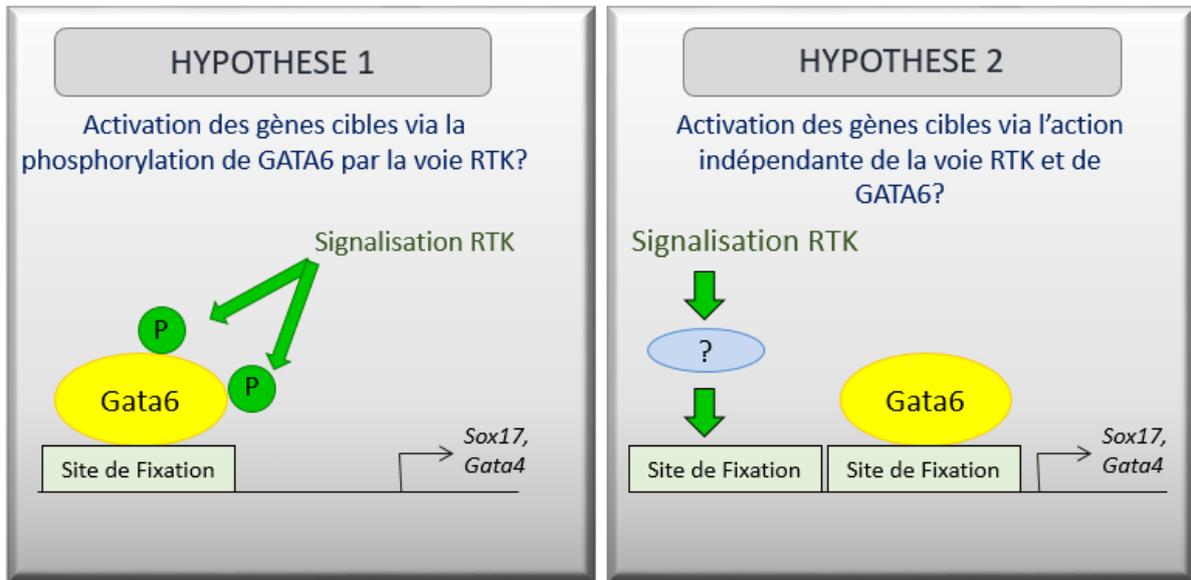
---

Les embryons mutants pour *Nanog* et mutants pour *Gata6* montrent que l'activation des gènes cibles lors de la différenciation et maturation de l'EPr requiert à la fois GATA6 et la signalisation RTK-FGF (Bessonard et al., 2014; Frankenberg et al., 2011; Schrode et al., 2014).

Il a été montré dans des cellules de carcinome du colon CaCo2 que GATA6 peut être phosphorylée par les kinases MEK/ERK nécessaire à son activation (Adachi et al., 2008). J'ai donc deux hypothèses : soit la phosphorylation directe de GATA6 par la signalisation RTK-FGF active les gènes cibles comme *Sox17* et *Gata4*, soit l'activation des gènes cibles de GATA6 requiert à la fois GATA6 non phosphorylée, et la signalisation RTK, simultanément en parallèle. Dans ce cas la voie RTK-FGF activerait d'autres facteurs de transcription.

Puisque la surexpression de GATA6 dans les cellules ES permet leur trans-différenciation en endoderme extraembryonnaire (Cho et al., 2012; Fujikura, 2002; Koutsourakis et al., 1999; Morrisey et al., 1998; Niakan et al., 2013; Niwa et al., 2000; Shimosato et al., 2007), j'ai donc utilisé ces cellules comme outil expérimental.

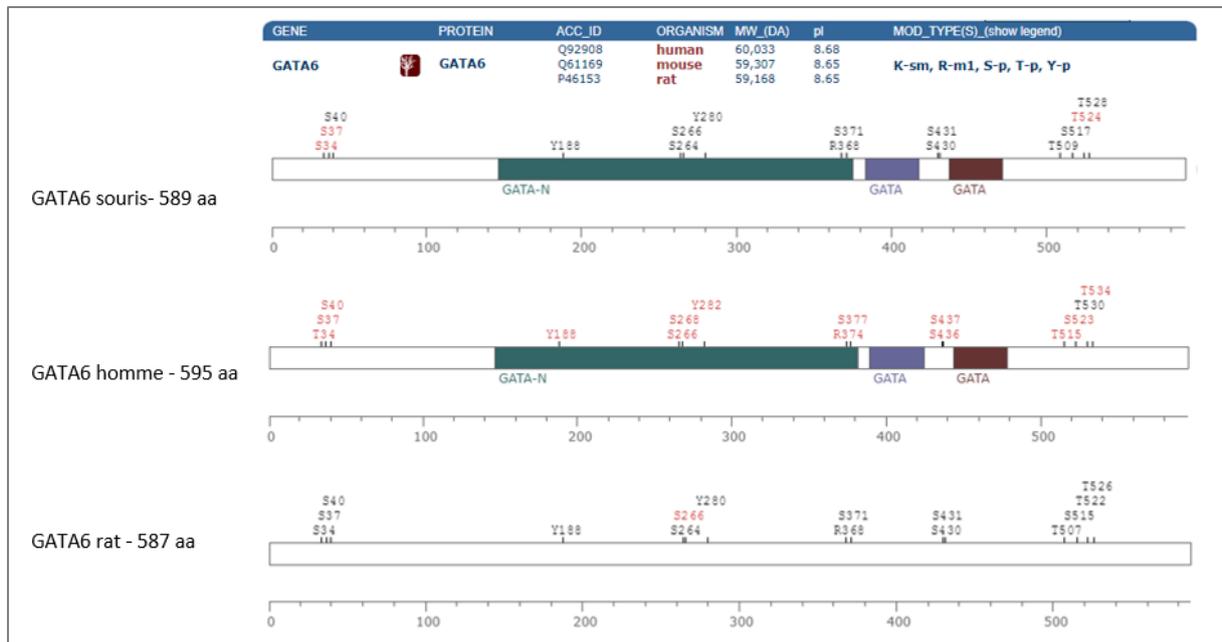
J'ai utilisé un modèle de cellules souches embryonnaire soit sauvages (ES WT) soit déplétées en GATA6 (ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, Morrisey et al., 1998) dans lesquelles j'ai surexprimé différentes formes de GATA6, sauvages ou mutantes. Ces cultures ont été réalisées en absence et en présence d'inhibiteurs de la signalisation RTK-FGF notamment pour les branches MEK-ERK et PI3K-AKT. Dans ces différentes conditions, j'ai analysé l'expression au niveau protéique de cibles induites par GATA6 telles que SOX17 et GATA4, *via* des expériences d'immunofluorescence et au niveau ARNm, par RT-qPCR, d'autres marqueurs clés du lignage EPr.



### Figure 33 : Hypothèses de travail

*Hypothèse 1:* L'activation des gènes cibles *Sox17* et *Gata4* se fait *via* la phosphorylation de GATA6 par la voie RTK-FGF (branche MEK-ERK et PI3K-AKT).

*Hypothèse 2:* L'activation des gènes cibles *Sox17* et *Gata4* se fait avec l'action indépendante de la voie RTK-FGF (branches MEK-ERK et PI3K-AKT) et de GATA6.



### Figure 34 : Représentation schématique des séquences protéiques des isoformes longues des protéines GATA6

Les formes des espèces Souris (589 acides aminés), Homme (595 acides aminés) et Rat (587 acides aminés) sont représentées. Cette représentation est issue du site internet <http://www.phosphosite.org>. Les modifications connues sur les résidus pour ces protéines sont indiquées dans la colonne MOD\_TYPE(S) par les abréviations suivantes: Sm: sumoylation, m1: méthylation, p: phosphorylation. Les sites notés en rouge correspondent aux sites pour lesquels les modifications ont été prouvées expérimentalement. Les deux doigts de zinc de GATA6 sont indiqués en violet et rouge foncé et le domaine d'activation transcriptionnelle est indiqué en vert foncé.

---

## Résultats – Projet 1

---

### I Etude *in silico* de la phosphorylation de GATA6 par la signalisation RTK-FGF

L'analyse de la coopération entre la signalisation RTK-FGF et la protéine GATA6 pour la différenciation des cellules d'EPr repose sur deux hypothèses de travail. La première hypothèse serait que l'activation des gènes cibles de la différenciation des cellules en EPr, *Sox17* et *Gata4*, se fait *via* la phosphorylation de GATA6 par la signalisation RTK-FGF (**Figure 33**). La seconde hypothèse est que l'activation de ces gènes cibles se fait *via* la voie RTK-FGF et GATA6 de manière parallèle (**Figure 33**).

Les travaux réalisés, par *Adachi et al*, montrent que la phosphorylation de GATA6 sur la sérine 120 sur la forme courte de GATA6 (=S264 pour la forme longue de GATA6 souris) par la branche MEK/ERK de la signalisation RTK, est requise (*Adachi et al.*, 2008). Ces travaux ont été réalisés en cellules CaCo2 humaines ce qui diffère de notre contexte expérimental en cellules murines.

L'analyse *in silico* de la séquence protéique de GATA6, réalisée par G. GIRAUD au sein de l'équipe, met en évidence 3 autres sites potentiellement phosphorylables par des kinases de la signalisation RTK et notamment par l'effecteur principal p-ERK : les sérines en position 34 et 37 et la Thréonine en position 509 (**Figure 34, 35 et 36**). Ces 3 sites ont été déduits par la présence à leur position de la séquence consensus PX S/T P de p-ERK, kinase activée de la signalisation RTK-FGF/MEK-ERK, et par leur conservation au cours de l'évolution entre les espèces Homme, Rat et Souris (**Figure 35**). Ainsi, chez la souris, on trouve, pour la S34, la séquence PSSP ; pour la S37, la séquence PLSP et pour la T509, la séquence PMTP (**Figure 35**).

De ce fait, il a été décidé de réaliser des mutations de la protéine GATA6 sur ces résidus afin de discriminer nos deux hypothèses de travail. Ces constructions ont pour but de produire des protéines GATA6 dans lesquelles les résidus S34, S37, S264 et T509 ont été inactivés, seuls ou combinés, pour empêcher leur phosphorylation, par mutation en Alanine (A) ou par mutation en Acide Aspartique (D) pour la sérine 264, mimant, en théorie, la phosphorylation du résidu (**Figure 36**).

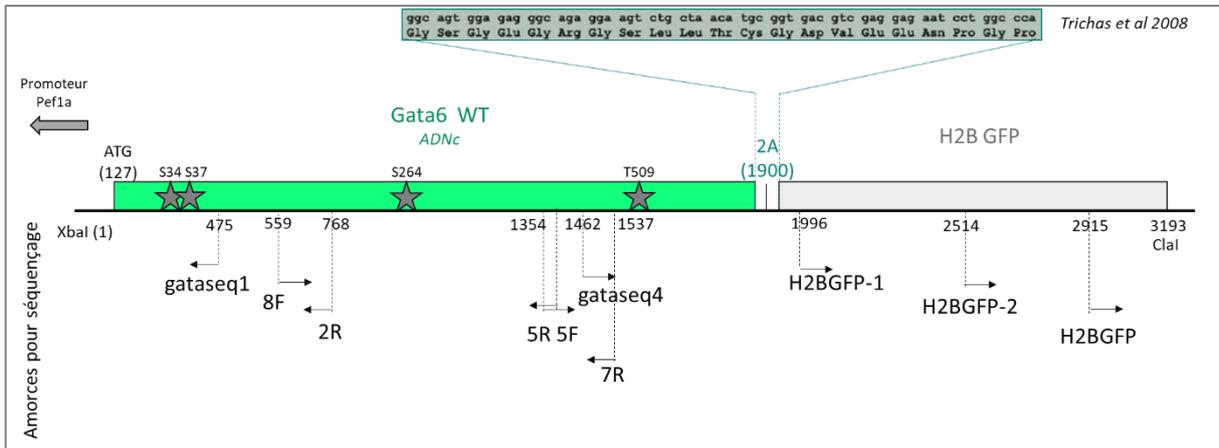
Nous avons choisi un vecteur d'expression pCAGG, en remplaçant le promoteur par celui d'un *Pef1a* (Clontech) qui présente une expression modérée et ubiquitaire et qui va contrôler l'expression de l'ADNc *Gata6* (**Figure 37**). Une construction 2A-H2B-GFP (« Histone 2B – Green Fluorescent Protein ») a été ajoutée en aval de l'ADNc de *Gata6*. Le peptide 2A constitue une alternative à l'utilisation d'une IRES (*Trichas et al.*, 2008). En effet, les courtes séquences 2A, dont la séquence consensus est *Asp-Val/Ile-Glu\_X-Asn-Pro-Gly-Pro* (**Figure 36**), empêche la formation d'un pont peptidique normal entre la Glycine et la dernière Proline ce qui engendre un saut de lecture du ribosome et conduit ainsi au clivage du peptide néoformé en produisant donc deux protéines

rat		human ▶ Hide Isoforms		GATA6 iso2		mouse	
S34	FPAREPSSPLSPISS	T34-p	FPAREPStPPsPIsS	-	gap	S34-p	FPAREPSSPLsPISS
S37	REPSSPLSPISSSSS	S37-p	REPStPPsPIsSSSS	-	gap	S37-p	REPSsPLsPISSSSSS
S40	SSPLSPISSSSSSCS	S40-p	StPPsPIsSSSSSSCS	-	gap	S40	SsPLsPISSSSSSSCS
Y188	AAASSPVYVPTTRVG	Y188-p	AAASSPVyVPTTRVG	Y42	AAASSPVYVPTTRVG	Y188	AAASSPVYVPTTRVG
S264	ASARFPYSPsPPMAN	S266-p	VSARFPYsPsPPMAN	S120	VSARFPYSPsPPMAN	S264	ASARFPYSPsPPMAN
S266-p	ARFPYSPsPPMANGA	S268-p	ARFPYsPsPPMANGA	S122	ARFPYSPsPPMANGA	S266	ARFPYSPsPPMANGA
Y280	AARDPGGYVAAGGAG	Y282-p	AAREPGGYAAAGSGG	Y136	AAREPGGYAAAGSGG	Y280	AARDPGGYVAAGGTG
R368	GAPLPVPRGPsADLL	R374-m1	GAPLPVPrGPsADLL	R228	GAPLPVPRGPsADLL	R368	GAPLPVPRGPsADLL
S371	LPVPRGPsADLLEDL	S377-p	LPVPrGPsADLLEDL	S231	LPVPRGPsADLLEDL	S371	LPVPRGPsADLLEDL
S430	KPQKRVPSRRRLGLS	S436-p	KPQKRVPSRRRLGLS	S290-p	KPQKRVPSRRRLGLS	S430	KPQKRVPSRRRLGLS
S431	PQKRVPSRRRLGLSC	S437-p	PQKRVPSRRRLGLSC	S291	PQKRVPSRRRLGLSC	S431	PQKRVPSRRRLGLSC
T507	GNSSVPMTPtSSSSN	T515-p	SNNSIPMtPTStSSN	T369	SNNSIPMTPTStSSN	T509	SSGSVPMTPtSSSSN
S515	PTSSSSNSDDCTKNT	S523-p	PTStSSNsDDCSKNT	S377	PTStSSNSDDCSKNT	S517	PTSSSSNSDDCTKnt
T522	SDDCTKNTSPtTQST	T530	sDDCSKNTSPtTQPT	T384	SDDCSKNTSPtTQPT	T524-p	SDDCTKNTSPtTQAT
T526	TKNTSPtTQSTASGV	T534-p	SKNTSPtTQPTASGA	T388	SKNTSPtTQPTASGA	T528	TKntSPtTQATtSGV

**Figure 35 : Alignement des principaux résidus protéiques des isoformes de GATA6 inter-espèces**

L'isoforme longue de GATA6 chez la Souris, des formes courtes et longues des protéines GATA6 chez l'Homme, de la forme longue de GATA6 chez le Rat ont été alignées.

Cet alignement est issu du site internet <http://www.phosphosite.org>.



**Figure 36 : Représentation détaillée de la construction plasmidique Pef1a *Gata6* WT**

La séquence ADNc pleine taille de *Gata6* chez la souris est sous le contrôle du promoteur *Pef1a*, au sein de la construction plasmidique Pef1a 2A-H2B-GFP. Les séquences 2A (Trichas et al 2008) et H2B-GFP ont aussi été indiquées. Les 4 sites potentiels de phosphorylation par MEK/ERK ont été indiqués par des étoiles grises. Les amorces pour le séquençage ont été positionnées et orientées en fonction de leur origine sous la construction schématisée. Elles sont décrites en partie « Matériels et Méthodes ».

indépendantes mais issues du même ARN. Par conséquent, la quantité de protéines produites, à partir d'un même ARN, est la même. De plus, la région H2B-GFP permet la visualisation, au sein des noyaux, des cellules transfectées exprimant le plasmide (cellules GFP positives).

Certaines constructions telles que les constructions **Pef1a *Gata6* WT 2A H2B GFP (*Gata6* WT)**, **Pef1a *Gata6* 3mut 2A H2B GFP** contenant les mutations S34A S264A et T509A (***Gata6* 3mut**), **Pef1a *Gata6* S264A 2A H2B GFP (*Gata6* S264A)** et **Pef1a *Gata6* S264D 2A H2B GFP (*Gata6* S264D)** avaient déjà été réalisées avant mon arrivée au laboratoire par G. GIRAUD (**Figure 38**). Ainsi, j'ai repris les expériences de mutagenèse et de clonage afin de produire les constructions suivantes : **Pef1a *Gata6* 4mut 2A H2B GFP** contenant les mutations S34A, S37A, S264A et T509A (***Gata6* 4mut**), **Pef1a *Gata6* S34A 2A H2B GFP (*Gata6* S34A)**, **Pef1a *Gata6* S37A 2A H2B GFP (*Gata6* S37A)** et **Pef1a *Gata6* T509A 2A H2B GFP (*Gata6* T509A)** (**Figure 38**). Les primers et les conditions de mutagenèse utilisés ont été décrits dans la partie « matériels et méthodes ».

Ces différentes constructions plasmidiques représentant différents états de GATA6 ont été testées par surexpression dans les cellules souches embryonnaires ES *via* transfection des formes de *Gata6*. J'ai utilisé deux types de cellules souches embryonnaires : des cellules souches sauvages ES WT et des cellules souches ES *Gata6*<sup>-/-</sup> qui présentent une déplétion au niveau des séquences des doigts de zinc de *Gata6* (**Figure 39A et 39B** - Morrisey et al., 1998). La stratégie expérimentale adoptée ensuite est illustrée dans la **Figure 40**.

Différents temps expérimentaux ont été testés : 12h, 24h, 32h et 48h (**Figure 40**). J'ai observé par immunofluorescence l'expression de marqueurs clés exprimés dans le lignage EPr : SOX17 et GATA4. En embryon, il a été observé que l'activation de ces gènes requiert à la fois la voie RTK-FGF/MEK-ERK et GATA6 (Bessonard et al., 2014; Frankenberg et al., 2011; Schrode et al., 2014). La majorité du temps toutes les transfections des différentes formes mutantes de *Gata6* ont été réalisées en parallèle.

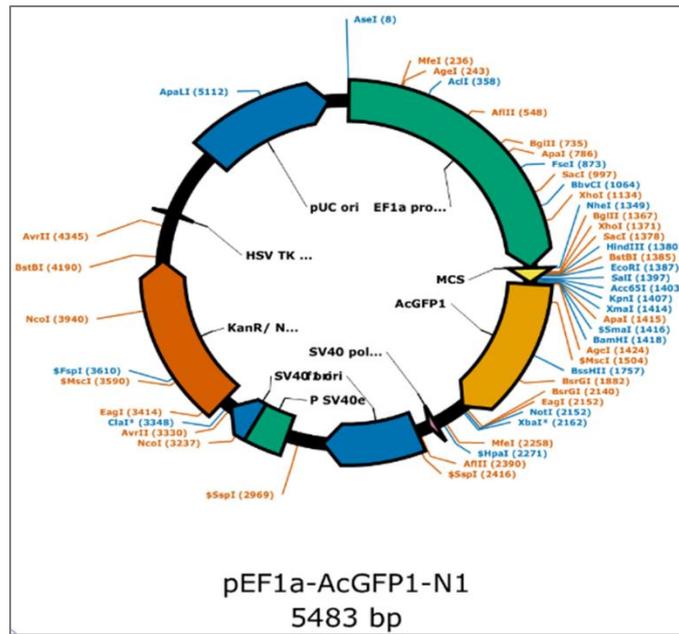


Figure 37 : Carte de pEF1 $\alpha$ -AcGFP1-N1 (Clontech).



Figure 38 : Représentation schématique des séquences mutantes de *Gata6*.

Les 4 sites potentiels de phosphorylation ont été mutés soit en Alanine (A) : 3mut (=S34A, S264A, T509A), 4mut (=S34A, S37A, S264A, T509A), S264A, S34A, S37A, T509A soit en Acide Aspartique (D): S264D. Le plasmide *Pef1a* vide ne contient pas l'ADNc de *Gata6* mais seulement la séquence 2A-H2B-GFP.

## II Surexpression des formes mutantes de *Gata6* dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>

Aucune expression de SOX17 et de GATA4 n'a été observée après 12h de surexpression de *Gata6* quelle que soit la forme transfectée. L'expression de SOX17 est observée à partir de 24h et celle de GATA4 à partir de 48h.

### II.A Expression de SOX17 en 24h en condition contrôle

#### II.A.1 Surexpression de la forme *Gata6* WT

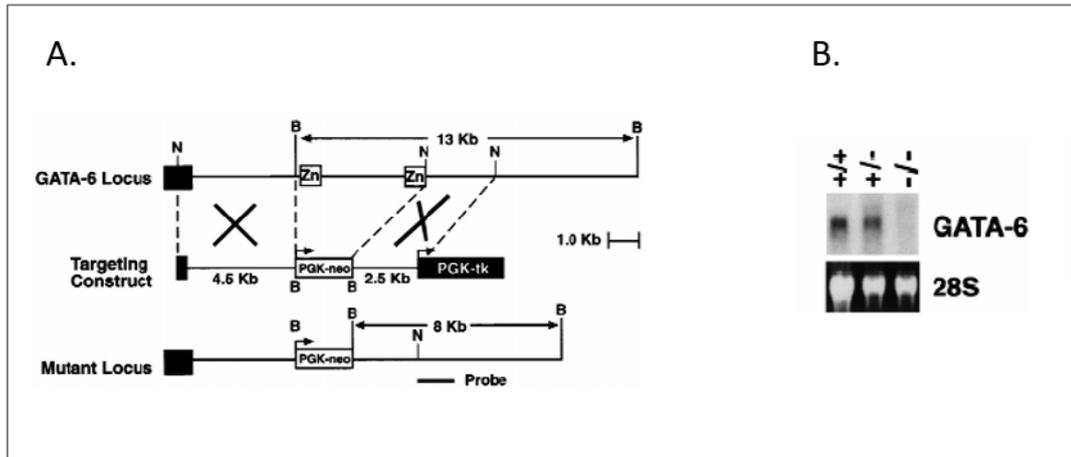
En 24h, la surexpression de la forme *Gata6* WT induit l'expression de SOX17 dans environ 60% des cellules de la population GFP positive (« GFP+ » - **Figure 41A, 41B et 41C**).

#### II.A.2 Surexpression de la forme *Gata6* S264A

La surexpression de la forme *Gata6* S264A est capable d'induire l'expression de SOX17 dans environ 40% des cellules de la population GFP+ ce qui n'est significativement pas différent du pourcentage de cellules exprimant SOX17 après surexpression de la forme *Gata6* WT (**Figure 41A**). De ce fait, on peut en conclure que le site S264 lorsqu'il est inactif diminue l'expression de SOX17, de manière non significative, indiquant que ce site n'est pas essentiel pour l'activité de GATA6 contrairement à l'observation faite par *Adachi et al* dans les cellules CaCo2 (Adachi et al., 2008). De même, la surexpression de la forme *Gata6* S264D induit l'expression de SOX17 dans un peu moins de 40% des cellules de la population GFP+ (**Figure 41A**), mimant le résultat obtenu avec la forme *Gata6* S264A (**Figure 41A**). Cela montre que la mutation S264D n'est pas activatrice et suggère que le site S264 n'est pas ou peu impliqué ou serait en association avec d'autres résidus pour l'expression de ce gène cible.

#### II.A.3 Surexpression de la forme *Gata6* 4mut

La surexpression de la forme *Gata6* 4mut entraîne une baisse significative d'environ la moitié du pourcentage de cellules exprimant SOX17 dans la population de cellules GFP+ comparé au pourcentage obtenu avec *Gata6* WT (**Figure 41B**). Cela suggère qu'un ou plusieurs résidus sont importants pour la fonctionnalité de GATA6 lors de l'induction de gènes cibles tels que *Sox17*. De plus, la diminution d'expression de SOX17 n'atteint pas une valeur proche du zéro ce qui signifie que GATA6 est capable d'induire un niveau « basal » de SOX17 malgré les mutations présentes.



**Figure 39 : Représentation schématique de l'interruption du gène *Gata6***

(Issue de Morrissey et al 1998)

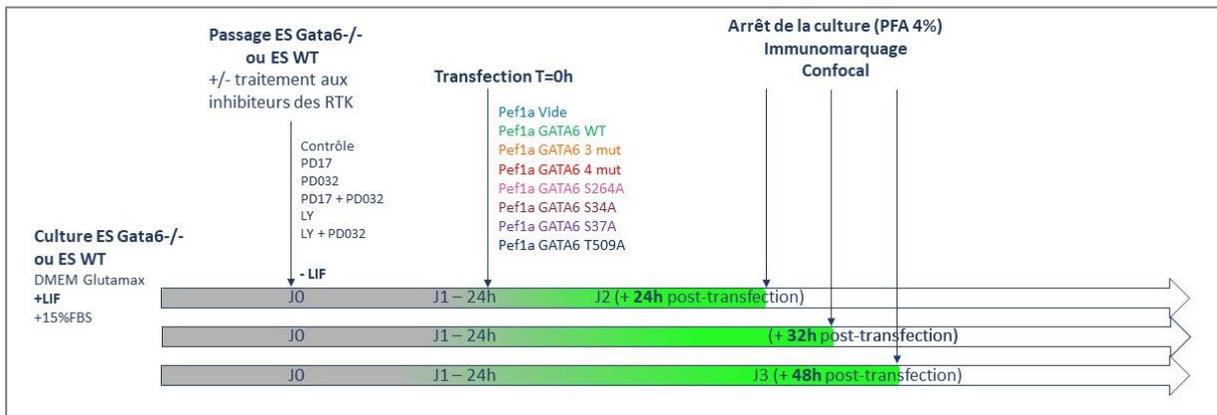
A. Représentation schématique de l'interruption du gène *Gata6* par insertion d'une cassette PGK néomycine.

(Haut) Représentation du gène sauvage de *Gata6* et carte de la position des enzymes de restriction utilisées, pour Southern Blot: Not1 (Not), NcoI (Nco), BamH1 (B).

(Milieu) Représentation du plasmide utilisé pour l'insertion par digestion et recombinaison homologue

(Bas) Représentation du gène muté de *Gata6*.

B. Analyse par Northern blot de l'expression des gènes sauvage (+/+), hétérozygote (+/-) et homozygote mutant (-/-) en cellules ES.



**Figure 40 : Représentation de la stratégie expérimentale adoptée pour l'analyse de l'expression des marqueurs SOX17 et GATA4**

L'analyse s'effectue après immuno-marquages sur cellules souches embryonnaires ES mutantes ES *Gata6*<sup>-/-</sup> ou ES WT.

#### II.A.4 Surexpression de la forme *Gata6* 3mut

En 24h, la forme *Gata6* 3mut comprend les 3 mutations S34A, S264A et T509A. A l'origine de mes expériences, cette forme avait été référencée, par erreur de séquençage, comme la forme *Gata6* 4mut présentant les 4 mutations S34A, S37A, S264A et T509A. J'ai donc débuté les expériences avec la forme *Gata6* 3mut ce qui explique le nombre plus important d'expériences avec cette forme qu'avec la forme *Gata6* 4mut.

La forme *Gata6* 3mut entraîne l'expression de SOX17 dans environ 40% des cellules de la population GFP+, comme le résultat obtenu avec la forme *Gata6* S264A, ce qui est significativement plus faible par rapport au pourcentage de cellules exprimant SOX17 observé après surexpression de la forme *Gata6* WT (Figure 41C). Ainsi, ces résultats suggèrent que le résidu S37 pourrait être responsable de la fonctionnalité de GATA6 lors de l'induction de gènes cibles tels que *Sox17*.

#### II.A.5 Conclusion préliminaire

Ces résultats mettent en évidence tout d'abord que, quelles que soient les conditions d'inactivation de *Gata6* par mutation, l'expression de SOX17 est induite, à un niveau « basal ». Ainsi, GATA6 indépendamment des résidus étudiés est capable d'induire l'expression de SOX17. De plus, ces résultats suggèrent que le résidu S37 serait potentiellement responsable de la fonctionnalité de GATA6 pour l'induction forte de gènes cibles tels que *Sox17*.

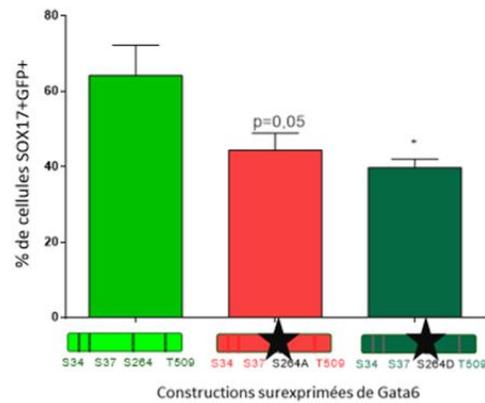
### II.B Expression de SOX17, en 24h, en absence ou présence d'inhibiteurs de la voie RTK-FGF/MEK-ERK ou RTK-FGF/PI3K-AKT

#### II.B.1 Activation de la signalisation RTK-FGF/MEK-ERK dans les cellules ES

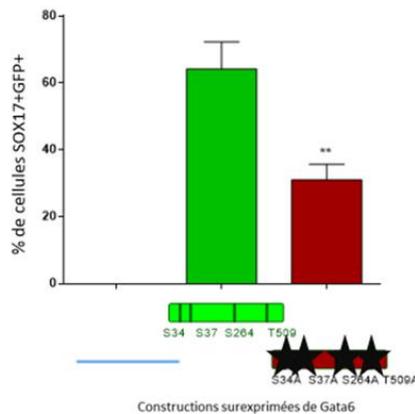
J'ai ensuite procédé à des expériences associant surexpression des différentes formes de *Gata6* et différentes inhibitions de la voie RTK-FGF afin d'étudier le lien direct ou indirect entre GATA6 et les branches MEK-ERK et/ou PI3K-AKT de la voie RTK-FGF.

La même stratégie expérimentale a été réalisée (Figure 40). J'ai utilisé différents types de traitements. L'inhibiteur PD173074 (PD17) a été utilisé à la concentration de 100nM pour inhiber les récepteurs FGFR1, FGFR2 et FGFR3 (Nichols et al., 2009; Yamanaka et al., 2010). L'inhibiteur PD0325901 (PD032) a été utilisé à la concentration de 500nM pour inhiber les protéines MEK1/2. L'inhibiteur LY290025 (LY) a été utilisé à 1µM pour inhiber la PI3K. Deux combinaisons de ces inhibiteurs ont aussi été faites. La première combinaison correspond aux inhibiteurs contre PD17 + PD032 ensemble (FGFR + MEK1/2), puisque, historiquement, l'inhibition de l'induction de la différenciation de l'EPr, se fait *via* ces deux inhibiteurs. Enfin, une seconde combinaison des inhibiteurs

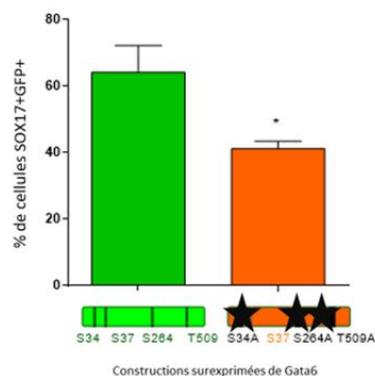
**A.** Expression de SOX17 au sein des cellules transfectées GFP+ en 24h



**B.** Expression de SOX17 au sein des cellules transfectées GFP+ en 24h



**C.** Expression de SOX17 au sein des cellules transfectées GFP+ en 24h



**Figure 41 : Expression protéique de SOX17 après 24h de surexpression des formes de *Gata6* en condition contrôle**

Pourcentage de cellules exprimant SOX17 parmi la population de cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> transfectées GFP+ après 24h de surexpression de *Gata6* WT (n=5) et de la forme:

- A. *Gata6* S264A ou *Gata6* S264D. Deux expériences ont été réalisées (n=2).
- B. *Gata6* 4mut présentant les mutations S34A, S37A, S264A et T509A. Trois expériences ont été réalisées (n=3).
- C. *Gata6* 3mut présentant les mutations S34A, S264A et T509A. Quatre expériences ont été réalisées (n=4).

Les résultats ont été représentés suivant la moyenne ± SEM pour chaque condition. La significativité statistique des résultats a été testée par un T-Test et est indiquée sur les graphiques (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001).

LY + PD032 (MEK1/2 et PI3K) a été réalisée pour bloquer les deux effecteurs majeurs de la signalisation RTK-FGF.

Ainsi, j'ai testé ces différents traitements sur cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> transfectées avec le plasmide *Pef1a vide* et en surexprimant la forme *Gata6 WT*.

J'ai observé en premier lieu, l'expression de la forme active de la protéine ERK, p-ERK, après 24h, afin de constater l'inhibition de la branche MEK-ERK après traitement avec chaque inhibiteur. En condition contrôle sans traitement aux inhibiteurs, on observe une expression essentiellement cytoplasmique de p-ERK dans toutes les cellules, transfectées ou non transfectées avec le plasmide *Pef1a vide* (**Figure 42A**). De manière logique, ces cellules transfectées avec le plasmide *Pef1a vide* n'expriment pas *Gata6* et donc aucune expression de *SOX17* n'est observée. Lorsque la combinaison d'inhibiteurs PD17+PD032 est appliquée dans les cellules, on observe, en 24h, une disparition complète du signal p-ERK, montrant que la branche RTK-FGF/MEK-ERK est inhibée. De ce fait, l'inhibition seule PD032 phénocopie ce résultat. Cependant, on observe que l'inhibition par PD17 seul diminue l'expression de p-ERK mais ne supprime pas totalement le signal observé. Cela suggère que le p-ERK peut être induit par un récepteur autre que les FGFR1, 2 et 3. De plus, l'expression de p-ERK n'est pas inhibée suite à l'inhibition LY, comme attendu. Enfin, l'utilisation des inhibiteurs combinés LY+PD032 entraîne une répression de l'expression de p-ERK, confirmant le rôle de la branche MEK-ERK dans l'activation de la protéine ERK en p-ERK.

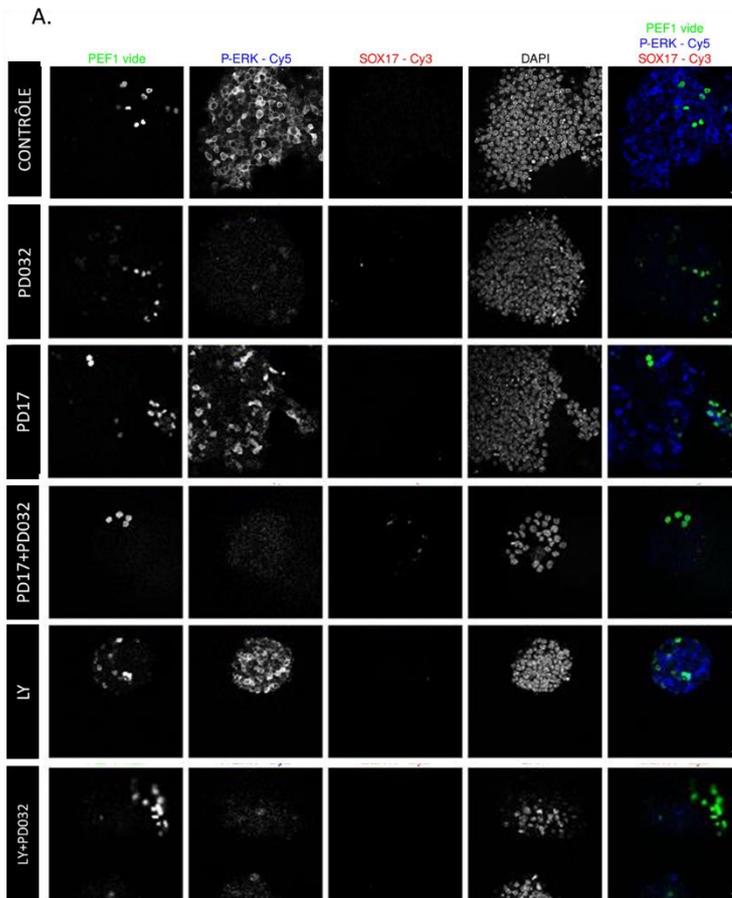
Les mêmes résultats ont été obtenus en surexprimant la forme *Gata6 WT* (**Figure 42B**). L'expression de p-ERK ne varie pas en fonction de l'expression de *Gata6* (condition contrôle – **Figure 42B**).

En second lieu, je me suis intéressée à la branche PI3K-AKT en observant la forme active de la protéine AKT, p-AKT, après 24h, afin de constater l'inhibition de la branche PI3K après traitement avec l'inhibiteur LY notamment. Cependant, au sein du laboratoire, plusieurs tests ont été effectués sur embryons, sur explants et pour ma part dans les cellules ES mais l'anticorps que nous avons ne donne aucun résultat. Un bruit de fond est observé et celui-ci n'est pas réprimé en traitant avec l'inhibiteur dirigé contre la PI3K suggérant que le signal observé n'est pas spécifique.

## **II.B.2 La voie RTK coopère avec GATA6 pour l'induction de l'expression de SOX17.**

J'ai donc utilisé ces différents inhibiteurs afin de caractériser les acteurs de la signalisation RTK-FGF impliqués dans l'activation de *GATA6* en observant, au niveau protéique, l'expression des gènes cibles *Sox17*, en 24h, et *Gata4*, en 48h. La stratégie expérimentale utilisée a été illustrée en Figure 40 (**Figure 40**).

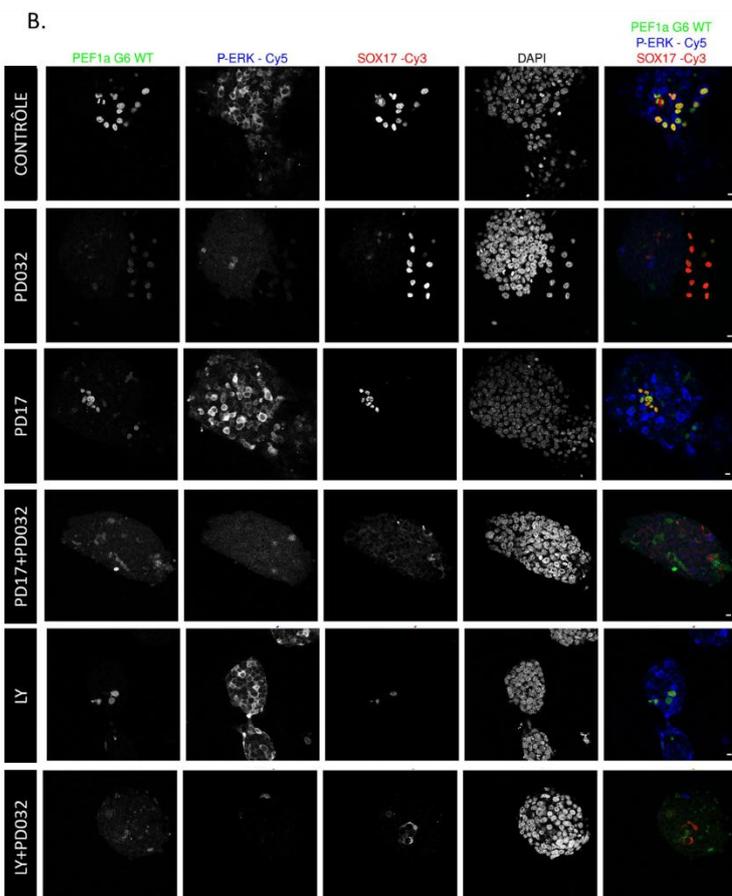
La surexpression de la forme *Gata6 WT* provoque une expression de *SOX17* dans 64,2% des cellules transfectées (**Figure 43A**). L'inhibition combinée de PD17 + PD032 montre une réduction



**Figure 42 : Activation de la voie RTK-FGF au sein des cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>**

A. Expression de p-ERK et SOX17 après 24h de surexpression de Pef1a vide en conditions contrôle ou traités avec les inhibiteurs de la signalisation RTK seuls ou combinés. Echelle: 10µm

B. Expression de p-ERK et SOX17 après 24h de surexpression de *Gata6* WT en conditions contrôle ou traités avec les inhibiteurs de la signalisation RTK seuls ou combinés. Echelle: 10µm



significative de cette expression d'environ 2/3 des cellules exprimant SOX17 parmi les cellules transfectées par rapport à la condition contrôle (**Figure 43A**). L'inhibition PD17 seul réduit significativement cette expression de moitié environ par rapport à la condition contrôle (**Figure 43A**). L'inhibition combinée de LY + PD032 entraîne une baisse significative du pourcentage de cellules exprimant SOX17 d'environ 2/3 par rapport à la condition contrôle (**Figure 43A**). En revanche, l'inhibition PD032 seul entraîne une diminution non significative du pourcentage de cellules SOX17+GFP+ comparée au pourcentage obtenu en condition contrôle (**Figure 43A**) et l'inhibition LY seul ne modifie pas le pourcentage de cellules SOX17+GFP+ par rapport au pourcentage obtenu en condition contrôle (**Figure 43A**).

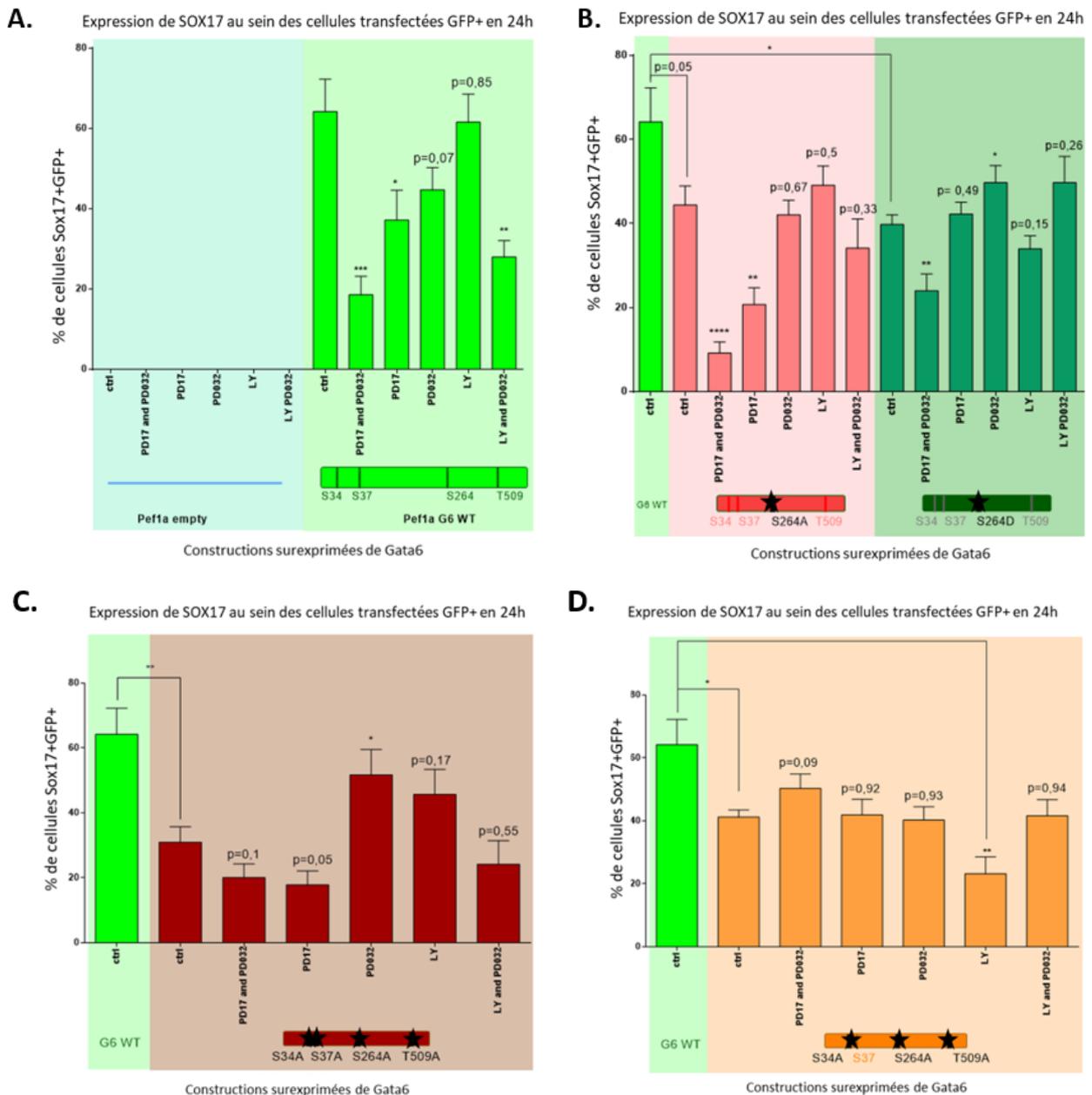
En conclusion, ces résultats montrent, quelles que soient les conditions d'inhibition de la voie RTK-FGF, que l'expression de SOX17 est induite, bien que réduite à un niveau bas dans certains cas. Ainsi, GATA6, indépendamment des résidus étudiés, est capable d'induire l'expression de SOX17, en absence de signal RTK. Enfin, les résultats suggèrent les deux branches en aval du récepteur, MEK-ERK et PI3K-AKT, se compensent. L'inhibition de la signalisation RTK-FGF provoque une réduction de l'expression de SOX17, montrant que la signalisation RTK-FGF augmente la capacité de GATA6 à induire du SOX17.

### **II.B.3 La sérine S264 n'est pas ou peu impliquée dans la relation GATA6/RTK-FGF**

Le même type d'expérience a été réalisé avec les formes *Gata6 S264A* et *Gata6 S264D* (**Figure 40**). J'ai pu constater que la forme inactive *Gata6 S264A* présente le même profil du pourcentage de cellules transfectées exprimant SOX17 comparé à celui de la forme sauvage *Gata6 WT* (**Figure 43A et 43B**) où l'expression de SOX17 est diminuée seulement en condition de double inhibition PD17 + PD032 et en condition d'inhibition PD17 seul (**Figure 43B**) suggérant que ce résidu n'est pas ou peu impliqué (**Figure 41A**).

Concernant la forme supposée constitutivement active *Gata6 S264D*, on observe que son expression en condition d'inhibition n'est significativement pas différente de celle obtenue en condition contrôle (**Figure 43B**). Seule, l'inhibition combinée de PD17 + PD032 montre une réduction significative du pourcentage de cellules exprimant SOX17 parmi les cellules transfectées (**Figure 43B**). Il est intéressant de noter que cette diminution est moindre que celle constatée dans la même condition avec *Gata6 WT* suggérant un léger effet protecteur de cette forme *Gata6 S264D*.

Ainsi, le résidu S264 ne semble pas être indispensable mais pourrait moduler l'interaction possible RTK-FGF/GATA6.



**Figure 43 : Expression protéique de SOX17 après 24h de surexpression des formes de *Gata6* en condition contrôle et traitée aux inhibiteurs de la voie RTK-FGF**

Pourcentage de cellules exprimant SOX17 parmi la population de cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> transfectées GFP+ et traitées avec des inhibiteurs de la signalisation RTK-FGF, après 24h de surexpression des formes:

- A. *Pef1a* vide (n=3) et *Gata6* WT (n=5).
- B. *Gata6* WT (n=5), *Gata6* S264A (n=2) et *Gata6* S264D (n=2).
- C. *Gata6* WT (n=5) et *Gata6* 4mut (n=3).
- D. *Gata6* WT (n=5) et *Gata6* 3mut (n=4).

Les résultats ont été représentés suivant la moyenne ± SEM pour chaque condition. La significativité statistique des résultats a été testée par un T-Test et est indiquée sur les graphiques (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001, \*\*\*\*P<0,0001).

#### **II.B.4 La forme *Gata6 4mut* mime l'inhibition totale des branches MEK-ERK et PI3K-AKT**

*Gata6 4mut* est associée une forte baisse de l'expression de SOX17 au sein des cellules transfectées GFP+ en condition contrôle (**Figure 43C**), baisse similaire à celle de la condition *Gata6 WT* PD17 + PD032 (**Figure 43A**). De plus, la même observation est faite en condition d'inhibition PD17 seule (**Figure 43C**). La double inhibition LY + PD032 diminue le pourcentage de cellules SOX17+GFP+ pour atteindre un niveau proche de celui obtenu en condition contrôle (**Figure 43C**). En revanche, les inhibitions PD032 seul ou LY seul montrent, respectivement, soit une augmentation significative du pourcentage de cellules exprimant SOX17 soit ne modifient pas ce dernier mais une tendance d'augmentation est constatée comparée à la condition sans inhibiteur (**Figure 41D**). Ainsi, la forme *Gata6 4mut* mime l'action des inhibiteurs. De plus, les branches MEK-ERK et PI3K-AKT sont importantes et se compensent. Enfin, les résidus étudiés sont importants mais la présence seule de GATA6, d'un récepteur actif et d'une de ces deux branches suffirait pour l'induction de SOX17.

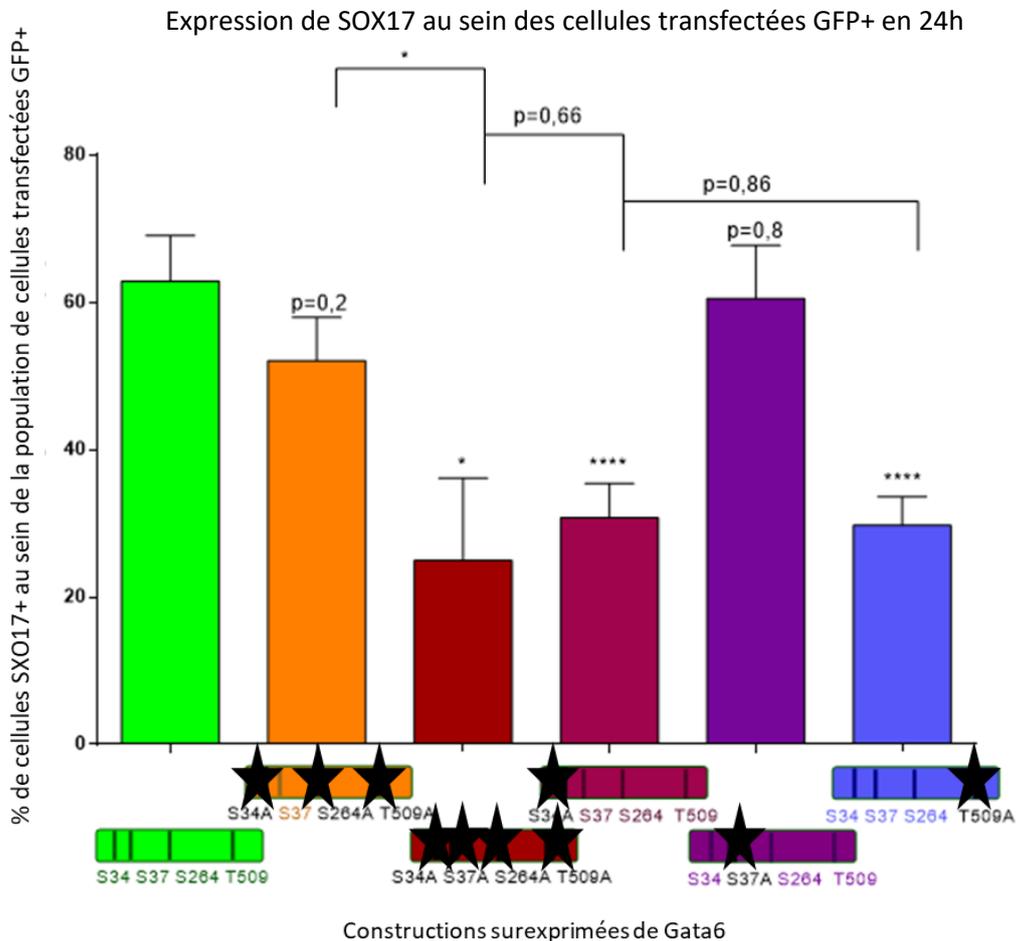
#### **II.B.5 La forme *Gata6 3mut* est sensible à la branche PI3K-AKT**

Après 24h de surexpression de la forme *Gata6 3mut*, une diminution significative est observée pour l'induction de SOX17 en condition contrôle comparée à la surexpression de la forme *Gata6 WT* (**Figure 43D et 41C**). Les inhibitions PD17 seul ou PD032 seul ou combinées soit PD17 + PD032 soit LY + PD032 ne présentent pas de différence d'induction de l'expression de SOX17 comparée à celle de *Gata6 3mut* en condition contrôle ce qui suggère des formes résistantes à l'inhibition de la branche MEK-ERK (**Figure 43D**).

De manière surprenante, l'inhibition LY seule diminue significativement le pourcentage de cellules SOX17+GFP+ (**Figure 43D**). Cette répression de l'expression de SOX17 n'étant pas retrouvée lorsque les deux branches MEK-ERK et PI3K-AKT sont inhibées ensemble ; cela suggère que la forme *Gata6 3mut* est sensible à l'inhibition de la branche PI3K-AKT et que cette sensibilité passerait par le résidu S37. La sensibilité à la branche MEK-ERK semblerait passer par les trois autres résidus : S34, S264 et T509.

#### **II.B.6 Conclusion préliminaire**

Ces résultats montrent que la mutation des quatre résidus ensemble entraîne une diminution de l'expression de SOX17 au sein de la population de cellules transfectées. Au vu des résultats obtenus pour la sérine 264, les résultats de la forme *Gata6 4mut*, et les résultats avec la forme *Gata6 3mut* (**Figure 43B, 43C et 43D**), suggèrent que les résidus S34, S37 et T509 semblent importants pour l'augmentation, au-delà du niveau « basal », de la capacité de GATA6 à induire l'expression de *Sox17* avec potentiellement un rôle modulateur du résidu S264. Les mécanismes d'interaction potentiels



**Figure 44 : Expression protéique de SOX17 après 24h de surexpression des formes de *Gata6* mutées sur les résidus S34, S37 et T509 seuls, en condition contrôle**

Pourcentage de cellules exprimant SOX17 parmi la population de cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> transfectées GFP+ après 24h de surexpression des formes *Gata6* WT (n=2) ou inactives *Gata6* 3mut (n=2), *Gata6* 4mut (n=1), *Gata6* S34A (n=2) *Gata6* S37A (n=2) et *Gata6* T509A (n=2).

Les résultats ont été représentés suivant la moyenne ± SEM pour chaque condition. La significativité statistique des résultats a été testée par un T-Test et est indiquée sur les graphiques (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001, \*\*\*\*P<0,0001).

entre ces résidus ne permettent pas de conclure, avec ces expériences, du rôle individuel de ces sites et du lien avec les branches MEK-ERK et PI3K-AKT.

## **II.C Expression de SOX17 en 24h, et effet de l'inactivation des résidus S34, S37 et T509**

### **II.C.1 Inactivation des résidus S34, S37 et T509 de *Gata6* en condition contrôle**

Afin de caractériser le rôle de ces trois résidus, j'ai réalisé et testé les constructions mutantes pour chacun des résidus S34, S37 et T509 individuellement afin d'observer l'impact de leur inactivation sur l'induction d'expression de SOX17.

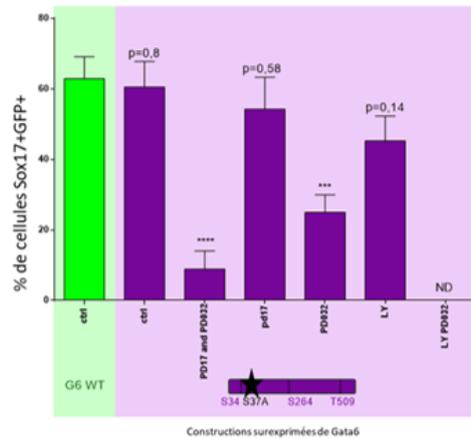
Après 24h, sans inhibiteur, la surexpression de la forme *Gata6 S37A* induit une expression de SOX17 semblable à celle observée en condition de surexpression de la forme *Gata6 WT* (**Figure 44**). En revanche, de manière intéressante, la surexpression des formes *Gata6 S34A* ou *Gata6 T509A* montre une réduction très significative du pourcentage de cellules SOX17+GFP+ comparé à la forme *Gata6 WT* (**Figure 44**). Ces deux formes présentent le même niveau d'expression de SOX17 que celui constaté lors de la surexpression de la forme *Gata6 4mut* (**Figure 44**) ou de l'inhibition seule de PD17 + PD032 après surexpression de la forme *Gata6 WT* (**Figure 44**). Ainsi, ces deux résidus sont nécessaires. Il faut que les deux résidus soient intacts, potentiellement phosphorylables, pour induire une expression de SOX17 plus forte que l'expression « basale » due à la seule expression ectopique de *Gata6*. En effet, une seule mutation réussit à réprimer la capacité de GATA6 à induire l'expression de SOX17.

### **II.C.2 Le résidu S37 semble être le résidu ciblé par la compensation entre les branches MEK-ERK et PI3K-AKT**

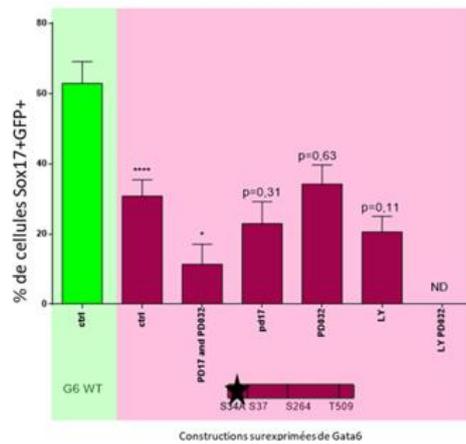
En 24h, surexprimer la forme *Gata6 S37A* induit une expression de SOX17 similaire à celle obtenue en surexprimant la forme *Gata6 WT* (**Figure 45A**). L'inhibition de PD17 + PD032 entraîne une réduction significative du pourcentage de cellules exprimant SOX17+ GFP+ comparée à la condition contrôle sans inhibiteur (**Figure 45A**). En revanche, les inhibitions PD17 seul ou LY seul n'entraînent pas de modification significative dans l'induction de SOX17 comparé à la condition contrôle (**Figure 45A**). Enfin, l'inhibition PD032 seule entraîne une diminution significative (**Figure 45A**) suggérant une sensibilité à la branche MEK-ERK.

Il est intéressant de mettre en exergue ce résultat avec celui obtenu avec la forme *Gata6 3mut* en condition d'inhibition LY seul (**Figure 43D**) qui montre une sensibilité du résidu S37 à la branche PI3K-AKT lorsque celui-ci est intact et potentiellement phosphorylable. En revanche, lorsqu'il est inactivé, il va être sensible à la branche MEK-ERK et insensible à la branche PI3K-AKT (**Figure 45A**).

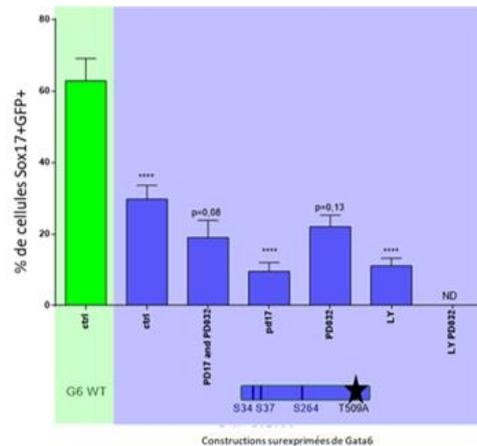
**A.** Expression de SOX17 au sein des cellules transfectées GFP+ en 24h



**B.** Expression de SOX17 au sein des cellules transfectées GFP+ en 24h



**C.** Expression de SOX17 au sein des cellules transfectées GFP+ en 24h



**Figure 45 : Expression protéique de SOX17 après 24h de surexpression des formes de *Gata6* mutées sur les résidus S34, S37 et T509 seuls, en condition contrôle et traitées avec les inhibiteurs des RTK**  
 Pourcentage de cellules exprimant SOX17 parmi la population de cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> transfectées GFP positive (GFP+) et traitées avec des inhibiteurs de la signalisation RTK-FGF, après 24h de surexpression des formes:

- A. *Gata6* WT (n=2) et *Gata6* S37A (n=2).
- B. *Gata6* WT (n=2) et *Gata6* S34A (n=2)
- C. *Gata6* WT (n=4) et *Gata6* T509A (n=2)

Les résultats ont été représentés suivant la moyenne ± SEM pour chaque condition. La significativité statistique des résultats a été testée par un T-Test et est indiquée sur les graphiques (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001, \*\*\*\*P<0,0001).

### II.C.3 L'inactivation des résidus S34 et T509 mime l'inhibition de la voie RTK-FGF

De manière globale, on peut observer que la double double PD17 + PD032 entraîne une forte diminution du pourcentage de cellules exprimant SOX17 pour la forme *Gata6 S34A* et une diminution plus faible pour la forme *Gata6 T509A*. Cette diminution est similaire à celle obtenue pour *Gata6 WT* + PD17 + PD032 (**Figure 43A, 45B et 45C**). De plus, l'inhibition PD032 seul ne diminue pas ce pourcentage de cellules SOX17+ alors qu'en condition d'inhibition PD17 seul ou LY seul, le pourcentage est légèrement plus diminué notamment avec la forme *Gata6 T509A* (**Figure 45B et 45C**). Cela suggère que ces sites sont essentiels à la fonctionnalité de GATA6 pour l'induction du gène cible *Sox17*. De plus, les résidus S34 et T509 médient la réponse à la branche MEK-ERK et sont sensibles au LY et donc à la branche PI3K-AKT, de manière significative pour la forme *Gata6 T509A*.

En condition d'inactivation de S34 seule ou T509 seule, le résidu S37 est intact (soit comme la forme *Gata6 3mut*) et l'induction de SOX17 est réduite, en présence ou absence d'inhibition RTK-FGF. Or, ce patron du pourcentage de cellules SOX17+GFP+ n'est pas semblable à celui de la construction *Gata6 3mut* (**Figure 43D, 45B et 45C**). Ainsi, une coopération avec le résidu S37 semble se confirmer.

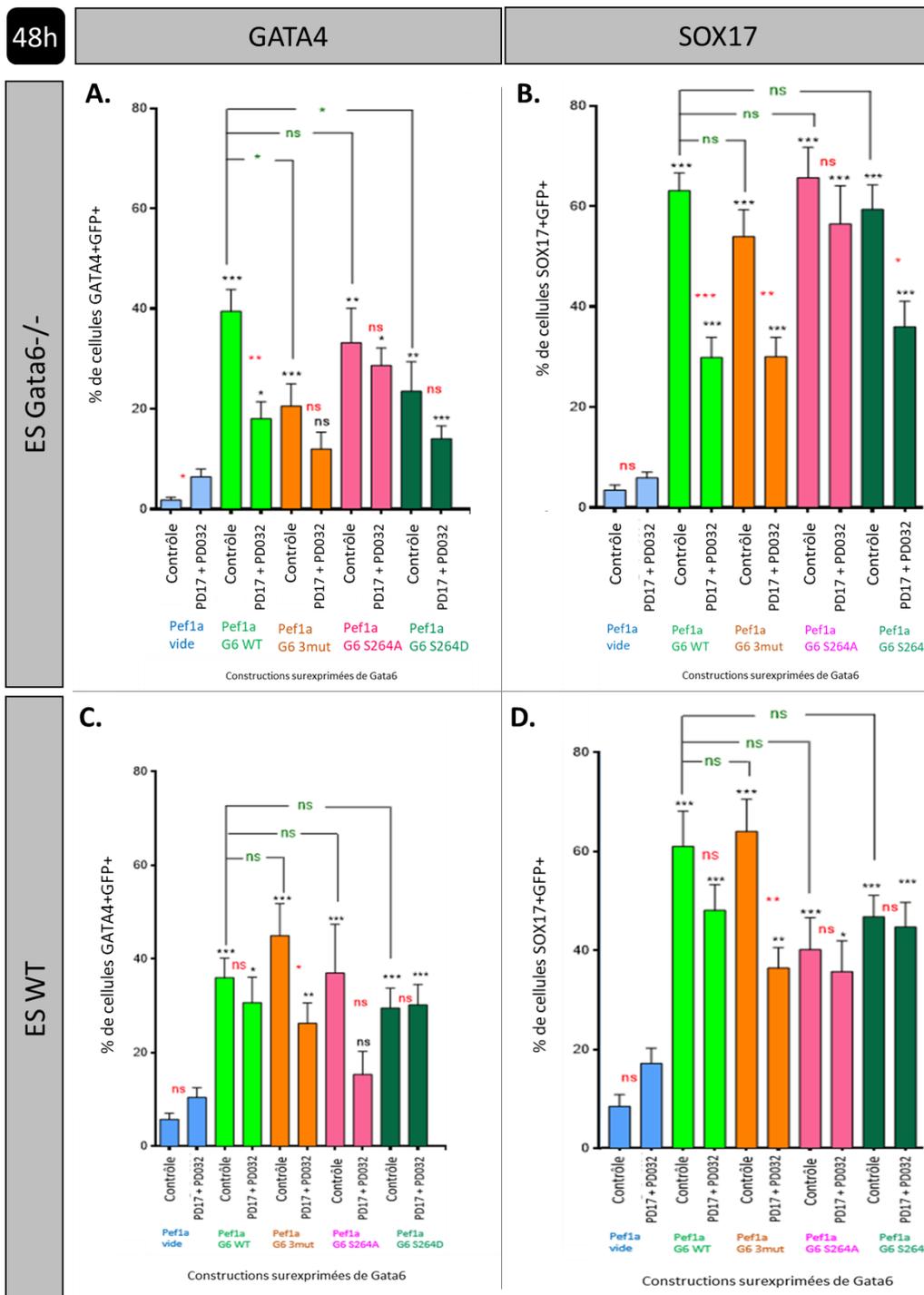
### II.C.4 Conclusion préliminaire

Les résidus étudiés semblent être importants notamment les trois résidus S34, S37 et T509 qui semblent coopérer et moduler l'activité de GATA6 suivant leur sensibilité à la voie RTK-FGF. L'inactivation des résidus S34 et T509 seuls diminue le niveau d'expression de SOX17. La forme *Gata6 3mut* est sensible seulement à l'inhibition de la branche PI3K-AKT suggérant que le résidu S37 soit ciblé par la compensation entre les branches MEK-ERK et PI3K-AKT. En revanche, le résidu S264 ne semble pas être indispensable mais pourrait moduler secondairement la sensibilité à la voie RTK-FGF en association ou non avec les autres résidus. Il est donc envisagé de compléter ses résultats en réalisant d'autres constructions combinant une inactivation des résidus deux par deux ou des constructions phosphomimétiques afin de confirmer la potentielle coopération entre les 4 résidus étudiés.

## II.D Expression de SOX17 et GATA4 en 48h

Chronologiquement, des expériences en 48h, ont été réalisées, avant celles en 24h, en cellules ES WT parallèlement aux cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> (**Figure 46**). A ce moment-là, je n'avais pas séquencé les constructions que j'utilisais puisqu'elles avaient été réalisées avant mon arrivée au laboratoire et je pensais avoir en ma possession la forme *Gata6 4mut* qui était en réalité la forme *Gata6 3mut*. De fait, l'interprétation des résultats à ce moment-là n'a pas été la bonne et je n'ai donc pas poursuivi les expériences en cellules ES WT.

En cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, les résultats divergent pour SOX17 et GATA4, à 48h.



**Figure 46 : Pourcentage de cellules exprimant GATA4 (A, C) ou SOX17 (B, D) parmi la population de cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> (A, B) ou ES WT (C, D) transfectées GFP positive (GFP+) et traitées avec des inhibiteurs de la signalisation RTK-FGF, après 48h de surexpression de *Gata6*.**

Trois expériences ont été réalisées (n=3).

Les résultats ont été représentés suivant la moyenne ± SEM pour chaque condition.

La significativité statistique des résultats a été testée par un test de Mann-Whitney (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001, \*\*\*\*P<0,0001) et est indiquée sur les graphiques:

- (\*) comparaison par rapport au contrôle *Pef1a vide*.
- (\*) pour une même construction de *Gata6*, les cellules sans ou avec les inhibiteurs PD17+PD032.
- les significativités vertes sont testées pour les comparaisons entre chaque construction de *Gata6* et la forme *Gata6 WT*.

Pour SOX17, dans les cellules ES WT et ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, aucune différence n'est observée entre les formes *Gata6* WT et *Gata6* 3mut en condition contrôle (**Figure 46B et 46D**). Ainsi, la construction *Gata6* 3mut se comporte de la même façon dans les deux types de cellules.

Pour GATA4, dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> (**Figure 46A**), on observe le même profil de résultats que celui obtenu en 24h sur l'expression de SOX17 dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> (**Figure 43**). En effet, une diminution significative est constatée lors de la double inhibition PD17 + PD032 après surexpression de la forme *Gata6* WT comparée à la condition contrôle (**Figure 46A**). De plus, la surexpression de la forme *Gata6* 3mut diminue significativement l'expression de GATA4 en condition contrôle (**Figure 46A**). Cette diminution est comparable à celle observée lors de la double inhibition PD17 + PD032 après surexpression de cette même forme *Gata6* 3mut ainsi qu'à la diminution observée en condition *Gata6* WT + PD17 + PD032 (**Figure 46A**). De la même manière que lors de l'expression de SOX17 en 24h, une diminution non significative est observée avec la surexpression de la forme *Gata6* S264A (**Figure 46A**). Enfin, une diminution significative *Gata6* S264D est constatée en condition contrôle (**Figure 46A**).

Ainsi, dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, le mécanisme par lequel les gènes cibles de GATA6, *Sox17* et *Gata4*, sont activés est le même au niveau de l'initiation de leur expression, soit en 24h pour *Sox17* soit en 48h pour *Gata4*. Ce mécanisme repose sur le fait que la signalisation RTK-FGF agirait potentiellement directement sur GATA6 pour l'initiation de l'induction de l'expression de SOX17 et GATA4. Seul un décalage temporel est constaté dans l'expression de GATA4 mais le mécanisme reste le même et est sous la dépendance de GATA6 et de la voie RTK-FGF.

En revanche, pour GATA4, les résultats dans les cellules ES WT divergent de ceux obtenus en ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, en 48h, (**Figure 46A et 46C**) puisque dans les cellules ES WT, aucune différence n'est constatée entre le pourcentage obtenu en surexprimant la forme *Gata6* 3mut en condition contrôle (**Figure 46C**). De plus, dans les cellules ES WT, une diminution du pourcentage de cellules GATA4+ GFP+ est observée pour la forme *Gata6* 3mut lorsque les cellules sont traitées au PD17 + PD032 comparée à la condition contrôle pour la surexpression de la même forme, ce qui diverge du résultat obtenu dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> (**Figure 46C**).

Pour SOX17 et GATA4, dans les cellules ES WT, que ce soit en condition contrôle ou de double inhibition PD17 + PD032, la forme *Gata6* WT est capable d'induire une expression de SOX17 et de GATA4 dans les cellules GFP+ (**Figure 46C et 46D**). Aucune différence significative d'expression de ces deux gènes n'est observée lors de la surexpression des formes *Gata6* S264A et *Gata6* S264D en condition contrôle (**Figure 46C et 46D**). Cela montre que, possiblement, les effets des formes de *Gata6* sont dilués dans les cellules ES WT, par l'activation du *Gata6* endogène. Or, ces résultats sont à compléter avec les autres conditions d'inhibition, avec la forme *Gata6* 4mut ainsi qu'avec les autres



formes *Gata6* S37A, *Gata6* S34A et *Gata6* T509A. Pour le moment, nous sommes donc dans l'incapacité de conclure quant à la relation GATA6/RTK-FGF, dans les cellules ES WT.

De plus, il est envisagé de réaliser d'autres constructions combinant une inactivation des résidus étudiés deux par deux ou des constructions phosphomimétiques afin de confirmer la potentielle coopération entre les 4 résidus étudiés.

Le même type d'expérience a aussi été effectué à 32h pour l'expression de SOX17 (**Figure ANNEXE 1**). Une seule expérience a été faite. Les résultats semblent intermédiaires à ceux obtenus en 24h et en 48h avec une complexité forte ce qui tend à montrer que ce temps est intermédiaire et qu'il serait la charnière entre la fin d'initiation de l'expression de SOX17 et le début de son maintien. Néanmoins, les diminutions observées, en condition contrôle, entre *Gata6* WT, *Gata6* 3mut et *Gata6* 4mut sont confirmées. Une seule expérience a été réalisée et l'induction observée avec la forme *Gata6* WT en condition contrôle est moindre. La reproduction de cette expérience est donc nécessaire pour comprendre le mécanisme (dé)liant GATA6 et la voie RTK-FGF à ce moment charnière.

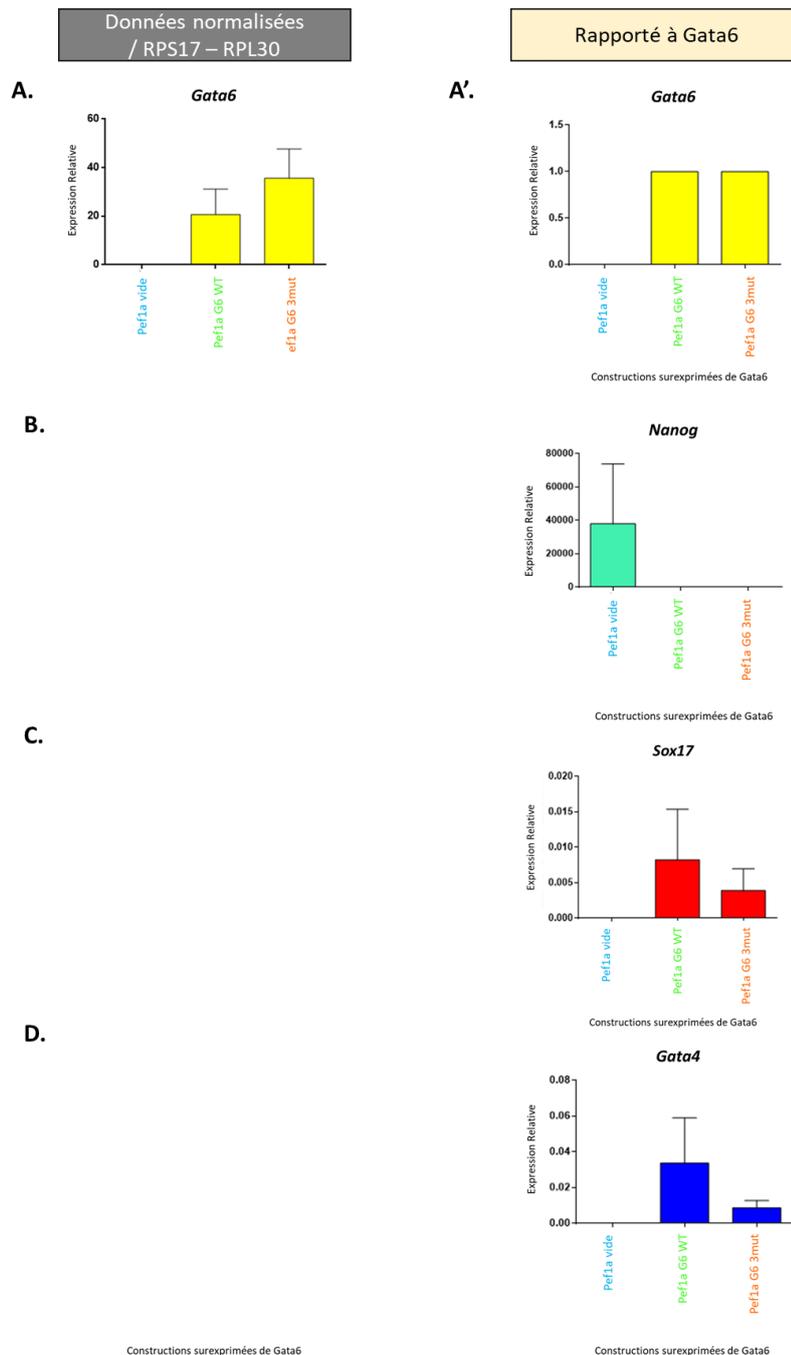
## II.E Conclusion Générale

Dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, le mécanisme par lequel les gènes cibles de GATA6, *Sox17* et *Gata4*, sont activés est le même au niveau de l'initiation de leur expression, soit en 24h pour *Sox17* soit en 48h pour *Gata4*. Ce mécanisme repose sur le fait que l'activation des gènes cibles de la différenciation des cellules en EPr, *Sox17* et *Gata4*, se fait *via* une activation directe de GATA6 modulée par la signalisation RTK-FGF. Seul un décalage temporel est constaté dans l'expression de GATA4. La phosphorylation directe des résidus de GATA6 ou d'un intermédiaire, cofacteur de GATA6 reste à investiguer. Ainsi, parmi les deux hypothèses émises (**Figure 33**), l'hypothèse favorisée serait la première.

De plus, en 24h, dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, l'analyse de l'expression du gène cible SOX17 induit après surexpression de différentes formes de *Gata6* montre une induction par la branche MEK-ERK essentiellement et potentiellement sauvée par la branche PI3K-AKT.

Cependant, contrairement aux cellules de carcinome intestinal CaCo2 utilisées par *Adachi et al* (Adachi et al., 2008), mes résultats montrent que le site S264 ne semble pas être indispensable dans l'activation de *Gata6* pour l'expression de SOX17 mais pourrait moduler secondairement la sensibilité à la voie RTK-FGF en association ou non avec les autres résidus.

De plus, j'ai observé que les résidus S34 et T509 sont nécessaires pour induire l'expression de ce gène cible avec une potentielle coopération entre résidus qui reste cependant à démontrer. Le résidu S37 semble, quant à lui, être ciblé par la compensation entre les branches MEK-ERK et PI3K-AKT.



**Figure 47 : Quantification par RT-qPCR de l'expression, en 24h, de *Gata6* (plasmide), du gène de pluripotence *Nanog*, et des gènes de différenciation de l'EPr *Sox17* et *Gata4*, sur population totale GFP positive et GFP- en condition contrôle.**

**A et A'.** Pour l'expression ARNm de *Gata6* (plasmide): Comparaison entre la normalisation faite avec la moyenne géométrique des gènes de ménages *Rps17* et *Rpl30* (**A**) et le rapport entre ces valeurs normalisées et la valeur normalisée obtenue pour *Gata6* (plasmide) (**A'**).

**A', B, C et D.** Rapports entre les valeurs obtenues et normalisées avec les gènes de ménages pour l'expression des autres gènes étudiés et la valeur obtenue pour *Gata6* (plasmide) normalisée elle aussi avec les gènes de ménage.

Les graphes représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Deux réplicats biologiques ont été réalisés (n=2).

### **III Quel est l'impact de l'inactivation de certains résidus de GATA6 sur l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles ?**

GATA6 est un facteur de transcription. Il était donc logique d'étudier l'effet de l'inactivation de certains résidus de GATA6 sur l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles. J'ai donc procédé à la quantification par RT-qPCR, des niveaux d'ARNm des gènes cibles *Sox17* et *Gata4* mais aussi d'autres marqueurs, impliqués lors de la différenciation de l'EPr. Toutes les expériences de RT-qPCR ont été réalisées dans les cellules ES mutantes *Gata6*<sup>-/-</sup>, puisque l'expression du GATA6 endogène présente un effet (ES WT résultats en 48h – **Figure 46C et 46D**).

#### **III.A Observation de l'expression des gènes cibles au sein de la population totale transfectée (GFP+) et non transfectée (GFP-)**

L'ensemble des cellules transfectées GFP positive et non transfectées (GFP-) ont été traitées globalement.

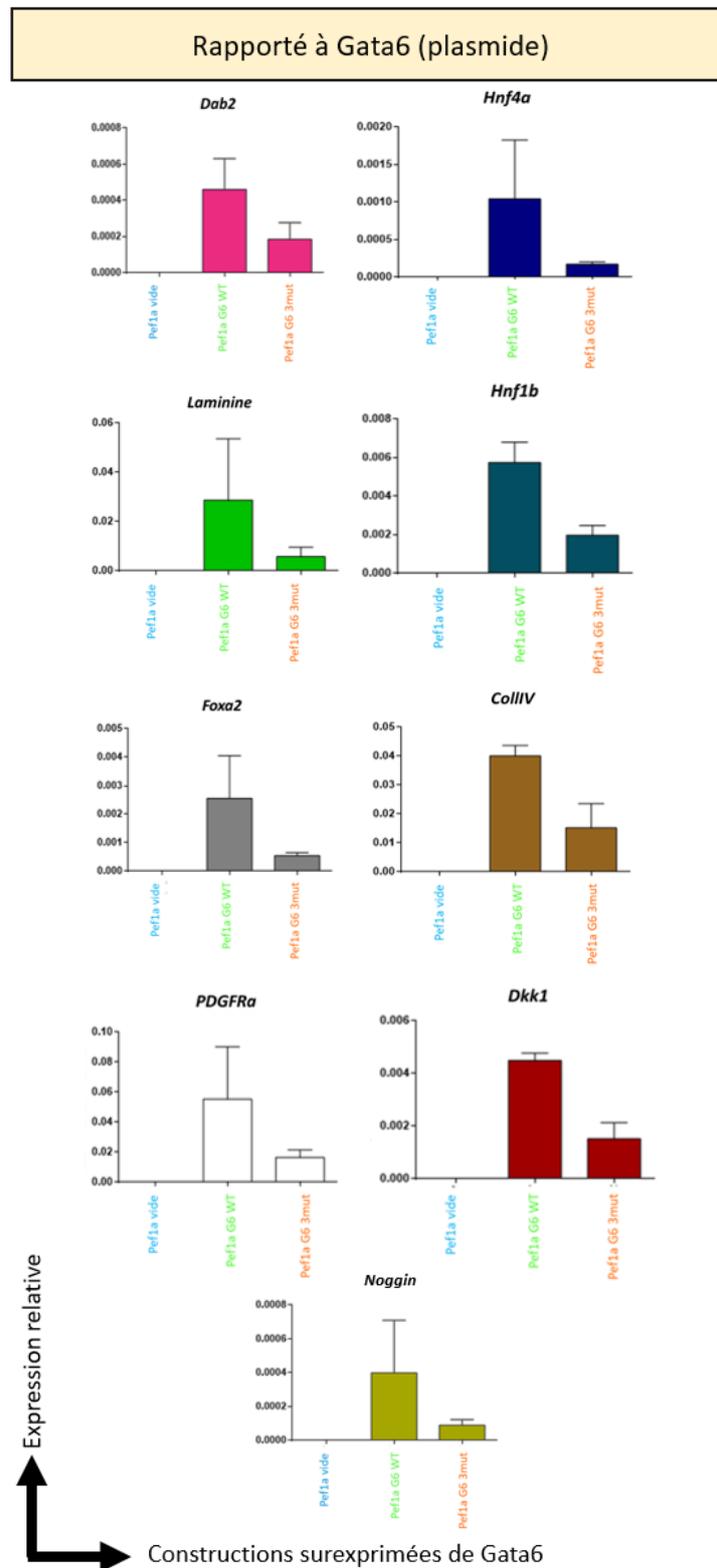
L'expression ARNm de *Gata6* a été détectée avec des primers ne détectant que la forme plasmidique surexprimée. Ainsi, l'ARNm de *Gata6* n'est détecté qu'après surexpression des formes *Gata6* WT et *Gata6* 3mut (**Figure 47A**). On observe que l'on détecte plus de *Gata6* en condition de surexpression de la forme *Gata6* 3mut qu'en condition *Gata6* WT. Ainsi, cela révèle sûrement une différence de transfection entre les deux conditions. Par conséquent, pour résoudre cela, les données obtenues pour chaque autre gène, après normalisation avec la moyenne géométrique des gènes de ménages *Rps17* et *Rpl30*, ont été ensuite rapportées aux valeurs obtenues pour *Gata6* (**Figure 47A'**) ce qui nous permet de niveler de manière équivalente l'induction par *Gata6* des gènes cibles.

##### **III.A.1 Expression ARNm de *Nanog***

Quelle que soit la forme surexprimée de *Gata6*, *Nanog* est réprimé au niveau ARNm (**Figure 47B**) et au niveau protéique (**Figure ANNEXE 2**). Au niveau protéique, il n'a pas été constaté d'inhibition totale de NANOG (pas de diminution d'intensité de l'immunomarquage pour NANOG) après surexpression pendant 24h de GATA6 (**Figure ANNEXE 2**) ce qui pourrait être dû à la demi-vie de la protéine NANOG qui lui permet d'être encore présente sans transcription ARN.

##### **III.A.2 L'expression ARNm de *Sox17* est diminuée avec la forme *Gata6* 3mut**

J'ai ensuite procédé à l'analyse de l'expression ARNm de *Sox17*. On observe que l'expression de *Sox17* est diminuée en surexprimant *Gata6* 3mut comparé à la surexpression *Gata6* WT. Le patron d'expression ARNm de *Sox17* obtenu en 24h coïncide donc avec le patron d'expression protéique obtenu en 24h (**Figure 47C**) puisque une diminution significative est aussi constatée.



**Figure 48 : Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes de différenciation de l'EPr, sur population totale GFP positive et GFP- en condition contrôle, après 24h de surexpression de *Gata6*.** Les résultats représentés correspondent aux rapports réalisés entre les valeurs normalisées avec la moyenne géométrique des gènes de ménages *Rps17* et *Rpl30* et la valeur normalisée obtenue pour *Gata6* (plasmide) pour chaque gène et chaque condition. Les graphes représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Deux réplicats biologiques ont été réalisés (n=2).

### **III.A.3 L'expression ARNm de *Gata4* en 24h confirme son expression protéique à 48h**

Puis, j'ai procédé à l'analyse de l'expression ARNm de *Gata4* après 24h de surexpression des formes *Gata6 WT* et *Gata6 3mut*. On remarque nettement que la forme *Gata6 WT* est plus efficace pour l'induction de l'expression ARNm de *Gata4* que la forme *Gata6 3mut* (**Figure 47D**). Ce patron d'expression ARNm obtenu en 24h précède l'expression de la protéine GATA4 observée seulement après 48h et le profil d'expression protéique de GATA4 est similaire à son profil ARNm (**Figure 46A et 47D**).

En conclusion, il semble que la forme *Gata6 3mut* soit moins efficace que la forme *Gata6 WT* pour l'induction des gènes cibles de GATA6, tels que *Sox17* et *Gata4*. Ainsi, il semblerait que l'état de phosphorylation de GATA6 ou les résidus en eux-mêmes, jouent un rôle important au moment de l'initiation de ses gènes cibles *Sox17* et *Gata4*.

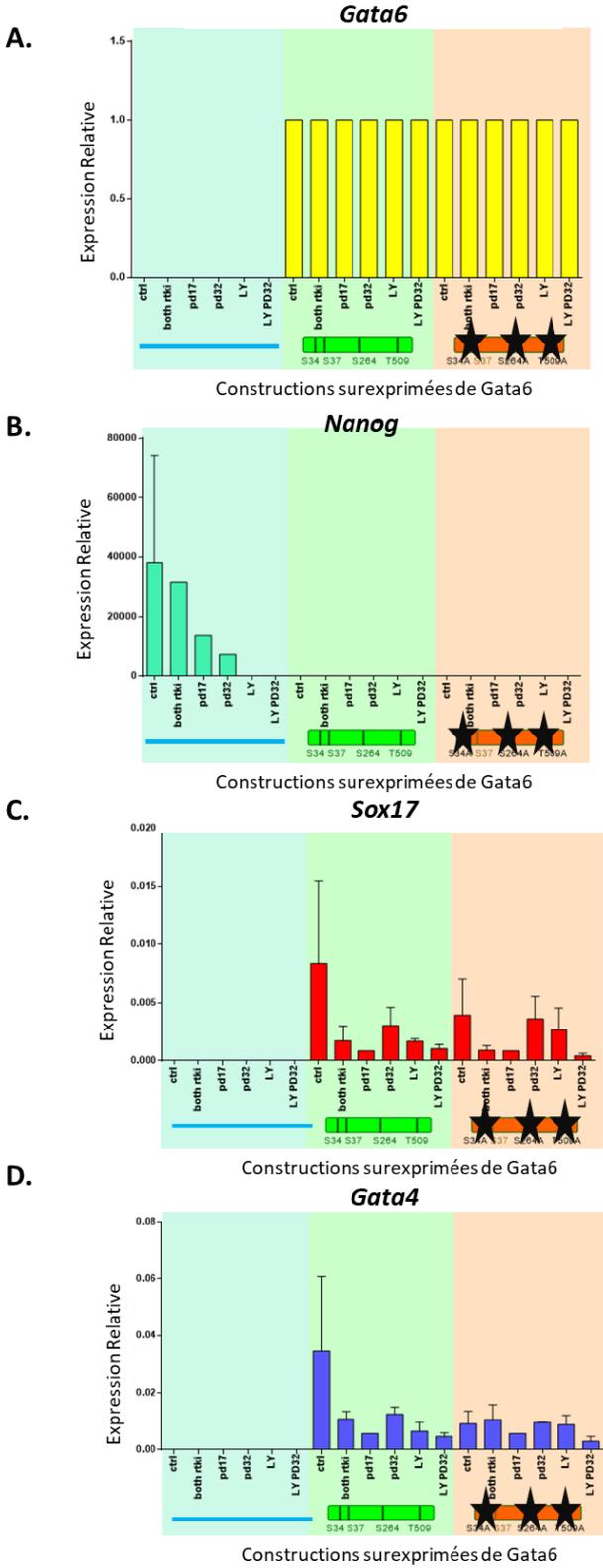
### **III.A.4 *Gata6 3mut* serait moins efficace pour l'induction d'autres gènes de différenciation de l'EPr**

De nombreux gènes sont exprimés et constituent des marqueurs de la différenciation et de la maturation de l'EPr. Ainsi, j'ai observé l'expression ARNm d'autres gènes tels que *Dab2*, *Laminine*, *FoxA2*, *PDGFR $\alpha$* , *Dkk1*, *Noggin*, *Collagène IV*, *Hnf1a* et *Hnf1b* (**Figure 48**). L'ensemble de ces gènes présentent un profil d'expression ARNm très similaire à celui obtenu pour *Sox17* et *Gata4*. En effet, une diminution de l'expression ARNm de ces gènes est constatée entre la condition de surexpression de la forme *Gata6 WT* comparée à la surexpression de la forme *Gata6 3mut* (**Figure 48**). Ainsi, l'efficacité d'initiation de l'expression de ces gènes tend à dépendre de l'état de phosphorylation de GATA6 ou des résidus en eux-mêmes (**Figure 48**). De manière générale, *Gata6 WT* et *Gata6 3mut* sont capables, plus ou moins efficacement, d'induire l'expression ARNm des marqueurs de différenciation caractéristiques de l'EPr et donc de trans-différencier les cellules ES vers un destin qui ne leur est pas propre.

### **III.A.5 L'inhibition de la voie RTK diminue l'expression ARN des gènes de différenciation EPr *Sox17* et *Gata4***

Deux expériences ont été réalisées avec différentes conditions sans traitement et traitées avec les différentes combinaisons d'inhibiteurs après 24h de surexpression des formes *Gata6 WT* et *Gata6 3mut* (**Figures 49 et Figure ANNEXE 3**). On observe que *Nanog* est réprimé lorsque *Gata6* est exprimé et on préserve l'expression de *Nanog* en condition de double inhibition PD17 + PD032 lorsque le plasmide *Pef1a vide* est surexprimé (**Figure 49B**). L'expression ARNm de *Sox17* reflète l'expression protéique observée en 24h lorsque la forme *Gata6 WT* est surexprimée quelles que soient les conditions de traitement aux inhibiteurs de la voie RTK (**Figure 49C**).

Rapporté à Gata6 (plasmide)



**Figure 49 : Quantification par RT-qPCR de l'expression, en 24h, de *Nanog*, gène de pluripotence et des gènes de différenciation de l'Epr, *Sox17* et *Gata4* après traitement aux inhibiteurs des RTK**  
 Un rapport a été réalisé entre ces valeurs normalisées et la valeur normalisée obtenue pour *Gata6* (*plasmide*) pour chaque condition (A à D). Les graphes représentent la moyenne ± SEM. Deux réplicats biologiques ont été réalisés (n=2). Both RTKi = PD17 + PD032

En revanche, le profil d'expression n'est pas le même avec la forme *Gata6 3mut* suggérant un autre mécanisme de régulation, au niveau protéique de GATA6 potentiellement, qui n'est pour le moment pas décrit (**Figure 49C et 49D**). En effet, la surexpression de la forme *Gata6 3mut* diminue l'expression des gènes cibles mais lorsque les inhibiteurs de la voie RTK-FGF sont ajoutés, les niveaux d'expression ARNm obtenus se retrouvent encore diminués. Ainsi, la forme *Gata6 3mut* n'est pas totale et il est envisagé de réitérer ces expériences avec la forme *Gata6 4mut* recouvrant l'ensemble des résidus impliqués comme suggéré dans les expériences d'immunomarquage précédentes.

Concernant l'expression ARNm de *Gata4*, quel que soit le type d'inhibition de la voie RTK-FGF et la forme surexprimée de GATA6, cela engendre une forte diminution de l'expression ARNm de *Gata4*. De plus, les conditions « contrôle sans traitement » et « PD17+PD032 » récapitulent les résultats obtenus au niveau protéique en 48h après surexpression des formes *Gata6 WT* et *Gata6 3mut*. Concernant les autres traitements, des expériences supplémentaires mériteraient d'être faites en 48h afin de voir si le profil d'expression ARNm est confirmé au niveau protéique. Enfin, les autres gènes de différenciation de l'EPr suivent le même profil d'expression ARNm que *Sox17* et *Gata4* avec une forte diminution de leur expression après inhibition de la voie RTK-FGF.

### **III.A.6 Conclusion préliminaire**

J'ai constaté que la forme *Gata6 3mut* est moins efficace que la forme *Gata6 WT* pour l'induction, au niveau ARNm, des gènes cibles de GATA6, tels que *Sox17* et *Gata4*. Cela suggère que l'état de phosphorylation de GATA6 ou les résidus eux-mêmes, jouent un rôle important au moment de l'induction de ses gènes cibles.

De plus, l'expression ARNm de *Sox17* reflète l'expression protéique observée à 24h lorsque la forme *Gata6 WT* est surexprimée quelles que soient les conditions de traitement avec les inhibiteurs de la voie RTK-FGF (**Figure 49C**). Cela n'est pas le cas pour la forme *Gata6 3mut* où l'expression ARNm de *Sox17* est diminuée mais de manière moindre, au niveau protéique, sauf en condition LY (**Figure 43D et 49C**) renforçant le rôle de cible du résidu S37 par les branches MEK-ERK et PI3K-AKT.

Concernant l'expression de *Gata4*, les résultats obtenus au niveau ARNm à 24h et protéique à 48h après surexpression des formes *Gata6 WT* et *Gata6 3mut* suivent le même profil en condition contrôle et de double inhibition PD17 + PD032.

Par conséquent, la normalisation avec *Gata6 (plasmide)* permet de résoudre les problèmes d'efficacité de transfection. Cependant, pour éviter cette normalisation, j'ai entrepris de trier les cellules transfectées en fonction du signal GFP afin d'homogénéiser le signal GFP dans le but d'homogénéiser en nombre de copie de *Gata6* la population d'intérêt.

Surexpression du plasmide *Pef1a Gata6 WT* (24h)

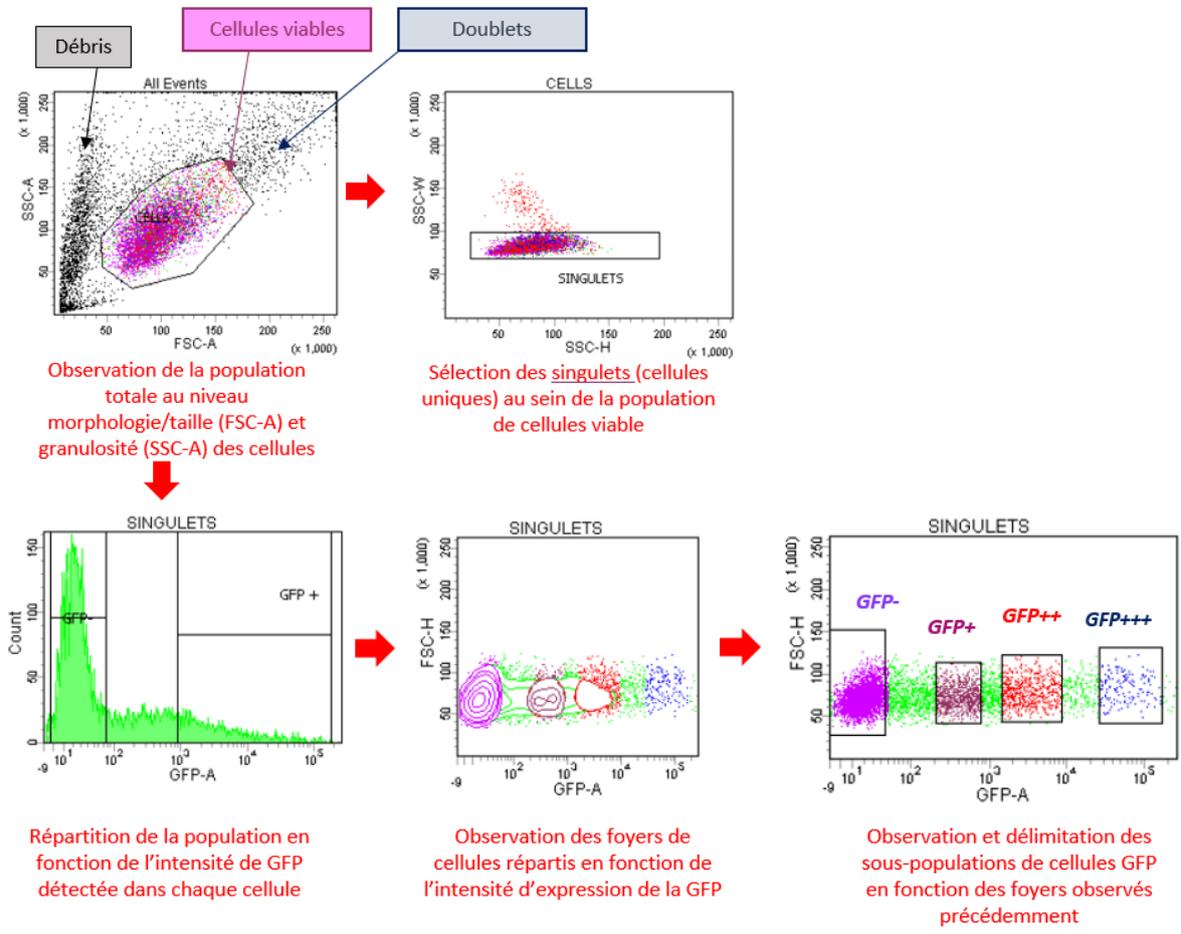


Figure 50 : Détail des réglages pour le tri des cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> au FACS ARIA II en condition contrôlée avec surexpression de *Gata6 WT* après 24h.

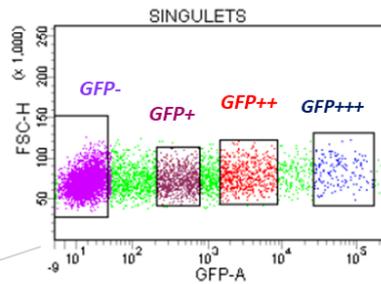
### III.B Une population GFP++ se distingue des autres populations de cellules transfectées

L'analyse de la population totale de cellules transfectées GFP positive et de cellules non transfectées GFP- a été réalisée par le cytomètre en flux Aria II. Les calibrages ont été réalisés sur cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> non transfectées (**Figure ANNEXE 5**) et transfectées avec soit le plasmide *Pef1a* vide (**Figure ANNEXE 6**) ; soit le plasmide surexprimant la forme *Gata6* WT (**Figure 50**). Les détails de la calibration sont détaillés en « Matériels et Méthodes ».

J'ai mis en évidence que la population de cellules transfectées avec la forme *Gata6* WT était composée de trois sous-populations cellulaires GFP+, GFP++, GFP+++ correspondant à différents niveaux croissants d'ARNm *Gfp* et donc d'ARNm *Gata6* (**Figure 50, 51A et 51B**). Parmi ces trois sous-populations, la population GFP++ se distingue des autres avec un niveau d'expression de *Nanog* plus élevé (**Figure 51C**). Ce niveau est d'autant plus réprimé lorsque *Gata6* WT est exprimé au sein de cette sous-population (**Figure 51C**). De plus, cette sous-population exprime le plus fortement les gènes de différenciation de l'EPr *Sox17* et *Gata4* (**Figure 51D et 51E**). De ce fait, j'ai choisi de poursuivre les expériences, de RT-qPCR, en triant et sélectionnant uniquement cette sous-population GFP++.

La surexpression de la forme *Gata6* 3mut en condition contrôle donne les mêmes résultats de diminution de *Gata4* (**Figure 52E**), comparés aux résultats obtenus précédemment en population totale (**Figure 47D, 49D**), mais cela n'est pas le cas pour *Sox17* puisque son expression n'est pas diminuée entre la forme *Gata6* WT et la forme *Gata6* 3mut sur population triée comparée à la population totale (**Figure 47C, 49C et Figure 52D**).

Ces expériences en condition contrôle sans inhibiteurs et en condition d'inhibition de la voie RTK ont été reproduites en analysant l'ensemble des gènes choisis pour étudier la différenciation en EPr (n=2 et n=3 respectivement – **Figure ANNEXE 7 à 18**). Elles ne donnent malheureusement pas les mêmes résultats ce qui suggère qu'une hétérogénéité est encore présente et que les variations dans l'efficacité de transfection ne sont toujours pas résolues. Cela pourrait s'expliquer par l'observation de l'intensité du signal de fluorescence GFP au sein des cellules transfectées de la sous-population intermédiaire GFP++, sur lequel est basé le tri de ces cellules (**Figure 53**). En effet, l'intensité de fluorescence de cette population varie entre 10<sup>3</sup> et 10<sup>4</sup> (**Figure 54**). Cela pourrait être gage d'une hétérogénéité due au nombre différent de copies de *Gata6* (*plasmide*) surexprimées au sein des cellules et pourrait expliquer la non-reproductibilité des expériences. J'ai donc entrepris de réaliser des lignées stables afin d'outre passer tous ces problèmes techniques.



Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR (24h)

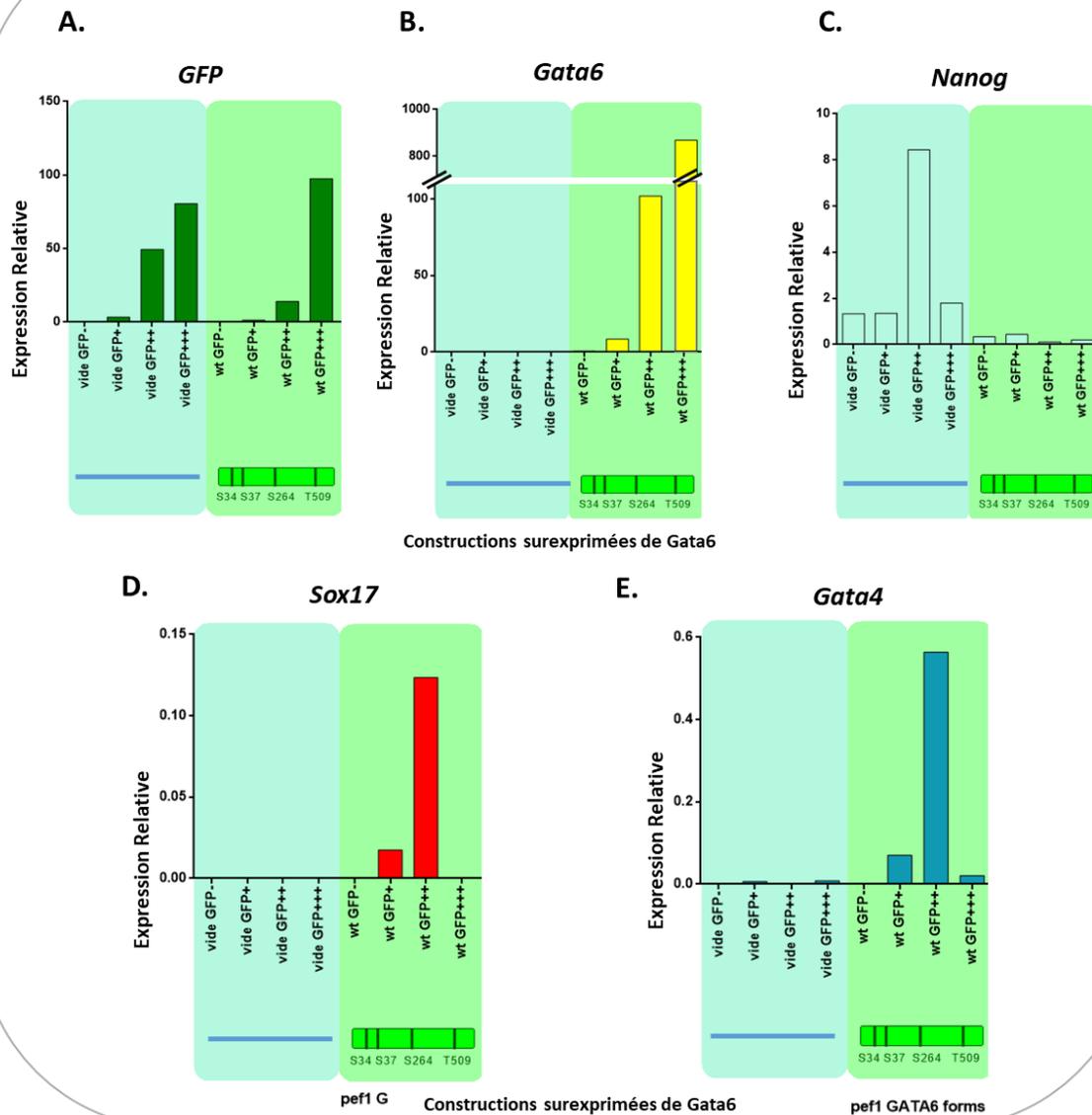


Figure 51 : Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes *Gfp* (A) et *Gata6* (plasmide) (B), *Nanog* (C), *Sox17* (D) et *Gata4* (E) après 24h de surexpression du plasmide *Pef1a* vide et de *Gata6* WT.

La normalisation a été réalisée classiquement avec la moyenne géométrique des gènes de ménage *Rps17* et *Rpl30*. Une expérience a été réalisée ici (n=1).

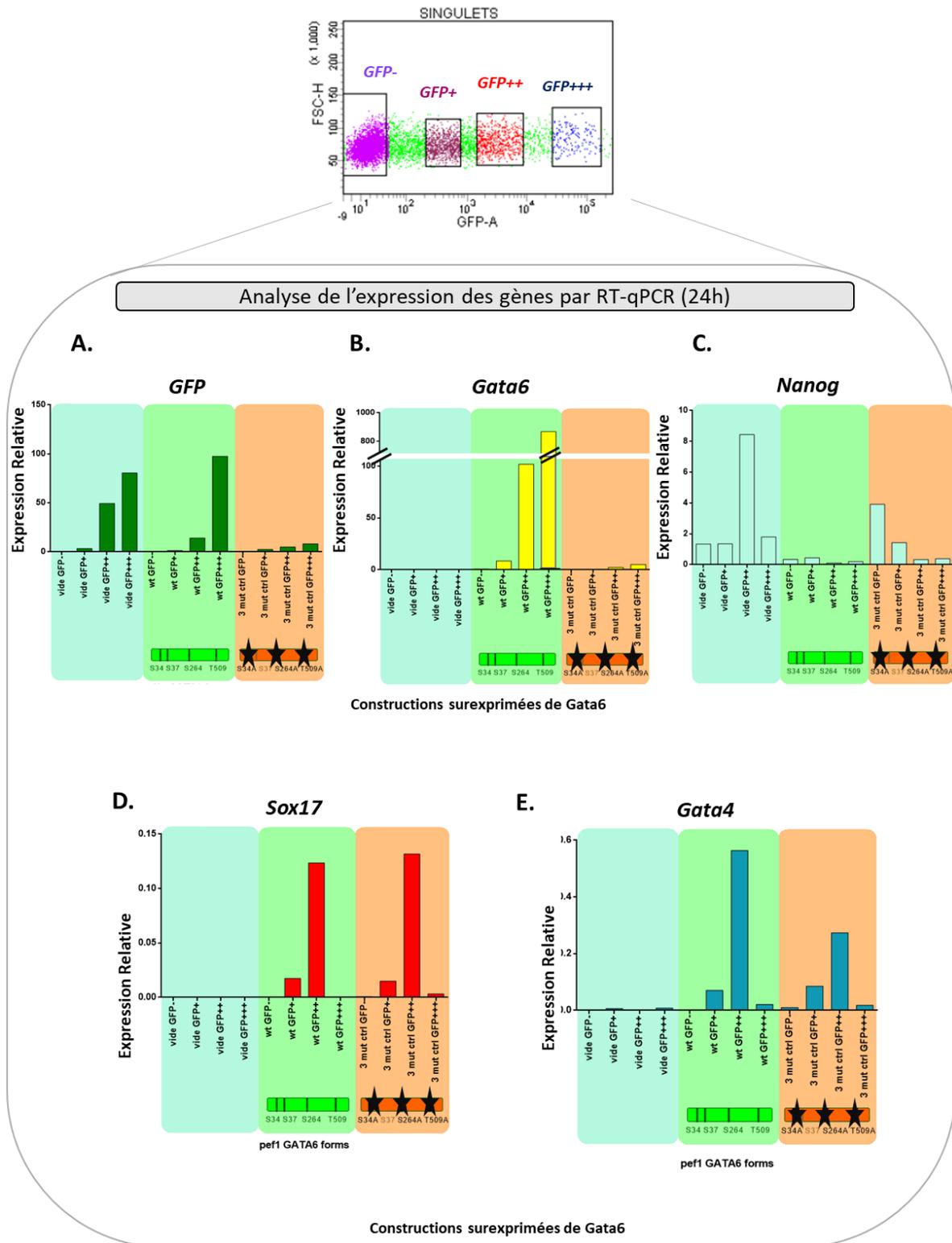
### III.C Etablissement de lignées stables inductibles à la Doxycycline

J'ai débuté la création de lignées stables afin d'induire de manière non transitoire une expression contrôlée des formes de GATA6, dans l'ensemble des cellules ES induites à la Doxycycline.

J'ai utilisé une stratégie de cellules souches embryonnaires ES-KH2 dans lesquelles le locus du Collagène 1a, *Col1A1*, a été modifié (**Figure 54A**) afin de recevoir et d'exprimer un gène d'intérêt (dans notre cas les différentes formes de *Gata6*). De plus, l'induction de ces cellules va être permise par le système Tet-ON situé dans le locus de ROSA26 (**Figure 54B**) *via* un traitement à la Doxycycline (Aksoy et al., 2013).

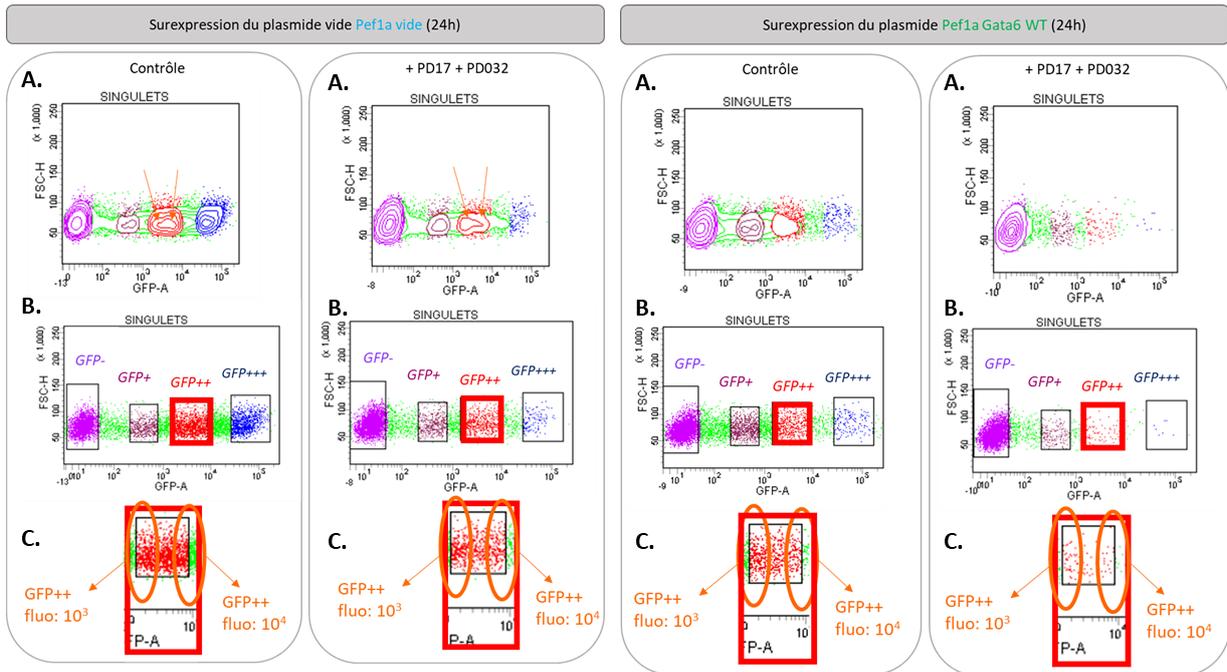
Ainsi, j'ai entrepris de réaliser les constructions plasmidiques comprenant les séquences de *Gata6* en aval du promoteur PGK (« Phosphoglycerate kinase ») (**Figure 55A et 55B**). Les constructions pour les formes de *Gata6* sauvage PGK *Gata6* WT et *Gata6* mutées sur les sites S34, S264 et T509, PGK *Gata6* 3mut ont été réalisées (**Figure 55A**). La forme PGK *Gata6* 4 mut est en cours de réalisation. De plus, au vu des résultats obtenus avec les formes de *Gata6* mutantes sur les résidus S34 et T509 seuls, il est aussi envisagé de produire les constructions PGK *Gata6* S34A et PGK *Gata6* T509A. De plus, les cellules KH2 peuvent exprimer *Gata6* de manière endogène, ainsi, il est nécessaire de mettre en place une stratégie de délétion du gène *Gata6* endogène. Celle-ci est en cours de réflexion par la technique de CRISPR-Cas9.

Par conséquent, une fois établies, les cellules seront mutantes pour le *Gata6* endogène et pourront exprimer différentes formes de *Gata6* de manière stable et avec une expression proche d'une expression endogène, même si cette expression sera induite *via* le promoteur du *Col1A1* et non par le propre promoteur de *Gata6*.



**Figure 52 : Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes *Gfp* (A) et *Gata6* (plasmide) (B), *Nanog* (C), *Sox17* (D) et *Gata4* (E) après 24h de surexpression du plasmide *Pef1a* vide, *Gata6* WT et *Gata6* 3mut.**

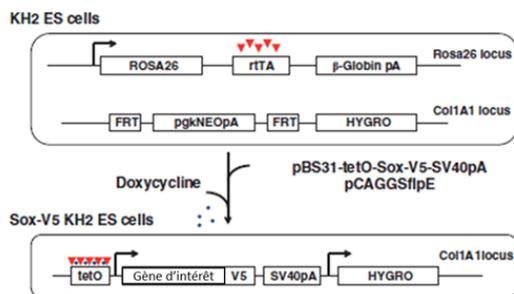
La normalisation a été réalisée classiquement avec la moyenne géométrique des gènes de ménage *Rps17* et *Rpl30*. Une expérience a été réalisée ici (n=1).



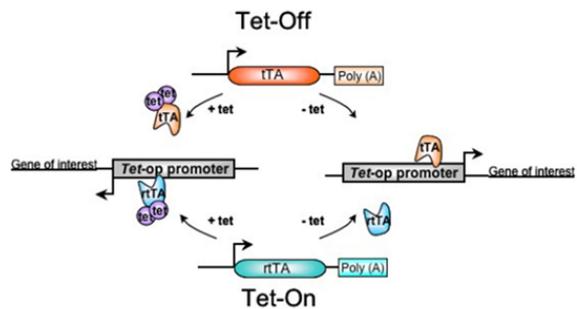
**Figure 53 : Observation de l'intensité du signal de fluorescence GFP au sein des cellules transfectées *Gata6*<sup>-/-</sup> de la sous population intermédiaire **GFP ++** en condition contrôle ou de double inhibition PD17 + PD032.**

- A. « Hot-spots » ou foyers d'intensité de GFP.
- B. Répartition des cellules au sein des foyers.
- C. Répartition des cellules au sein du foyer intermédiaire **GFP++**.

A.



B.

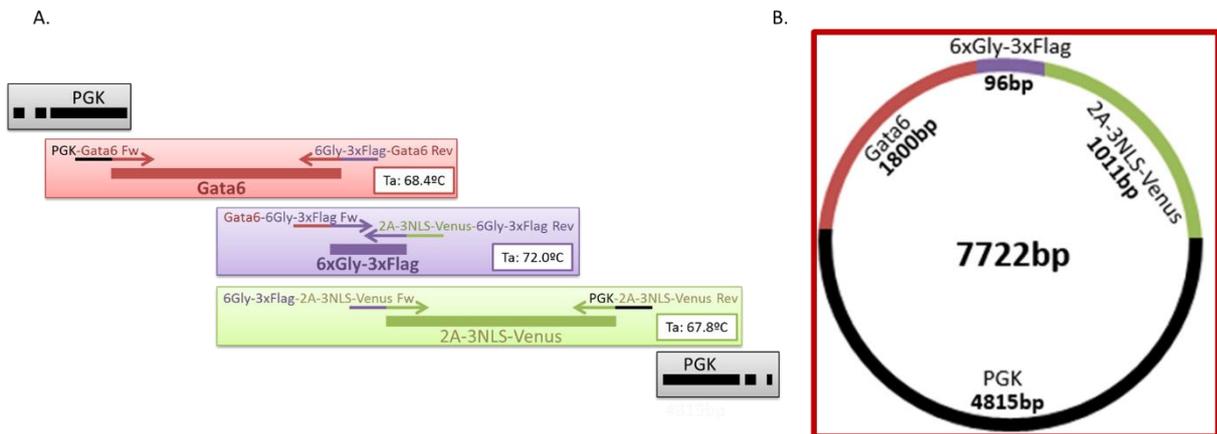


**Figure 54 : Représentation schématique du système inducible à la Doxycycline au sein des cellules ES-KH2**

(Modifiée de Aksoy et al 2013).

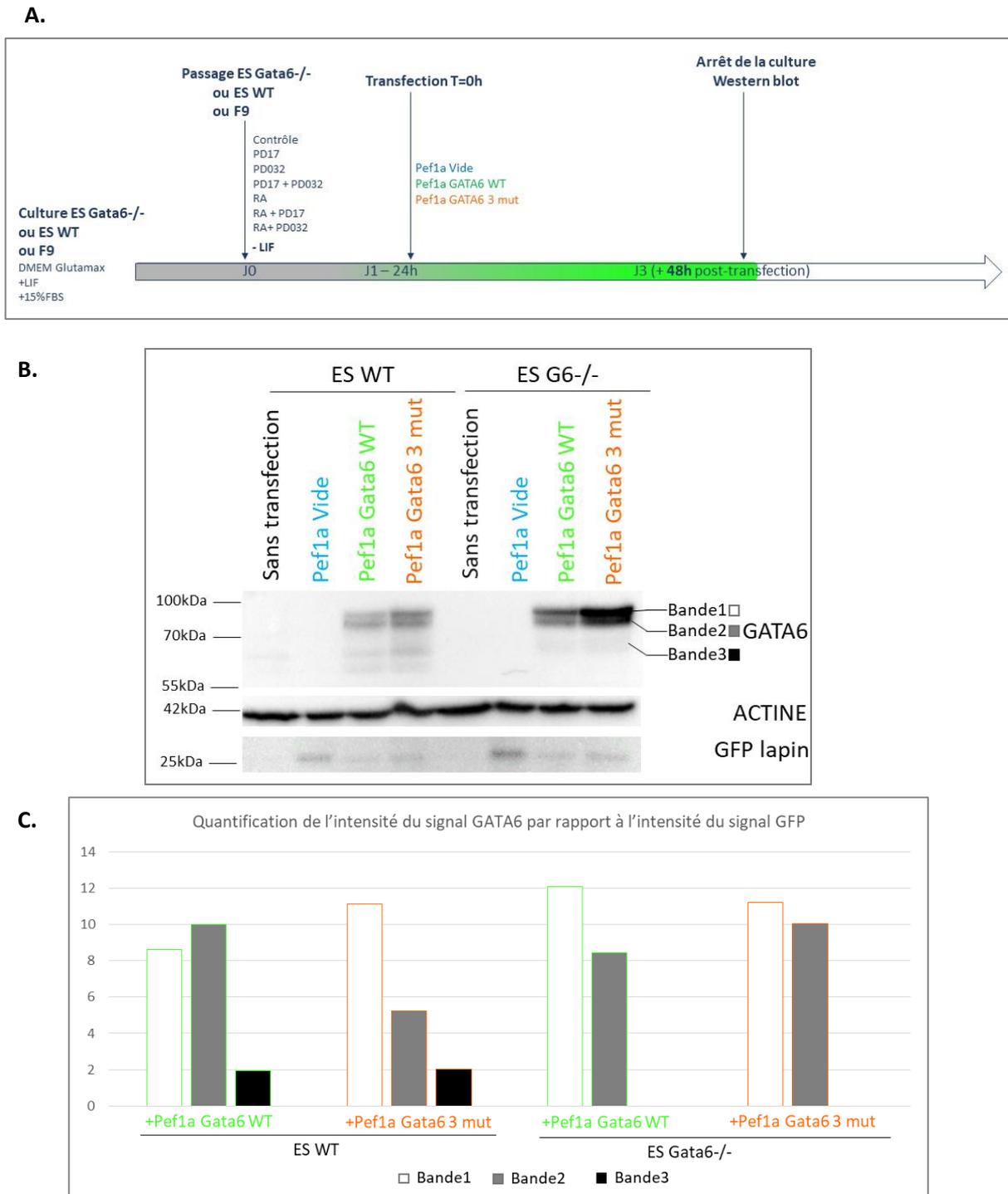
Au sein des cellules ES-KH2, le locus du *Collagène 1 $\alpha$* , *Col1A1*, a été modifié (A): une cassette FRT (Flipase Recognition Target) -PGKnéopA- FRT- hygromycine-pA (séquence de Poly-adénylation) a été insérée pour permettre l'insertion d'un gène d'intérêt, par recombinaison inter- et intra-chromosomique au niveau des sites FRT où la cassette PGKnéopA est perdue et remplacée par une région PGK-ATG. Ce remplacement permet de conférer aux cellules une résistance à l'hygromycine pour leur sélection. L'induction du gène d'intérêt inséré va se faire sous l'action de la Doxycycline *via* le système Tet-ON (schématisé en B.- Issue de <https://www.genoway.com/technologies/tet-system.htm>).

Cette activation passe par la production du transactivateur M2rtTA (triangle rouge) qui est sous la dépendance du promoteur endogène de ROSA26 dont l'expression est constitutive et ubiquitaire. Ce transactivateur lié à la Tétracycline (analogue de la Doxycycline) va aller se fixer sur la séquence Tet-ON. Ainsi, l'expression du gène d'intérêt est induite.



**Figure 55 : Représentation schématique des constructions PGK-*Gata6* exprimant les formes sauvages ou mutantes de *Gata6* sous la dépendance du promoteur PGK.**

- A. Représentation des différentes régions insérées au sein du plasmide PGK: en rouge, la région *Gata6* (sauvage ou mutée), en violet une séquence de 6 répétitions Glycine suivies de 3 répétitions Flag, afin de tagguer la séquence *Gata6*, en vert une séquence 2A- 3NLS- Venus, afin de visualiser via l’expression d’une GFP-*Venus*, l’expression de *Gata6* dans les cellules au niveau nucléaire de par les séquences NLS. Les primers utilisés et leur température d’anéaling ont aussi été représentés.
- B. Représentation circulaire du plasmide entier et taille des différentes régions insérées.



**Figure 56 : Analyse de l'expression protéique de GATA6 au sein des cellules sauvages ES WT et mutantes ES *Gata6*<sup>-/-</sup>**

- Stratégie expérimentale adoptée pour l'analyse protéique par Western Blot
- Western Blot de l'expression protéique de GATA6 en condition contrôle au sein des cellules sauvages ES WT et mutantes ES *Gata6*<sup>-/-</sup> après 48h de surexpression des constructions *Pef1a vide*, *Gata6 WT* et *Gata6 3mut*.
- Quantification de l'intensité du signal GATA6 obtenu pour chaque bande observée par rapport à l'intensité du signal GFP.

#### **IV Quel est l'état de phosphorylation de la protéine GATA6 en présence ou absence d'inhibiteurs de la signalisation RTK-FGF ?**

Puisque des résidus phosphorylables de GATA6 sont impliqués, j'ai réalisé différentes expériences de Western Blot afin de mettre en évidence son (ses) état(s) de phosphorylation.

##### **IV.A Différentes « formes » de GATA6 sont exprimées dans les cellules ES WT et *Gata6*<sup>-/-</sup>**

Les analyses de Western blot ont été effectuées après 48h de surexpression des formes *Gata6*<sup>WT</sup> ou *Gata6*<sup>3mut</sup> puisqu'ils ont été fait en parallèle des premières expériences d'immuno-marquages réalisés à 48h (**Figure 56A**).

Quel que soit le type cellulaire considéré, les conditions sans transfection ou en cellules transfectées avec le plasmide *Pef1a* vide, ne révèlent pas de bande pour GATA6 (**Figure 56B**). En effet, dans ces conditions, aucune protéine GATA6 exogène n'est apportée. Dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> et ES WT aucune protéine GATA6 endogène n'est exprimée et aucune induction/trans-différenciation n'est induite dans ces conditions. Par conséquent, aucune bande GATA6 n'est détectée.

Quelle que soit la forme de *Gata6* transfectée *Gata6*<sup>WT</sup> ou *Gata6*<sup>3mut</sup>, GATA6 est détectée sous plusieurs bandes. En effet, 3 ou 4 bandes, d'intensités variables, dans les cellules ES WT et ES *Gata6*<sup>-/-</sup> sont observées (**Figure 56B**). Certaines bandes du fait de leur trop faible intensité n'ont pu être quantifiées (**Figure 56CB**). Le patron de détection de ces différentes bandes est identique entre les formes *Gata6*<sup>WT</sup> et *Gata6*<sup>3mut</sup>, aucune différence dans les tailles des bandes n'est observée.

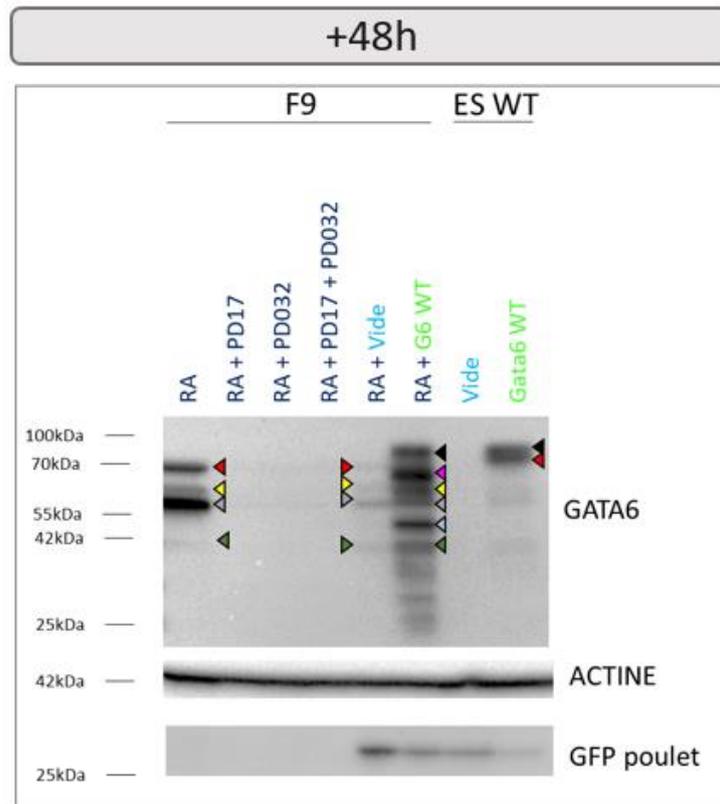
Ainsi, pour chaque condition et type cellulaire, les bandes 1 et 2 sont exprimées après surexpression des formes *Gata6*<sup>WT</sup> et *Gata6*<sup>3mut</sup>. Seules les bandes 2, 3 et 4 (*non quantifiées*) semblent varier fortement entre la forme *Gata6*<sup>WT</sup> et *Gata6*<sup>3mut</sup> avec une variation plus nette entre les cellules ES WT (diminution pour *Gata6*<sup>3mut</sup> comparée à la forme *Gata6*<sup>WT</sup>) et ES *Gata6*<sup>-/-</sup> (pas de changement). Les variations observées pourraient être dues à l'efficacité de transfection.

Trois expériences ont été réalisées et présentent le même résultat. Différentes tailles de GATA6 sont donc observées dans les cellules ES WT et ES *Gata6*<sup>-/-</sup>.

##### **IV.B La protéine GATA6 observée est de poids moléculaire plus élevé que celui attendu**

Les bandes observées ont un poids moléculaire d'environ 75 à 80 kDa (**Figure 56B**). Ce poids est supérieur d'environ 10 à 20kDa par rapport aux poids attendus chez la souris de 50kDa (GATA6 C(ourte)) et 59kDa (GATA6 L(ongue)).

Un autre modèle cellulaire a été utilisé, les cellules de carcinome embryonnaire F9, afin de mettre en évidence la ou les formes endogènes connues de GATA6. Les cellules F9 ont été traitées au RA en absence ou présence des traitements avec les inhibiteurs de la voie RTK-FGF, et l'expression protéique a été examinée après 48h en Western blot (**Figure 56A et 57**).



**Figure 57 : Comparaison de taille de la protéine GATA6 au sein des cellules sauvages ES WT et F9.** Western Blot de l'expression protéique de GATA6 en condition contrôle au sein des cellules sauvages F9 et ES WT après 48h de surexpression des constructions *Pef1a vide* et *Gata6 WT*.

On observe dans les cellules F9, 3 bandes majoritaires, dont une 4ème, plus basse et de très faible intensité, en condition de traitement au RA seul (RA, bandes avec symboles :  $\Delta \Delta \Delta \Delta$ ; **Figure 57**). Cette observation n'avait pas été faite précédemment puisque les seules données trouvées, dans les cellules F9, dans la littérature, ne montrent qu'une seule bande détectée pour GATA6. Cependant, on ne retrouve aucune indication de taille (Zhuang et al., 2003). Cette présence de GATA6 endogène en cellules F9 + RA est inhibée lorsqu'on ajoute à la culture, de manière concomitante au traitement RA, les inhibiteurs PD17 seul, PD032 seul ou les deux inhibiteurs combinés. Cela indique que l'inhibition de la signalisation RTK-FGF bloque l'action du RA pour induire l'expression de *Gata6*.

La transfection du plasmide *Pef1a vide* seul, ne permet pas de détecter de GATA6 dans les cellules ES WT. De plus, la transfection du plasmide *Pef1a Vide* additionnée au traitement RA (*Pef1a vide* + RA), nous permet d'observer l'induction des mêmes bandes observées ( $\Delta \Delta \Delta \Delta$ ) qu'en condition F9 + RA mais de plus faible d'intensité (**Figure 57**). Cela suggérerait un effet inhibiteur de la transfection sur l'induction de GATA6 endogène, ou une compétition répressive de la transfection et du traitement RA l'un envers l'autre. Le choc de la transfection pourrait aussi diminuer la transcription intracellulaire.

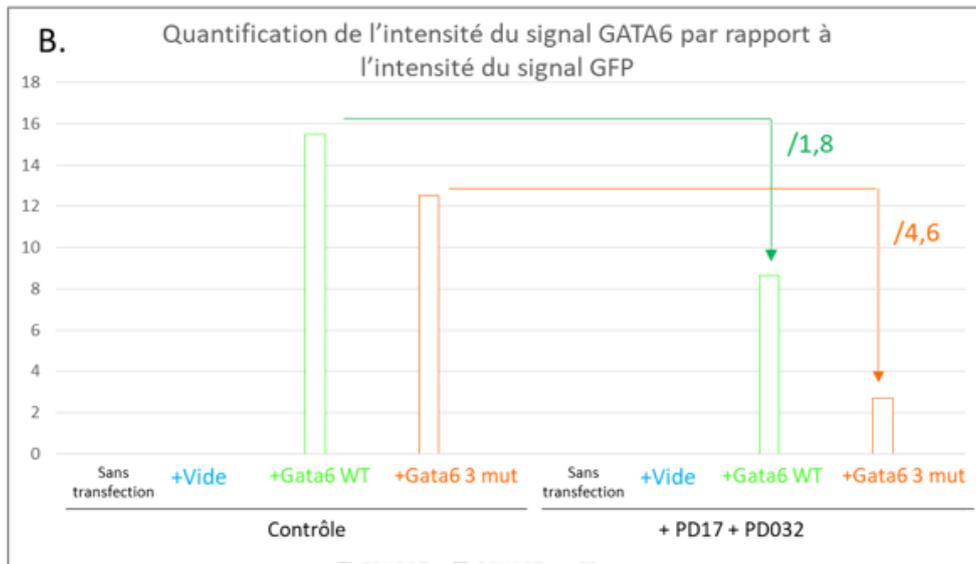
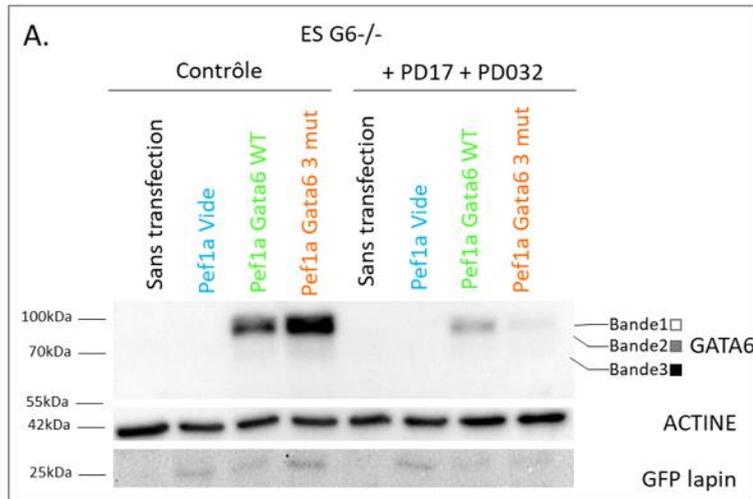
La bande de plus faible taille ( $\Delta$ ) obtenue, dans les cellules ES WT, après transfection de la forme *Gata6 WT*, correspond à la bande de plus haute taille obtenue après traitement au RA en cellules F9 (**Figure 57**). En revanche, lorsqu'on transfecte la forme sauvage *Gata6 WT* additionnée au traitement RA (*Gata6 WT* + RA), on observe une trainée de différentes bandes comprenant les bandes observées en condition de traitement RA seul ( $\Delta \Delta$ ), des bandes observées en condition de transfection en cellules ES WT ( $\Delta$ - **Figure 57**) et d'autres bandes ( $\Delta \Delta \Delta \Delta$ - **Figure 57**). Cela montre que les mêmes formes de GATA6 endogènes et exogènes sont produites *via* le RA d'une part et *via* la transfection d'autre part. D'autres formes de tailles plus basses sont aussi produites et pourraient représenter des formes dégradées de GATA6. Cela n'a pas été approfondi et méritera des expériences complémentaires.

La quantification de ces différentes bandes pour ces différentes conditions, montre la prévalence de certaines formes de GATA6 sur d'autres suivant le type d'expérience.

#### **IV.C La signalisation RTK-FGF joue un rôle dans le maintien de la protéine GATA6.**

Des traitements de double inhibition PD17 + PD032 ont été réalisés avant la surexpression, pendant 48h, des formes *Gata6 WT* ou *Gata6 3mut*, dans les cellules ES WT ou ES *Gata6*<sup>-/-</sup> afin de voir l'impact de la signalisation RTK-FGF sur GATA6. La même stratégie expérimentale a été adoptée (**Figure 56A**). En cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, on observe une forte diminution de la quantité totale de GATA6 à la fois en condition de surexpression de la forme *Gata6 WT* ou *Gata6 3mut* lorsque les cellules ont été

+48h



**Figure 58 :** Analyse de l'expression protéique de GATA6 au sein des cellules mutantes ES *Gata6*<sup>-/-</sup> avec ou sans traitement aux inhibiteurs PD17 + PD032, 48h de surexpression des constructions *Pef1a vide*, *Gata6 WT* et *Gata6 3mut*.

A. Western Blot

B. Quantification de l'intensité du signal GATA6 obtenu par rapport à l'intensité du signal GFP.

traitées, en 48h, avec les inhibiteurs PD17 + PD032 par rapport aux cellules non traitées (facteur 1,8 pour *Gata6* WT et facteur 4,6 pour *Gata6* 3mut – **Figure 58A et 58B**). Trois expériences du même type ont été réalisées et dans chacune, une diminution de l'intensité des bandes de GATA6 est constatée entre condition contrôle et condition traitée pour une même forme surexprimée de Gata6.

Concernant les cellules ES WT, le même constat de diminution de l'intensité des bandes GATA6 est établi entre condition contrôle et condition traitée pour une même forme surexprimée de Gata6 (**Figure ANNEXE 19A et 19B**). L'effet des inhibiteurs semble moins drastique sur cellules ES WT que sur cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> ; ce qui pourrait se justifier par la quantité plus importante de GATA6 (exogène + endogène) ce qui serait plus difficile à réduire lors de l'inhibition de la signalisation RTK-FGF.

Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que la signalisation RTK-FGF pourrait jouer un rôle dans le maintien de la protéine GATA6. Cependant, les inhibiteurs de cette voie ont été ajoutés avant la surexpression des formes de *Gata6* et de ce fait, il serait intéressant de comparer ces résultats à ceux obtenus lorsque la signalisation est inhibée une fois que *Gata6* est exprimé, ce qui est le cas dans l'embryon.

#### **IV.D La protéine GATA6 est détectée après 6h de transfection dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>**

J'ai réalisé une cinétique de l'expression protéique de GATA6. Ainsi, j'ai observé au microscope un début de production de la GFP après 6 à 7h de transfection. Par conséquent, un Western Blot a été réalisé suivant les conditions expérimentales détaillées en Figure 59A (**Figure 59A**).

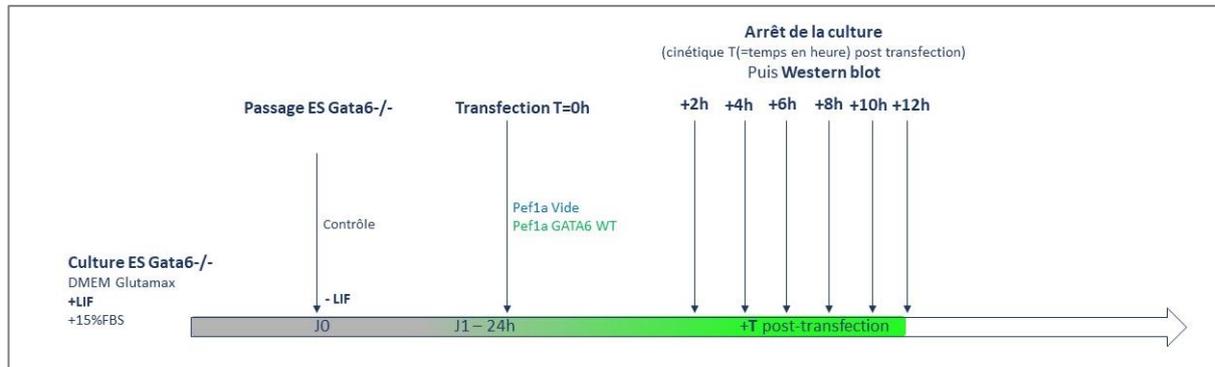
GATA6 est produite et détectable en Western Blot après 6h de transfection et sa quantité est maintenue après 8h, 10, et 12h de transfection (**Figure 59B**). Néanmoins, il est à noter que des problèmes de détection de la GFP sont apparus lors de ces expériences (**Figure 59B**). Ces soucis ont perduré dans les expériences suivantes et seront donc détaillé ci-après.

#### **IV.E La quantité de GATA6 dégradée est restaurée en condition MG132+ PD17 + PD032**

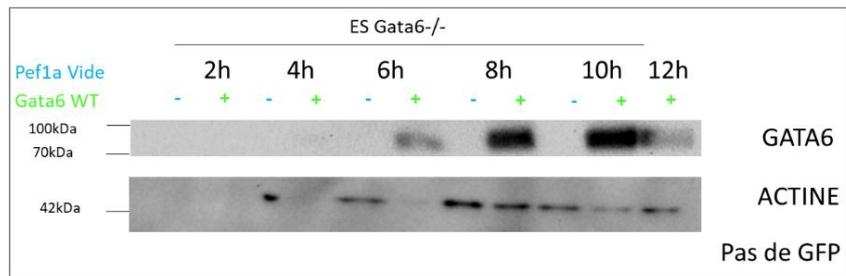
Afin d'analyser la potentielle dégradation de GATA6, le MG132, inhibiteur du protéasome a été administré. Tout d'abord, j'ai observé que le MG132 ne peut être utilisé plus de 4h du fait de la létalité cellulaire entraînée sur une durée plus longue (**Figure 60B**). Par la suite, j'ai réalisé le même type d'expérience en ajoutant le MG132 après 6h de transfection de la forme *Gata6* WT dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> traitées aux PD17 + PD032 ; Une cinétique de T=30min, 1h, 2h, 3h a été réalisée afin de voir si l'on restaurait la quantité de GATA6 produite (**Figure 61A**).

On confirme que la double inhibition PD17 + PD032 diminue la quantité totale de la protéine GATA6 (**Figure 61B**). De plus, l'ajout de MG132 permet d'augmenter, le long des 3h de traitement, la quantité de GATA6 (**Figure 61B**).

A.



B.



**Figure 59 : Cinétique d'expression de GATA6 après surexpression de *Gata6* WT dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>**

- Représentation de la stratégie expérimentale adoptée pour l'analyse protéique par Western Blot de la cinétique d'expression de GATA6 (T=0h à 12h) après surexpression de *Gata6* WT dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, en condition contrôle.
- Western blot

Concernant la GFP, nous avons eu des problèmes de détection de celle-ci malgré l'essai de 5 anticorps différents (**Figure 62A**). Dans les meilleurs détections, l'efficacité de détection reste faible (par exemple **Figure 56B, 57B et 58A**). Au sein du plasmide d'expression *Pef1a Gata6 WT* utilisé, les deux protéines, GATA6 et GFP, issues d'un même ARN du fait de la présence du peptide de clivage 2A, sont produites en même quantité. Ainsi, j'ai réalisé une gamme, afin de voir quelle est la quantité de protéine nécessaire pour visualiser la GFP (**Figure 62B**). En effet, je constate que lorsque je dépose 20µg de protéines totales, le signal GATA6 est très fort alors que le signal GFP l'est beaucoup moins, certainement dû à des différences de détection des anticorps. Au fil de la gamme, même si GATA6 est encore présent à 10µg, le signal GFP est presque indétectable. Ainsi, la quantité de 20µg de protéines totales extraites d'un échantillon regroupant des cellules transfectées GFP+ et des cellules non transfectées GFP-, constitue un seuil minimum. Dans ce cas, on observe que l'efficacité de reconnaissance des anticorps GFP est médiocre ce qui justifie la difficulté à obtenir un signal GFP correct et quantifiable.

#### **IV.F Expression de GATA6 dans les cellules triées GFP++.**

Afin de contourner ce problème de détection de la GFP, j'ai décidé de trier les cellules par cytométrie afin d'analyser l'expression de GATA6 au niveau protéique seulement dans les cellules exprimant la GFP à un niveau plus homogène. Le tri a été réalisé avec les mêmes réglages que ceux utilisés pour les expériences de RT-qPCR. De plus, les expériences ont été réalisées en parallèle des expériences de RT-qPCR et de ce fait, à ce moment-là, l'hétérogénéité des cellules au sein de la population **GFP++** intermédiaire n'était pas connue.

Ces expériences préliminaires ont été réalisées après 24h de transfection des *Gata6 WT* dans les cellules ES *Gata6-/-*. Une première expérience a montré que la quantité de protéines était trop faible (**Figure 63A** avant lyophilisation). J'ai donc décidé de concentrer mes échantillons de protéines restantes par lyophilisation. J'ai déposé ensuite la totalité des protéines lyophilisées, en concentration différente et inconnue, sur mon gel de Western Blot. Cette fois-ci, un signal concernant GATA6 est détecté dans la sous population **GFP++** (**Figure 63A** après lyophilisation). Néanmoins, aucune amélioration n'a été suffisamment importante pour détecter un signal GFP. Par conséquent, il est impossible d'analyser/quantifier ces résultats. De ce fait, il est nécessaire de reproduire cette expérience en combinant une augmentation du nombre de cellules par condition (**Figure 63B**) ainsi que la concentration des protéines par lyophilisation des échantillons. Je pourrai ainsi tester les différentes formes de GATA6 en les comparant à la forme sauvage *Gata6 WT* avec/sans traitement PD17, PD032 ou combiné avec/sans MG132 pour résoudre notre hypothèse de stabilité de GATA6 dans nos conditions expérimentales. D'autres expériences de Western Blot ont été réalisées en parallèle mais ne se sont pas révélées concluantes ou exploitables (**Figure ANNEXE 19 et 20**).

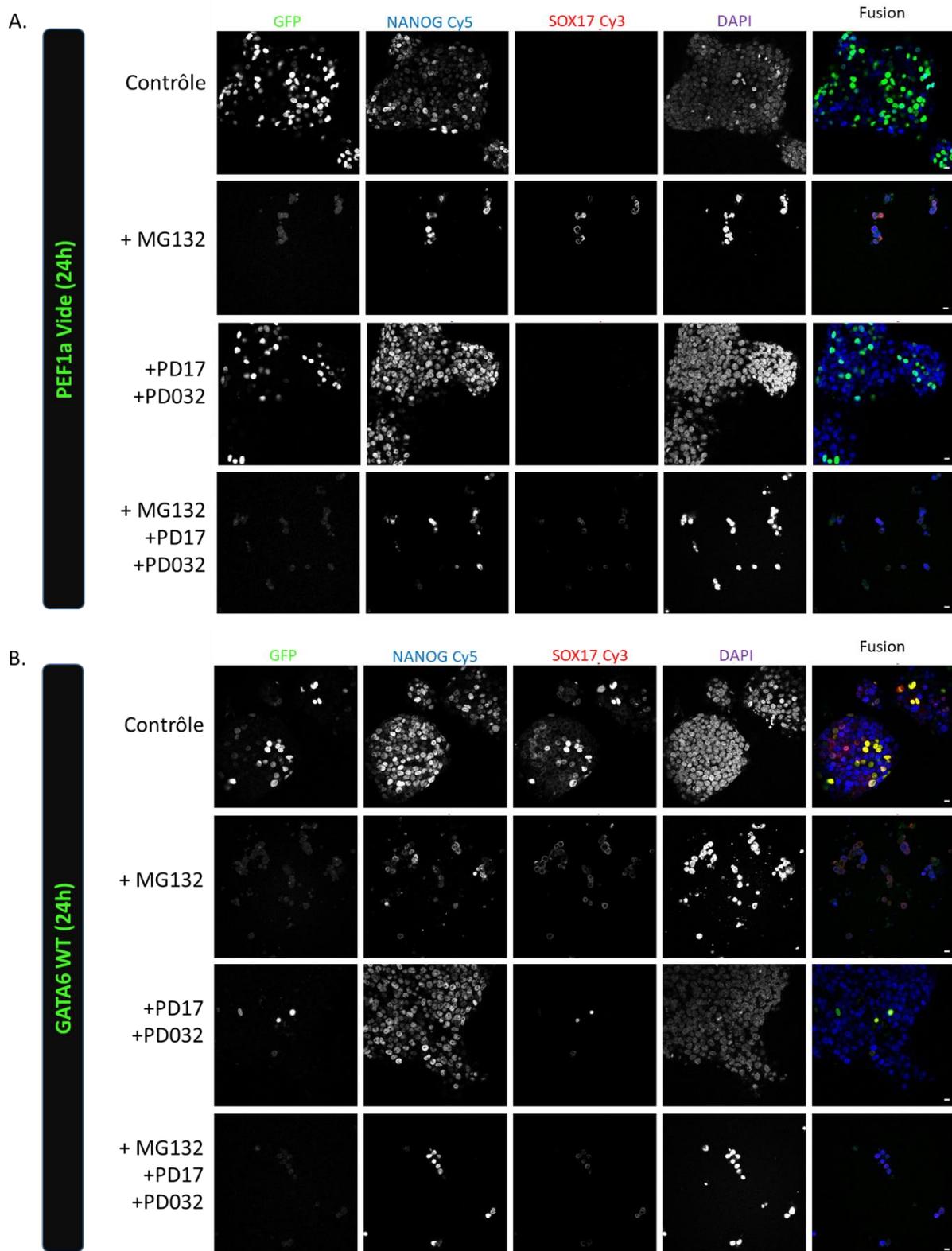


Figure 60 : Culture des ES *Gata6*<sup>-/-</sup> pendant 4h avec du MG132 après 24h de transfection

A. Transfection avec *Pef1 vide*

B. Transfection avec *Gata6 WT*

#### **IV.G Conclusion Générale**

Les expériences de Western blot ont permis de montrer que GATA6 est détectée sous différentes bandes (ou formes ?). En effet, au moins 3 bandes dans les cellules ES WT et ES *Gata6*<sup>-/-</sup> sont observées. La troisième bande pourrait correspondre à une forme endogène de GATA6, présente seulement dans les cellules ES WT et F9.

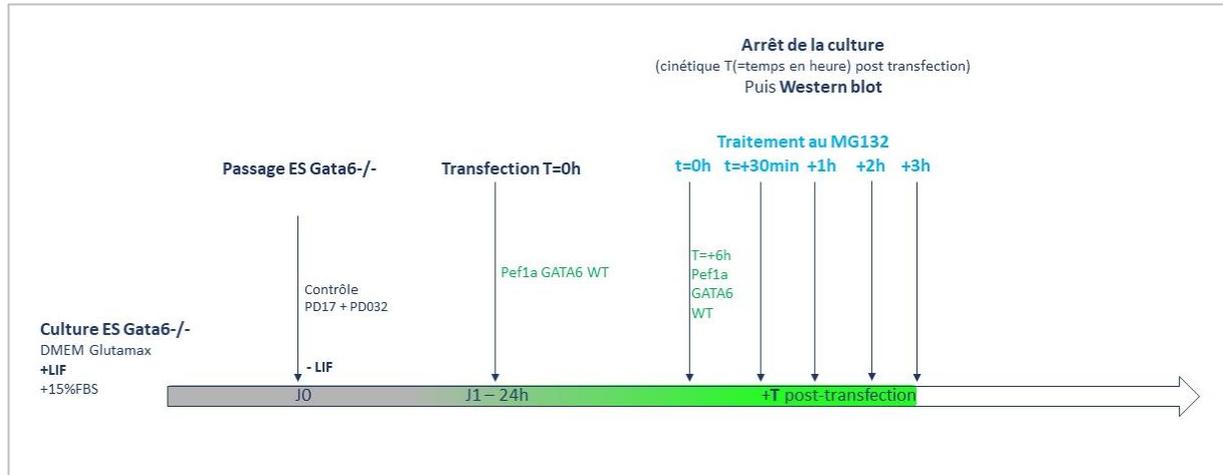
Cependant, on ne peut pour le moment pas conclure quant à l'état, modifié post-traductionnellement ou pas, des protéines GATA6 de ces bandes.

L'inhibition du FGFR + MEK dans la signalisation RTK-FGF, en cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, en 48h, révèle une forte diminution de la quantité totale de GATA6 à la fois en condition de surexpression de la forme *Gata6* WT ou *Gata6* 3mut. Cela suggère un rôle potentiel de la signalisation RTK-FGF dans la protection contre la dégradation de GATA6. Enfin, j'ai pu voir que l'ajout de MG132, inhibiteur du protéasome, permet de restaurer la quantité totale de GATA6 dégradée par les deux inhibiteurs PD17 + PD032.

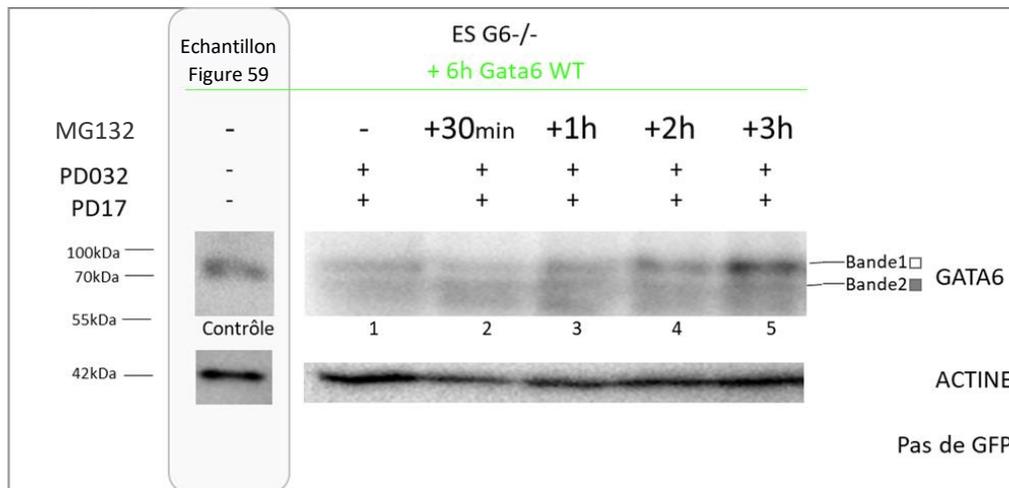
L'utilisation d'anticorps Pan-phosphorylation tels que les anticorps Pan-phospho (Ser/Thr) serait un bon moyen de voir la phosphorylation de la protéine. Cependant, il faudrait réaliser cela sur un extrait concentré de protéine GATA6, immunoprécipitée en amont pour éviter d'avoir un marquage sur l'ensemble de la membrane dû aux autres protéines phosphorylées si l'on fait migrer un échantillon de protéines totales. J'envisage aussi de regarder sur gel PhosphoTag (Bekešová et al., 2015; Kinoshita et al., 2009; Kinoshita-Kikuta et al., 2009; Messer et al., 2009) les bandes obtenues pour GATA6 soit dans les cellules F9 soit dans les cellules ES WT en le comparant à un gel bis-acrylamide classique afin de mettre en évidence par dissociation de bande et augmentation de l'écart en elles de possible bandes passées inaperçues. Si des différences sont mises en évidence entre les conditions traitées en absence ou présence d'inhibiteurs de la voie RTK-FGF seuls ou combinés, il en sera conclu que l'on est bien en présence de forme(s) phosphorylée(s) de GATA6 et que cette phosphorylation pourrait être directe par la voie RTK-FGF.

De plus, ayant émis l'hypothèse que la phosphorylation par la signalisation RTK-FGF permettrait de protéger GATA6 contre l'ubiquitination (Ub) et donc contre la dégradation, il serait aussi intéressant d'utiliser de la même manière un anticorps Pan-Ub sur échantillons de protéine GATA6 immuno-précipitée en présence ou non d'inhibiteurs de la signalisation RTK-FGF. Ainsi, dans le cas où la signalisation est active (condition contrôle), la phosphorylation pourrait avoir lieu. Si la phosphorylation empêche le dépôt de marques d'Ub, on n'aurait soit aucun marquage avec l'anticorps Pan-Ub soit un marquage moins important que dans la condition traitée avec inhibiteurs de la voie RTK-FGF.

**A.**



**B.**



**Figure 61 : Sauvetage de l'expression de GATA6 par inhibition du protéasome (MG132)**

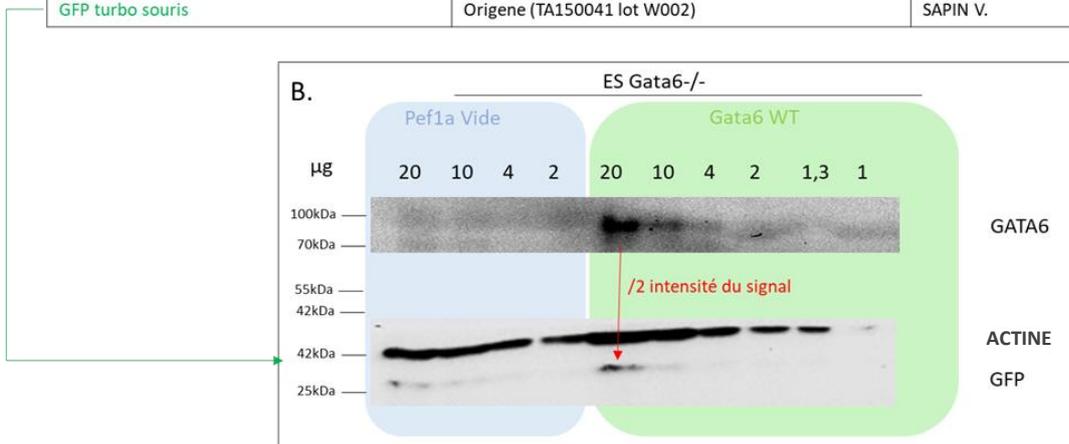
A. Stratégie expérimentale

B. Cinétique de sauvetage de l'expression de GATA6

+ 48h

A.

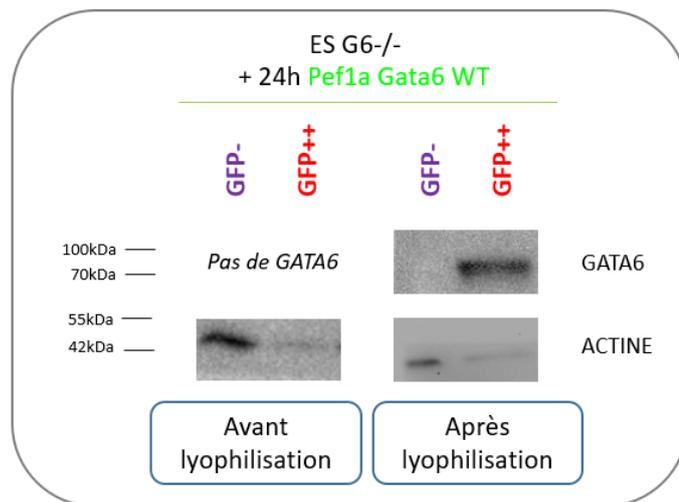
Nom	Référence	Don équipe
GFP lapin	Invitrogen molecular probes (lot: 743636 A11122)	CHAZAUD C.
GFP poulet	Abcam (ab13970)	CHAZAUD C.
GFP chèvre	Abcam (ab5450)	MIROUSE V.
GFP souris	Roche (ref: 11814460001)	DA INES O.
JL8 souris	Clontech (ref: 632381)	MIROUSE V.
GFP turbo souris	Origene (TA150041 lot W002)	SAPIN V.



**Figure 62 : Test des différents anticorps GFP en Western Blot**

- A. Tableau des anticorps testés en Western blot pour la détection de la GFP.
- B. Western blot pour test de concentrations graduelles de GATA6 et donc de GFP.

**A.**



**B.**

	Populations triées	Cellules triées		DOSAGE µg/µL	
		nombre	pourcentage GFP- et GFP+(%)		
24H	G6 WT ctrl	GFP-	138 351	84,30690294	16
		GFP++	25 753	15,69309706	

**Figure 63 : Expression de GATA6 au sein de la sous-population triée GFP++ au FACS Aria II**

A. Western blot après tri des cellules.

B. Nombre de cellules et pourcentage obtenus pour chaque sous-population après tri au cytomètre.

---

## Conclusion – Projet 1

---

Dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, le mécanisme d'initiation de l'induction des gènes cibles de GATA6, *Sox17* et *Gata4*, après surexpression de différentes formes de *Gata6*, est le même. Ce mécanisme repose sur le fait que l'initiation de l'expression de SOX17, en 24h, et de GATA4, en 48h, est dépendante de l'activation directe de GATA6 modulée par la signalisation RTK-FGF. Un décalage temporel est constaté dans l'initiation de l'expression de GATA4 par rapport à SOX17. En revanche, à 48h, l'expression de SOX17 semble être indépendante de l'état de GATA6 mais modulée seulement par la voie RTK-FGF. La phosphorylation directe des résidus de GATA6 ou d'un intermédiaire, cofacteur de GATA6, reste à investiguer. Ainsi, parmi les 2 hypothèses émises (**Figure 33**), l'hypothèse 1 serait favorisée : une action directe de la voie RTK-FGF pour l'activation de GATA6 lors de l'induction de ses gènes cibles.

De plus, en 24h, l'analyse de l'expression de SOX17 montre une induction par la branche MEK-ERK essentiellement et potentiellement sauvée par la branche PI3K-AKT. Le résidu S37 semble être ciblé par la compensation entre ces deux branches. De plus, j'ai observé que les résidus S34 et T509 sont nécessaires pour induire l'expression de ce gène cible avec une potentielle coopération entre résidus qui reste cependant à démontrer. Cependant, contrairement aux cellules CaCo2 (Adachi et al., 2008), mes résultats montrent que le site S264 ne semble pas être indispensable dans l'activation de *Gata6* pour l'expression de SOX17 mais pourrait moduler secondairement la sensibilité à la voie RTK-FGF en association ou non avec les autres résidus.

Au niveau transcriptionnel, j'ai constaté que la forme *Gata6 3mut* est moins efficace que la forme *Gata6 WT* pour l'induction de *Sox17* et *Gata4*. Cela suggère que l'état des résidus étudiés de GATA6 joue un rôle important au moment de l'induction de ces gènes. L'expression ARNm de *Sox17* reflète son expression protéique observée à 24h lorsque la forme *Gata6 WT* est surexprimée quelles que soient les conditions. Concernant l'expression de *Gata4*, les résultats obtenus au niveau ARNm à 24h confirment ceux obtenus à 48h quelle que soit la forme surexprimée de *Gata6* et les conditions de traitement. L'établissement de lignées stables se révèle indispensable pour approfondir ces expériences et outrepasser les variations observées entre les réplicats.

Au niveau protéique, les expériences de Western blot ont permis de montrer que GATA6 est détectée sous différentes bandes (ou formes ?), au moins 3 en cellules ES WT et ES *Gata6*<sup>-/-</sup>. Cependant, on ne peut pour le moment pas conclure quant à l'état, modifié post-traductionnellement ou pas, des protéines GATA6 correspondant à ces bandes. La diminution de la quantité totale de GATA6 après traitement aux inhibiteurs dirigés contre FGFR + MEK, en cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, en 48h, suggère un rôle potentiel de la signalisation RTK-FGF dans la protection contre la dégradation de GATA6. Cela a été confirmé par l'ajout de MG132, inhibiteur du protéasome, qui augmente la quantité de GATA6.



---

## *Discussion et Perspectives – Projet 1*

---

Au sein de l'embryon, il a été montré qu'il est nécessaire d'exprimer GATA6 et que la signalisation RTK-FGF soit active pour induire la différenciation et la maturation de l'EPr (Bessonard et al., 2014; Frankenberg et al., 2011). Ainsi, mon premier projet de doctorat a été d'étudier de quelle manière s'effectue la coopération du facteur de transcription GATA6 et de la signalisation RTK-FGF.

L'analyse *in silico* de GATA6 a révélé 4 sites potentiels de phosphorylation par la voie RTK-FGF : S34, S37, S264 et T509. J'ai ainsi analysé l'expression des protéines SOX17 et GATA4, par immunomarquages, après surexpression de différentes formes mutées ou non sur les résidus d'intérêts.

### **I Les branches MEK-ERK et PI3K-AKT se compensent pour la trans-différenciation des cellules ES en EPr**

Après 24h de surexpression de **Gata6 WT** dans les cellules mutantes, nous avons remarqué que lorsque les branches MEK-ERK et PI3K-AKT sont inhibées ensemble (LY + PD032), l'induction au niveau protéique SOX17 est réduite au même niveau que celle obtenue en condition de double inhibition PD17 + PD032. En revanche, lorsque ces branches sont inhibées indépendamment l'une de l'autre, SOX17 est induit de manière similaire à l'induction obtenue en condition contrôle au sein des cellules transfectées (**Figure 43A**). Cela montre qu'une compensation s'opère entre ces deux branches. Néanmoins, même si la branche MEK-ERK est considérée dans la littérature comme la branche principale, aucune donnée n'est à ce jour connue sur la primauté d'une de ces deux branches sur l'autre *in vivo*.

L'induction de SOX17 obtenue avec **Gata6 4mut** en condition d'inhibition de la branche MEK-ERK ou PI3K-AKT indépendamment l'une de l'autre est similaire à celle observée en condition contrôle avec la forme **Gata6 WT** (**Figure 43A et 43C**), ce qui suggère que l'induction de la voie RTK-FGF pourrait être soit indépendante de la branche MEK-ERK lorsque celle-ci est inhibée renforçant l'hypothèse de compensation des branches MEK-ERK et PI3K-AKT, soit dépendante de la branche MEK-ERK lorsque celle-ci est active, la rendant prioritaire dans ce contexte.

La forme **Gata6 3mut** montre un effet intermédiaire sur l'induction de l'expression de SOX17 et GATA4 observé en immunomarquage (**Figure 43D, 46**). Cet effet est confirmé au niveau ARNm pour *Sox17* ainsi que de nombreux marqueurs d'EPr (**Figure 47, 48, 49**). La surexpression de la forme **Gata6 3mut** montre une certaine résistance aux inhibiteurs PD17 et/ou PD032 avec une sensibilité pour le LY suggérant une sensibilité à la branche PI3K-AKT. Avec la forme **Gata6 WT**, le LY seul n'a pas d'effet. Ainsi, muter les résidus S34, T509 et S264 révèle une sensibilité au LY. La différence entre les formes



*Gata6* 3mut et *Gata6* 4mut est la mutation du résidu S37 qui serait alors le résidu permettant la sensibilité. En effet, lorsque la sérine 37 est mutée, seule l'inhibition au PD032 arrive à diminuer l'expression de SOX17 comme dans les expériences avec la forme *Gata6* WT + PD032+ LY. L'ensemble de ces résultats montrent qu'un sauvetage par la branche PI3K-AKT peut être effectué ciblant la sérine 37 si la voie MEK-ERK est inhibée. L'activité PI3K sur ce résidu a été montrée dans un autre contexte cellulaire HT29 (Chitforoushzadeh et al., 2016).

Il sera nécessaire de poursuivre ces expériences de double inhibition (LY + PD032) en surexprimant les formes mutées sur résidus uniques *Gata6* S34A, *Gata6* S37A et *Gata6* T509A afin de confirmer l'importance du résidu S37 lors de cette compensation. De plus, la réalisation de formes mutantes phosphomimétiques sur résidu seul ou combinés, en surexpression ou idéalement en lignées stables, nous permettrait de discriminer nos hypothèses.

## II Coopération de plusieurs résidus dans l'interaction GATA6/RTK-FGF

L'inactivation de la sérine S264, considérée comme le site actif d'activation de GATA6 en cellules CaCo2 (Adachi et al., 2008), montre que ce résidu n'est pas un site majeur de GATA6 pour l'induction, en cellules ES murines, de l'expression des gènes exprimés dans l'EPr. En effet, une légère différence a été constatée, à 24h, entre la surexpression de la forme *Gata6* S264A comparée à la forme *Gata6* WT (**Figure 43B**). Néanmoins, au vu des résultats obtenus en 48h avec les formes *Gata6* S264A et *Gata6* S264D, à la fois sur l'expression de SOX17 et de GATA4, la sérine S264 pourrait avoir un rôle modulateur mineur.

L'inactivation combinée de l'ensemble des résidus dans la forme *Gata6* 4mut montre une diminution de l'expression de SOX17 en condition contrôle. Cette diminution est similaire à celle observée avec la forme *Gata6* WT en présence des inhibiteurs et il n'y a aucune diminution supplémentaire lorsque la forme *Gata6* 4mut est traitée avec PD17 + PD032 ou avec LY + PD032 (**Figure 43C**). Ce résultat suggère que la forme *Gata6* 4mut récapitule l'effet des PD17 + PD032. Cela montre que l'inactivation des 4 résidus ciblés réduit l'activité de GATA6 pour l'induction de Sox17. Les quatre résidus S34, S37, S264 et T509 sont donc importants soit directement soit indirectement pour la médiation de l'activité RTK-FGF. L'inactivation séparée des 4 sites potentiels de phosphorylation S34, S37, S264 et T509 montre que les deux résidus S34 et T509 sont nécessaires. Il faut que les deux résidus soient intacts, potentiellement phosphorylables, pour induire une expression de SOX17 plus forte que l'expression « basale » due à la seule expression ectopique de *Gata6*. En effet, une seule mutation réussit à réprimer la capacité de GATA6 à induire l'expression de SOX17.

L'ensemble des résultats montrent qu'une coopération existe entre les résidus S34 et T509, avec un effet de « protecteur » de la compensation entre les branches MEK-ERK et PI3K-AKT médié par le résidu S37.



GATA6 présente un nombre important de résidus potentiellement phosphorylables (**Figure 30 et 35**). Dans le cas où plusieurs sites sont impliqués et s'ils sont nécessaires et suffisants, ils pourraient agir de concert en étant soit phosphorylés ensemble comme il a été mis en évidence pour la protéine ELK1, phosphorylée sur différents sites par ERK (Mylona et al., 2016). Ainsi, en prenant pour exemple la même mécanistique que celle observée sur la protéine ELK1, les différents résidus d'intérêts de GATA6 pourraient aussi être phosphorylés de manière séquentielle sur des périodes de temps plus ou moins longues afin de produire un relai entre les sites pour moduler l'activité de GATA6. Seule une étude en spectrométrie de masse à différents temps lors de la trans-différenciation des cellules ES en EPr permettrait de voir une telle dynamique. Cette étude pourrait aussi être effectuée dans les différentes conditions de transfection et de traitements.

Enfin, les modifications post-traductionnelles, dont la phosphorylation, engendrent des modifications de conformations des protéines. Dans notre cas, il pourrait être envisagé qu'une modification de la conformation suite à la phosphorylation, par la voie RTK-FGF, d'un ou plusieurs de ces résidus de GATA6 permettrait le rapprochement des extrémités N- (contenant les résidus S34 et S37) et C-terminales (contenant le résidu T509) de la protéine et donc une interaction serait possible. Alternativement, ces résidus sont possiblement des points de liaisons avec d'autres co-facteurs. Des expériences de cristallographie pourraient nous permettre d'observer la conformation de GATA6 en absence ou présence d'inhibiteurs de la voie RTK-FGF.

### III Quel(s) récepteur(s) sont impliqués ?

L'inhibition de la voie RTK-FGF, au niveau récepteur, a été réalisée avec le PD17 pour les récepteurs FGFR. Cependant, l'inhibiteur PD17 n'est pas spécifique d'un seul récepteur FGFR, et la transduction du signal induit par le FGF peut passer soit (i) par le FGFR1 exprimé en cellules ES indifférenciées, dont l'implication est renforcée par les études récentes de *Kang et al* et *Molotkov et al* réalisées en embryon (Kang et al., 2017; Molotkov et al., 2017) soit (ii) par les FGFR2 et FGFR3. Néanmoins, ces deux récepteurs FGFR2 et FGFR3 sont trouvés exprimés en cellules ES lors de leur différenciation et s'ils sont exprimés, il faudrait aussi qu'ils soient fonctionnels. Cela reste à démontrer.

Ainsi, afin de déterminer quel récepteur est impliqué, il serait envisageable de réaliser des expériences d'immuno-marquages ou de quantification par RT-qPCR de ces récepteurs dans les différentes conditions de surexpression des formes de GATA6 et d'inhibition de la signalisation RTK-FGF/MEK-ERK et PI3K-AKT au cours de la trans-différenciation des cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>.

Néanmoins, une autre hypothèse peut être envisagée : une autre partie de la voie RTK pourrait être impliquée, engageant d'autres récepteurs et un autre signal que le FGF, et pourrait permettre cette induction dite « basale » de l'expression de SOX17, observée en condition de surexpression de la forme *Gata6*<sup>WT</sup> avec traitement de double inhibition PD17 + PD032 ou d'inhibition PD17 seul.



En effet, d'autres protéines telles que le PDGFR $\alpha$  peuvent phosphoryler GATA6. Cependant, le PDGFR $\alpha$  n'est pas exprimé dans les cellules ES indifférenciées mais seulement au cours de leur différenciation en ExEn après expression ectopique de *Gata6*, *Gata4* ou encore lors de traitement à l'acide rétinoïque (Artus et al., 2010). De plus, le récepteur c-KIT, aussi exprimé au sein de l'EPr et des cellules XEN (Brown et al., 2010b, 2010a; Kunath et al., 2005), pourrait activer la voie RTK-FGF, même s'il a été montré comme n'étant pas requis pour l'établissement et le maintien des cellules XEN (Artus et al., 2010). D'autres traitements comme le Gleevec dirigé contre les protéines PDGFR et c-KIT pourraient être utilisés afin de compléter nos résultats.

#### **IV GATA6 est présente sous différentes « formes » protéiques au sein des cellules ES**

Les expériences de Western Blot ont permis de montrer que cette protéine est présente avec des tailles diverses en proportions différentes suivant les types cellulaires et les expériences effectuées. Cela a été montré sur la protéine GATA6 humaine dans l'étude de *Chitforoushadeh et al*, étude dans laquelle la protéine est retrouvée entre les tailles de 55 à 80 kDa (Chitforoushzadeh et al., 2016).

Les bandes observées, lors de mes travaux, ont une taille d'environ 75 à 80 kDa, en cellules ES (**Figure 56**). Ces tailles de protéine GATA6 sont supérieures d'environ 10 à 20kDa par rapport à la taille attendue de la protéine GATA6 souris (50 kDa (GATA6<sub>S</sub>) et 59kDa (GATA6<sub>L</sub>)). De plus, j'ai confirmé, en cellules F9 traitées au RA, que les bandes observées en Western blot correspondent bien à des protéines GATA6 sous différentes formes pour le moment indéterminées (**Figure 57**). Les traitements effectués sur cellules F9 en combinant RA et inhibiteurs des RTK montrent que GATA6 n'est pas exprimée (**Figure 57**) et par conséquent, montre une inhibition de l'action du RA par l'inhibition de la voie RTK. Cela sous-entendrait soit que l'action du RA passerait par la signalisation RTK-FGF soit qu'ils agissent en parallèle et que la voie RTK-FGF est nécessaire.

D'autres formes de tailles plus basses sont aussi produites et pourraient représenter des formes dégradées de GATA6 (**Figure 57**). Cela pourrait être approfondi en traitant les cellules F9 + *Gata6* WT + RA au MG132, inhibiteur du protéasome pour bloquer la dégradation protéique. Ainsi, s'il s'agit de forme(s) dégradée(s) destinée(s) à être détruite(s), ces formes seraient alors accumulée(s) lors du traitement MG132. S'il s'agit de formes dégradées libérées, ces formes ne seraient alors pas relarguées lors du traitement MG132.



## V La signalisation RTK-FGF, via une potentielle phosphorylation, protégerait GATA6 d'une dégradation

En réalisant des Western Blot en condition contrôle et de traitement avec la double inhibition PD17 + PD032, j'ai constaté que cette inhibition diminuait la quantité totale de protéine GATA6. De plus, j'ai observé une restauration de la quantité totale de Gata6 dégradée par les deux inhibiteurs en traitant conjointement au MG132. Ainsi, la signalisation RTK-FGF préviendrait la dégradation de GATA6 et permettrait son maintien.

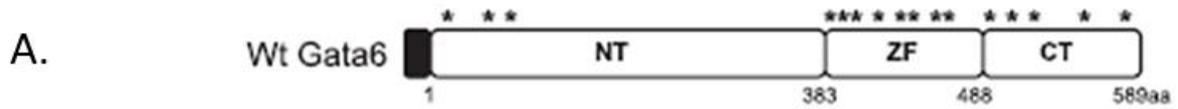
Ces observations ont été faites avec les formes *Gata6* WT et de manière plus importante avec la forme *Gata6 3mut* suggérant que cette dernière soit plus sujette à dégradation lorsque la voie RTK-FGF est inhibée. En effet, les résultats obtenus en immuno-marquage des cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>, avec surexpression de la forme *Gata6 3mut* et avec traitement PD17 + PD032, montrent que celle-ci est moins apte à induire les gènes de différenciation (**Figure 46, 47, 48, 49**). Les résultats obtenus avec SOX17 témoigneraient d'une expression induite rapide de SOX17 en 24h puis maintenue en 48h, qui pourraient être moins influencée par la stabilité et la dégradation de GATA6. Par conséquent, la forme *Gata6 3mut* correspond peut être à une forme qui met en évidence une sensibilité accrue pour la branche PI3K, par rapport à la physiologie normale que l'on retrouve au sein des cellules.

L'hypothèse émise pour expliquer ce mécanisme de protection de la voie RTK-FGF sur GATA6 est que la phosphorylation de GATA6, par la voie RTK-FGF, pourrait empêcher le dépôt de marques d'ubiquitination, soit de manière directe sur les mêmes sites que ceux étudiés, en masquant les sites d'ubiquitination, soit de manière indirecte par encombrement stérique. De plus, un co-facteur pourrait aussi être impliqué et être ciblé ou non par la voie RTK-FGF.

Une phosphorylation directe de GATA6 pourrait aussi engendrer une modification de la conformation en créant des repliements qui pourraient masquer les sites d'ubiquitination et donc stabiliserait GATA6. Cette modification de conformation pourrait être à l'origine d'un rapprochement des sites S34, S37 en position N-terminale et T509 en position C-terminale et de leur coopération potentielle. Pour le moment, nos expériences ne nous permettent pas de conclure quant au mécanisme contrôlant la stabilité et la dégradation de GATA6.

Une analyse *in silico*, des sites d'ubiquitination potentiels de GATA6 montrent que ceux-ci ne coïncident pas avec les sites potentiels de phosphorylation (**Figure 64**) suggérant qu'un mécanisme indirect est privilégié. Cependant, l'étude de *Chitfroushadeh et al* révèle que le site S37 est situé dans une séquence PEST, correspondant à une séquence de dégradation. Cela suggère un mécanisme direct reliant le résidu S37 et la dégradation de GATA6 (Chitfroushzadeh et al., 2016).

L'hypothèse du maintien de la protéine est renforcée par les résultats d'expression des gènes cibles. En effet, dans l'ensemble des contextes expérimentaux, par immunomarquage, l'expression de SOX17, n'est cependant pas proche du zéro obtenu en plasmide *Pef1a* vide. Ainsi, l'expression de



B. Séquence GATA6

```

MALTDGGWCLPFRFGAAAADAGDSGPPFPAREPSSPLSPISSSSSSCSRGGDRGPGCASNCRTIPQLDAEAVAGPPGRSLLL
SPYASHFFAAAHGAAAPGVAGPGSALSTWEDLLLFTDLDQAATASLLWSSRGAWLSFFAAEQPEEMYQTLLAALSQQCPA
AYDGAPCGFVHSAARAAAAAASPVYVPTTRVGSMLSGLPYLQAGSGPSNHAGGAGAPGWSQASADSPPYGGGGAA
GGCAACGGGAGSATAHASARFPYSPSPFMANGAARDPGGVVAAGGTGAGSVSGGGSLAAMGGRHCVSLSAARPLNGT
YHHHHHHPTYSPYMAAPLTPAWPAGPFETFVLHSLQGRAGAPLFPVPRGPTDLDLSESRVCVNCGSIQTPLRDRDGT
GHYLCNACGLYSMMNGLSRPLKPKHVRVPSRRLLGLSCANCHTTTTLWRRNAEGEPVCNACGLYMLHGVPRLAMKIE
GIQTRRNFNINIKSACSCNSSGVMPTFTSSSSNSDDCTHNTSPSTQATTSGVGSVMSAVGENANPENSCLKYSGGD
GLYIGVLSLSSPAEVTSSVRQDSWALALA
  
```

Sites potentiels

Output:

Residue	Score	Ubiquitinated
12	0.49	No
126	0.56	No
135	0.63	Yes <i>Low confidence</i>
413	0.45	No
423	0.25	No
426	0.22	No
467	0.27	No
478	0.29	No
479	0.30	No
486	0.11	No
488	0.13	No
490	0.15	No
494	0.21	No
496	0.26	No
522	0.82	Yes <i>Medium confidence</i>
555	0.66	Yes <i>Low confidence</i>

Legend:

Label	Score range	Sensitivity	Specificity
<i>Low confidence</i>	0.62 ≤ s ≤ 0.69	0.464	0.903
<i>Medium confidence</i>	0.69 ≤ s ≤ 0.84	0.346	0.950
<i>High confidence</i>	0.84 ≤ s ≤ 1.00	0.197	0.989

**Figure 64 : Sites potentiels d'ubiquitination de GATA6 souris**

- Représentation schématique des résidus (indiqués par un astérisque) potentiellement ubiquitinés (Lavial et al 2012)
- Prédiction des sites d'ubiquitination par analyse sur le site internet <http://www.ubpred.org>.

SOX17 est induite mais réduite à un niveau faible « basal » signifiant que la seule expression ectopique de Gata6 permet l'induction des gènes cibles et ce en présence d'une signalisation RTK-FGF active ou non. L'induction d'expression observée pourrait dépendre de la quantité de GATA6 présente correspondant à sa production + ratio maintien/dégradation.

*Schroter et al* montrent que des doses croissantes de GATA4 ou GATA6 produisent le même effet d'induction croissante des gènes cibles de l'EPr (Schröter et al., 2015). De plus, dans cette même étude, l'utilisation de l'inhibiteur PD032 impose une plus grande production de GATA4 pour induire une même expression des gènes cibles de l'EPr. Cela pose la question de savoir s'il s'agit d'un maintien de GATA4 ou si cela dépend du niveau de GATA6 induit. Dans ces expériences, on remarque que lorsque les cellules sont induites, GATA6 est exprimé au même niveau entre les cellules traitées ou non traitées avec du PD032 ce qui suggère un effet seuil ON/OFF de GATA6 (Schröter et al., 2015). Cela suggère que la quantité de GATA6 produite serait déterminante et serait potentiellement modulée par la voie RTK-FGF jusqu'à un certain seuil.

Néanmoins, si l'hypothèse de la protection contre la dégradation par la voie RTK-FGF en faveur du maintien de GATA6 n'est pas confirmée, d'autres investigations seront à envisager, notamment concernant la capacité de GATA6 à se fixer sur l'ADN.

Les lignées stables produites pourront nous permettre d'investiguer cela, sur le long terme, en réalisant des expériences de CHIP afin d'observer l'impact de l'inactivation de certains résidus de GATA6, et donc sa potentielle phosphorylation, sur sa fixation à l'ADN. L'équipe d'A. *Martinez-Arias* (Schröter et al., 2015) a analysé par CHIP la fixation de GATA4, sur ces gènes cibles lorsqu'il est induit ectopiquement en cellules ES. Les traitements avec l'inhibiteur PD032 ne semblent pas modifier les capacités de liaison, suggérant que GATA4 n'est pas phosphorylé ou que la phosphorylation n'est pas nécessaire à sa fixation sur l'ADN (*C. Schroter, communication personnelle*). Cependant, mes résultats mettent en évidence une compensation des branches MEK-ERK et PI3K-AKT, suggérant que dans leurs expériences la branche PI3K-AKT a potentiellement sauvé l'effet inhibiteur de l'absence d'activation de MEK-ERK. De plus, l'activité transcriptionnelle de GATA4 pourrait être modulée, via un co-facteur potentiel, indépendamment de la fixation à l'ADN. Il pourrait s'agir du même mécanisme pour GATA6. Enfin, dans ces résultats préliminaires, seule la fixation de GATA4 sur GATA6 et sur GATA4 lui-même a été observée et non la fixation sur d'autres gènes cibles connus pour avoir besoin pour leur expression des facteurs GATA et de la signalisation RTK-FGF.



## **VI Interaction de GATA6 avec un co-facteur ?**

Une étude montre que GATA6 est dégradée par le protéasome et que cette dégradation est empêchée par l'interaction de GATA6 avec un cofacteur BMI1 (Lavial et al., 2012). Cette interaction implique des sites d'ubiquitination de GATA6 en partie C-terminale, région d'interaction avec BMI1 et joue le rôle de masquage de ces sites (Lavial et al., 2012). Ainsi, BMI1 serait un candidat à fort potentiel. Il serait donc intéressant de tester son interaction directe avec GATA6 par Immunoprécipitation ou, *via* la technique de « Proximity Ligation Assay » (PLA).

Ainsi, il serait très intéressant d'observer cette interaction et de voir si elle est modulée lorsque GATA6 est inactivée, ou non, sur certains sites de phosphorylation en présence ou non d'inhibiteurs de la voie RTK-FGF. L'observation en Western blot de BMI1 est aussi envisagée si l'interaction est confirmée afin de voir si la signalisation pourrait phosphoryler ce dernier et moduler indirectement l'activité ou la stabilité de GATA6.

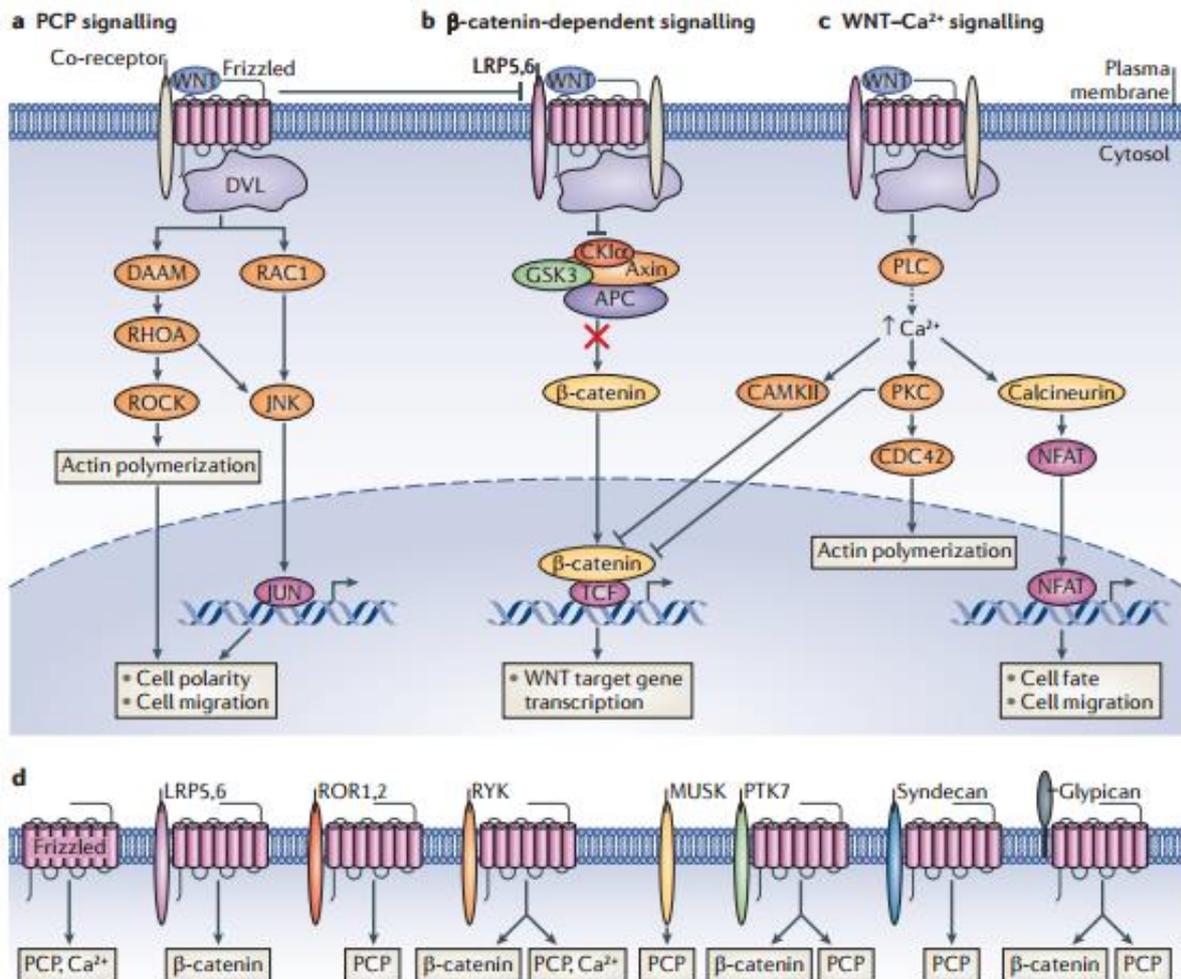
Enfin, des expériences de co-immuno-précipitations pourront être effectuées à la fois en ciblant GATA6 puis en ciblant BMI1 afin de confirmer cette potentielle interaction.



---

*Projet 2 : Rôle(s) des facteurs Dickkopf (Dkk1) et  
Noggin au cours de la maturation de l'EPr et de la  
formation de ses dérivés.*

---



**Figure 65 : Schéma simplifié des 3 branches activées de la signalisation WNT**

(Issu de la revue Nierhs, 2012)

- La **voie PCP** joue un rôle dans les processus de polarité et de migration cellulaire via l'activation de petites protéines GTPases RHOA et RAC1 qui activent la protéine kinase RHO (ROCK) et la protéine c-JNK. La principale cible de la voie est l'actine au travers de sa polymérisation ainsi que les microtubules et leur stabilisation.
- La principale branche de la voie est la **voie canonique dépendante de la β-caténine**. En condition contrôle stable, la β-CATENINE est phosphorylée par la protéine GSK3 qui fait partie du complexe de dégradation avec les protéines AXINE, APC (adénomatosis polyposis coli) et la Kinase Caséine Ia (CK1a). Ainsi la β-CATENINE est dégradée via le protéasome. Cependant, l'activation du récepteur faisant suite à la fixation d'un ligand WNT, entraîne un recrutement du complexe de dégradation et son inactivation. Par conséquent, l'activation de la voie engendre l'accumulation de la β-CATENINE dans le cytoplasme ainsi que sa translocation dans le noyau ce qui permet la transcription de gènes cibles de la voie WNT sous le contrôle d'éléments régulateurs TCF (« T cell factor »)
- La **branche calcique de la voie WNT** permet l'activation de la protéine CAMKII (calmodulin-dependent kinase II), la protéine kinase C (PKC) et la calcineurine. Ainsi, l'activation de ses protéines suite à une augmentation du calcium intracellulaire qui va signaler au travers de la protéine PLC, engendre l'inhibition de la β-caténine, la polymérisation de l'actine et la translocation de la NFAT (« facteur nucléaire des lymphocytes T activés ») pour la transcription de gènes cibles impliqués dans le destin cellulaire et la migration.
- Mise en évidence des différentes voies induites suite à l'activation des récepteurs WNT et de leurs co-récepteurs. Seulement les trois principales branches des voies WNT ont été illustrées.

---

## Introduction – Projet 2

---

### I Généralités sur les voies WNT

Les voies WNT (« Wingless-related mouse mammary tumor virus integration site ») régulent de nombreux processus cellulaires tels que le contrôle de la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, l'apoptose, la survie, la migration ou la polarisation cellulaire (pour revue Mohammed et al., 2016). De plus, les voies WNT jouent un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire et au cours de la vie adulte lors de l'homéostasie des tissus. Ces voies et leurs constituants sont particulièrement bien conservés dans le règne animal, prouvant ainsi leur implication majeure.

La transmission du signal activateur suite à la fixation du ligand sur le récepteur se fait suivant 3 branches de signalisation (**Figure 65** - pour revue Niehrs 2012):

- La voie canonique WNT/ $\beta$ -caténine par laquelle la protéine  $\beta$ -caténine est stabilisée et donc accumulée dans le cytoplasme puis le noyau permettant la transcription de gènes cibles (**Figure 65b** – pour revue Clevers, 2006).
- La voie WNT/PCP (« Planar Cell Polarity ») joue un rôle essentiel dans la migration et dans la polarisation cellulaire via l'activation de GTPases et de kinases (**Figure 65a** - Fanto and McNeill, 2004 pour revue Collu and Mlodzik, 2015).
- La voie calcique (WNT/Ca<sup>2+</sup>) à laquelle je ne m'intéresserais pas en détail ici, qui permet d'augmenter la concentration en calcium du milieu intracellulaire via l'activation de la PLC par des protéines G (**Figure 65c** - De, 2011).

#### I.A Les ligands WNT

Les ligands de la signalisation WNT sont des glycoprotéines, sécrétées et caractérisées par une séquence peptidique riche en cystéines (pour revue Nusse and Varmus, 1992). Les gènes codant pour ces ligands sont fortement conservés : au nombre de 19 chez la souris et l'homme contre 7 chez la Drosophile. Certains ligands WNT sont redondants comme les ligands WNT1 et WNT3a (Ikeya et al., 1997).

Il est important de noter que nombre de données sur les ligands et les phénotypes de leurs KO respectifs chez la souris sont recensés sur « WNT homepage » (<https://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>), site réalisé par Roel NUSSE.



### **I.B Les récepteurs de la voie WNT**

De nombreux récepteurs sont recensés (Niehrs, 2012): les membres de la famille Frizzled et les corécepteurs LRP5/6, les ROR (« Tyr kinase-like Orphan Receptor »), PTK7 (« Protein Tyr Kinase7 »), RYR (« Receptor Tyr Kinase »), MUSK (« Muscle Skeletal Receptor Tyr Kinase »), et la famille des protéoglycannes dont le rôle, l'interaction ainsi que le fonctionnement au sein de la signalisation WNT restent encore méconnus et font l'objet de nombreuses études à l'heure actuelle.

De plus, des régulateurs des récepteurs de la voie WNT canonique et non canonique, sont recensés : les protéines de la famille RSPO (« R-Spondine ») (pour revue Jin and Yoon, 2012).

Les récepteurs Frizzled (« Fz » ou « Fzd ») sont au nombre de 11, codés par 13 gènes chez la souris, et sont constitués de 7 domaines transmembranaires Frizzled qui se dimérisent. La liaison avec le ligand s'effectue *via* la partie extracellulaire du récepteur qui contient un domaine riche en cystéine CDR (« Cystein Rich Domain ») (Dann et al., 2001).

Les récepteurs Fz interagissent avec des corécepteurs LRP tels que les protéines LRP5/6 (« Low density Lipoprotein (LDL) Receptor-Related Protein 5/6 » – **Figure 65b et 65c** - Tamai et al., 2000). Le rôle de ces protéines est de moduler l'activité WNT. L'organisation de la région extracellulaire de ces protéines LRP ainsi que la phosphorylation de certains résidus de cette région permet la fixation de l'AXINE2, une protéine induite par la signalisation WNT qui régule négativement la signalisation par rétrocontrôle (Davidson et al., 2005; Kikuchi, 1999; Wang et al., 2013). Il existe une certaine redondance entre certains récepteurs comme Fz et Fz2 chez la drosophile (Chen and Struhl, 1999).

Les nombreux récepteurs WNT peuvent activer à la fois les branches  $\beta$ -caténine dépendante ou indépendante. Le choix d'activation entre ces différentes branches découle du contexte cellulaire et de l'expression du récepteur/co-récepteur et du/des ligand(s). Ainsi, il est impossible de subdiviser correctement les différents récepteurs, ligands et régulateurs en fonction des branches de signalisation activées. Malgré cette complexité, certains récepteurs comme WNT1, WNT3A et WNT8 sont plus impliqués dans la voie canonique et, au contraire, WNT5A et WNT11 dans la voie non canonique (livre Chapitre 2 : Kikuchi 2011).

### **I.C La protéine Dishevelled (Dvl) (pour revue Mlodzik, 2016)**

Suite à la formation et à l'activation des récepteurs Fz *via* la fixation du ligand, le complexe va activer, en aval, la protéine DVL (« Dishevelled ») (**Figure 65** - Bhanot et al., 1996; Boutros and Mlodzik, 1999).

Chez la souris et chez l'homme, il existe 3 protéines DVL codées par 3 gènes. Ces protéines sont fortement conservées au cours de l'évolution et présentent trois domaines majeurs : un domaine N-terminal DIX (« Dishevelled Axin »), un domaine central PDZ (« Postsynaptic density 95, discs large, Zonula occludens-1 ») et un domaine C-terminal DEP (« Dishevelled-EGL-10-Pleckstrin »). Les



domaines des protéines DVL régissent les interactions avec d'autres protéines de la voie telles que l'AXINE2 ou DAAM1 pour réguler l'activité de la signalisation (pour revue Boutros and Mlodzik, 1999).

Dans l'ensemble des études réalisées, sur différents modèles animaux, il a été mis en évidence que DVL pouvaient transmettre le signal WNT aux branches canonique  $\beta$ -caténine et non canonique PCP (Adler, 2012; Boutros and Mlodzik, 1999; Goodrich and Strutt, 2011; McNeill, 2009; Peng and Axelrod, 2012; Singh and Mlodzik, 2012; Wallingford, 2006; Wallingford and Habas, 2005; Wallingford and Mitchell, 2011). Les mutants homozygotes pour les protéines DVL1, DVL2 ou DVL3 présentent des défauts de comportement sociaux et des phénotypes cardiaques qui sont aggravés suivant le fond génétique des souris (Ahmad-Annuar et al., 2006; Etheridge et al., 2008; Hamblet et al., 2002; Kioussi et al., 2002; Lijam et al., 1997; Wang et al., 2006). De plus, des défauts plus sévères sont observés au sein des embryons doubles homozygotes mutants comme des défauts de fermeture du tube neural au sein des embryons *Dvl1*<sup>-/-</sup> *Dvl2*<sup>-/-</sup> (Hamblet et al., 2002; Wang et al., 2006). Cependant, les doubles mutants *Dvl1*<sup>-/-</sup> *Dvl3*<sup>-/-</sup> et les simples homozygotes mutants pour ces deux gènes, ne présentent pas de défauts du tube neural montrant la prédominance de DVL2 et une certaine compensation par les protéines DVL1 et DVL3, en absence de DVL2, même si celles-ci ne sont pas suffisantes (Wu et al., 2011).

#### **I.D Le complexe AXINE/APC/GSK3 et la protéine $\beta$ - CATENINE**

Suite à la fixation du ligand WNT, le complexe formé entre les protéines DVL, le récepteur Fz et les co-récepteurs LRP5/6 va permettre la transduction du signal *via* l'inactivation du complexe de dégradation AXIN/GSK3/APC (« Adenomatous polyposis coli ») pour la branche WNT/ $\beta$ -caténine dépendante (**Figure 65b**). Par conséquent, la  $\beta$ -CATENINE est libérée, stabilisée, accumulée dans le cytoplasme et elle peut transloquer dans le noyau pour permettre la transcription des gènes cibles, grâce à l'interaction avec les facteurs de transcription LEF-TCF (« Lymphoid enhancer Factor / T Cell Factor »). Cela correspond à une situation de voie WNT « ON » (**Figure 65b** - pour revue Clevers and Nusse, 2012).

Lorsque la  $\beta$ -CATENINE n'est pas assemblée au sein du complexe qu'elle forme avec la molécule d'adhésion E-CADHERINE, celle-ci va s'assembler avec le complexe AXINE/GSK3/APC. Au sein de ce complexe, l'AXINE est un régulateur négatif de la signalisation WNT. En effet, la fixation de la  $\beta$ -CATENINE avec l'AXINE va engendrer la phosphorylation, en N-terminal, de la  $\beta$ -CATENINE par la protéine GSK3 du complexe (Aberle et al., 1997; Logan and Nusse, 2004; Rubinfeld et al., 1996). De là, la  $\beta$ -CATENINE va être ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. Cela correspond à une situation où la voie WNT est inactive, en mode « OFF », engendrant une fixation de l'inhibiteur GROUCHO sur les facteurs LEF/TCF inhibant ainsi la transcription (Clevers, 2006; Gordon and Nusse, 2006).



## II Rôle et activité de la voie WNT

### II.A Voie WNT canonique et pluripotence

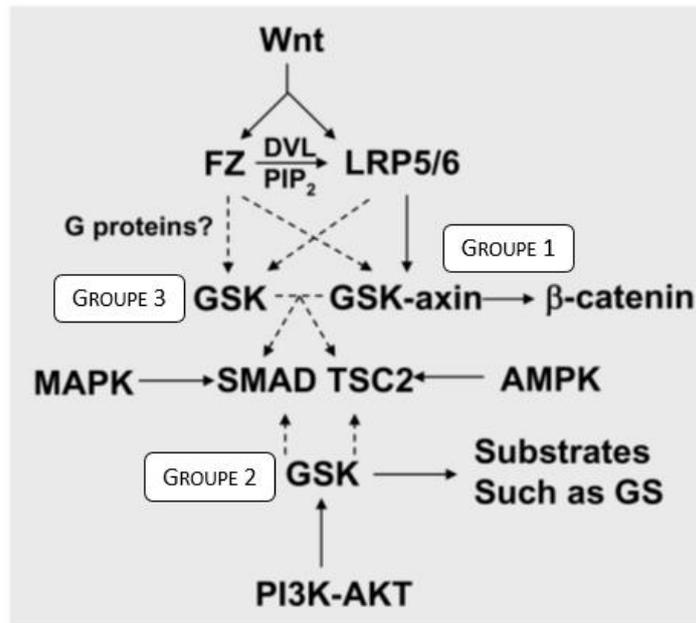
Les cellules ES expriment de nombreux effecteurs de la voie WNT tels que l'ensemble des récepteurs Fz au niveau ARN (Anton et al., 2007) ainsi que les membres de la famille LEF/TCF détectés à la fois au niveau ARN (Anton et al., 2007) et protéique (Kelly et al., 2011). Diverses études montrent l'implication de la voie WNT/ $\beta$ -caténine dans la pluripotence et le maintien des cellules souches ES.

Dans les cellules ES, l'activation de la voie WNT et l'interaction entre le facteur TCF3 et la  $\beta$ -CATENINE ; pour sa stabilité ; sont requises pour réguler le noyau OCT4/SOX2 en levant notamment la répression de TCF3 (Cole et al., 2008; Mansukhani et al., 2005). Il a été mis en évidence, par expériences de ChIP et d'analyse en micro-array qu'OCT4 et TCF3 fixent des cibles communes.

Les cellules ES *Tcf3*<sup>-/-</sup> ont montré que TCF3 régule négativement l'expression de *Nanog* (Pereira et al., 2006) et *Oct4* (Tam et al., 2008) en interagissant avec le facteur GROUCHO pour la fixation sur les régions régulatrices de ces gènes de pluripotence. La délétion génétique du *Tcf3* remplace la nécessité de l'apport en WNT3a exogène ou de l'inhibition de la GSK3 pour l'auto-renouvellement des cellules ES. Cela montre que l'inhibition du répresseur TCF3 est nécessaire à la stimulation de la signalisation WNT. *Yi et al* montre que lorsque TCF3 est éliminé de ses gènes cibles, il est remplacé par le facteur TCF1 (Yi et al., 2011).

Dans les cellules ES, la  $\beta$ -CATENINE peut aussi interagir directement avec les facteurs SOX2 ou OCT4. L'interaction avec OCT4 engendre une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'OCT4 permettant l'expression de gènes cibles tels que NANOG (Kelly et al., 2011). En revanche l'interaction  $\beta$ -CATENINE/SOX2 entraîne une inhibition de l'activité WNT (Mansukhani et al., 2005). Lors de l'auto-renouvellement des cellules ES, l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -CATENINE est négligeable (Faunes et al., 2013) ce qui est dû à l'association  $\beta$ -CATENINE /OCT4/E-cadhérine. Lors de la différenciation ce complexe se dissocie ce qui entraîne la transcription des gènes cibles de la  $\beta$ -CATENINE (Faunes et al., 2013).

L'auto-renouvellement est maintenu au sein des cellules ES *Ctnnb1* ( $\beta$ -caténine) <sup>-/-</sup> lorsqu'elles sont cultivées en LIF et en sérum. Cependant, un ralentissement de la différenciation en dérivés de mésendoderme et de neurectoderme est constaté dans ces cellules (Lyashenko et al., 2011). L'expression, dans ces cellules ES *Ctnnb1* <sup>-/-</sup>, d'une forme protéique tronquée en N-terminal de la  $\beta$ -CATENINE présentant une fonction transcriptionnelle déplétée, est capable de sauver le défaut de différenciation et permet le rétablissement de l'adhésion cellulaire médiée par l'E-CADHERINE au niveau de son domaine cytoplasmique (Lyashenko et al., 2011; McCrea et al., 1991; Nagafuchi and Takeichi, 1989; Ozawa et al., 1989). Ainsi, la fonction d'adhésion cellulaire médiée par la  $\beta$ -CATENINE est montrée comme prioritaire sur sa fonction transcriptionnelle. Néanmoins, cela n'exclut pas que la fonction transcriptionnelle de la  $\beta$ -CATENINE soit indépendante de son domaine d'activation



**Figure 66 : Représentation schématique des interactions entre les trois groupes de GSK et leur implication dans la régulation de diverses signalisations**

(Modifiée de Wu et Pan 2010)

Le premier groupe de GSK est retrouvé associé aux protéines AXINE et est, de manière probable, régulé par LRP5/6. Un second groupe est régulé par phosphorylation par la branche PI3K-AKT. Enfin, le troisième groupe potentiel est un groupe GSK indépendant d'une interaction avec l'AXINE qui serait aussi régulé par WNT.

ou indépendante de la liaison aux facteurs LEF/TCF. Ces résultats mettent en lumière le rôle de la  $\beta$ -caténine lors du maintien de la pluripotence et lors de la différenciation *via* son activité transcriptionnelle.

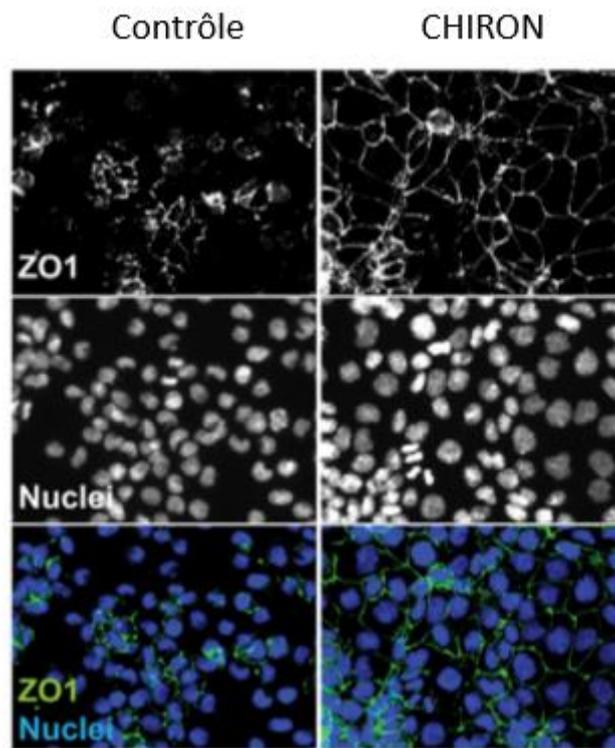
La  $\beta$ -CATENINE est le substrat de la protéine clé GSK3. Cependant, les événements de phosphorylation induits par la GSK3 de la signalisation WNT ne sont pas les mêmes que ceux de la signalisation PI3K-AKT (pour revue Wu and Pan, 2010). Par conséquent, le(s) rôle(s) et la régulation de la protéine GSK3 au sein de la signalisation WNT reste(nt) obscur(s) (**Figure 66**).

La création de cellules ES double KO pour GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$ , montre l'implication de la GSK3 dans la régulation de la  $\beta$ -caténine (Doble et al., 2007) avec une augmentation des gènes cibles du complexe TCF/  $\beta$ -CATENINE tels que les gènes *Axin2*, *Brachyury* et *Cdx1*.

L'utilisation d'un inhibiteur de la GSK3 (BIO ou CHIRON) dans les cellules ES en culture, supplémentées en LIF, exprimant les régulateurs clés de la pluripotence OCT4/SOX2/NANOG, permet un court maintien de la pluripotence des cellules mES et l'activation de la voie STAT3 (Ying et al., 2008). Ce traitement entraîne une augmentation dose dépendante, de l'expression des gènes rapporteurs LEF/TCF observée par une accumulation nucléo-cytoplasmique de la  $\beta$ -CATENINE (Sato et al., 2004). Ainsi, le CHIRON allié au PD032, inhibiteur de la branche MEK-ERK, constitue le cocktail 2i, utilisé pour maintenir la pluripotence et pour dériver les cellules ES (Nichols et al., 2009; Ying et al., 2008).

De plus, il a été mis en évidence que la protéine GSK3 pouvait moduler positivement la signalisation WNT *via* la phosphorylation des lipoprotéines LRP5/6 ce qui joue en défaveur de la phosphorylation de la  $\beta$ -CATENINE par la protéine GSK3 (Mao et al., 2001; Tamai et al., 2000). Cette phosphorylation passerait par un recrutement à la membrane (Zeng et al., 2008) permettant ainsi une association AXIN/GSK3 avec les cofacteurs LRP5/6 ce qui favorise leur phosphorylation (**Figure 65b** - (Pan et al., 2008; Zeng et al., 2008).

Ainsi, différents groupes de GSK3 sont présents au sein des cellules : un premier groupe GSK3/AXINE régulé par les cofacteurs LRP5/6, un second groupe régulé par la branche RTK-FGF/PI3K-AKT et enfin un troisième groupe indépendant de l'AXINE qui serait aussi régulé par la signalisation WNT (**Figure 66**). Ainsi, ces groupes présenteraient des rôles divers régulés et régulant différentes voies de signalisation telles que la voie WNT, la voie RTK-FGF/PI3K-AKT et la voie RTK-FGF/MEK-ERK. Les différences observées entre cellules souches murines et humaines reflètent ces différences puisqu'en cellules souches murines, l'activité GSK3 $\beta$  est liée à la branche RTK-FGF/PI3K-AKT et cible les gènes tels que *Nanog* et *c-Myc* alors que dans les cellules souches humaines, la GSK3 $\beta$  forme un complexe avec la protéine ERK et signale directement *via* la signalisation WNT et les membres du complexe de dégradation de la  $\beta$ -CATENINE (Singh et al., 2012). L'activation de la voie WNT induit l'activation finale de *c-Myc*, un des facteurs utilisés, non nécessaire, pour l'induction de cellules iPSCs



**Figure 67 : Différenciation des cellules XEN en épithélium d'EV après activation de la voie WNT**  
(Adaptée de Chuykin et al 2013)

L'activation de la voie WNT, par inhibition de la GSK3 suite au traitement des cellules XEN de rat au CHIRON pendant 2 jours, montre une différenciation des cellules en épithélium d'EV avec une expression forte de la protéine ZO1 (en vert) exprimée au sein des jonctions serrées.

(Takahashi and Yamanaka, 2006). Le facteur c-MYC est une protéine cible de la voie WNT puisqu'il a été mis en évidence que le gène *c-Myc* est ciblé et transcrit suite à la fixation de la  $\beta$ -CATENINE sur les facteurs de transcription LEF/TCF de ce gène (He et al., 1998; Rubinfeld et al., 1993, 1997; Singh et al., 2012; Su et al., 1993).

Enfin, il semblerait que la voie WNT joue un rôle dans le maintien de l'identité épiblastique dans les cellules ES suggérant que l'inhibition de la voie pourrait permettre d'engager les cellules vers le destin d'EPr. L'activation, dans les cellules XEN, de la voie WNT, par traitement au CHIRON, entraîne une différenciation en EV (**Figure 67** - Chuykin et al., 2013) suggérant son rôle dans la transition EP/EV.

## **II.B Rôles de la voie WNT/PCP**

La voie WNT/PCP est impliquée dans d'importants processus cellulaires tels que les processus de convergence/extension cellulaires, la polarité épithéliale ainsi que la formation des cils. Le modèle de prédilection pour étudier l'implication de cette voie a été le modèle de *Drosophile* et certains modèles vertébrés.

### **II.B.1 La polarité épithéliale « planaire » ou « tissulaire »(pour revue McNeill, 2010)**

Au cours de leur vie, les cellules doivent en permanence intégrer des signaux contrôlant leur croissance, leur devenir afin de déterminer leur structure et fonctions spécifiques. Lors de la formation d'épithélium par exemple, outre la polarité apico-basale, une seconde polarité se met en place perpendiculairement à l'axe de polarité apico-basale : il s'agit de la polarité planaire. Cette dernière repose sur la distribution unipolaire de molécules qui définit deux domaines corticaux, opposés et complémentaires dont l'orientation stéréotypée, contrôlée par la communication intercellulaire, va conférer une polarité à l'échelle du tissu (Amonlirdviman et al., 2005; Wu and Mlodzik, 2008), comme pour l'orientation des poils qui recouvrent la cuticule de *Drosophile*. En l'absence de polarité planaire, les cellules sont incapables de coordonner l'orientation de leur cytosquelette dans le plan de l'épithélium. Ainsi, le signal de polarité passe par le récepteur FRIZZLED (Adler et al., 2000).

### **II.B.2 Les processus de convergence/extension**

La voie WNT/PCP contrôle les processus de mouvements cellulaires par convergence et extension pour permettre l'établissement des trois feuilletts ainsi que la mise en place des axes du corps lors du développement comme l'axe A-P (« Antéro-Postérieur ») (Keller, 2002; Solnica-Krezel, 2005). La polarité cellulaire, le maintien des contacts cellules-cellules au sein de l'épithélium (Jessen et al., 2002; Takeichi et al., 1989), les divisions cellulaires orientées (Ciruna et al., 2006; Gong et al., 2004) et



les migrations dirigées par intercalation (Walck-Shannon and Hardin, 2014; Wallingford et al., 2002) vont permettre l'établissement et la formation correcte des tissus.

### III La voie WNT au cours du développement embryonnaire précoce

Au cours du développement embryonnaire murin, différentes études ont été menées pour observer l'activation de la voie WNT au travers d'expériences de perte ou de gain de fonction génétiques.

Tout d'abord, les transcrits des effecteurs et des antagonistes de la voie WNT sont exprimés au sein de l'embryon lors de la péri-implantation (Harwood et al., 2008; Kemp et al., 2005, 2007; Pfister et al., 2007; Wang et al., 2004).

Les mutants *βcat* <sup>-/-</sup>, présentant une délétion de l'exon 2 et une partie de l'exon 3, se développent normalement jusqu'au stade E7.0 où les premiers défauts apparaissent et affectent les cellules de l'ectoderme embryonnaire qui se dispersent au sein de la cavité amniotique (Haegel et al., 1995 ; Huelsken et al., 2000). De plus, une absence d'induction du mésoderme est observée au sein de ses embryons lors de la gastrulation (Haegel et al., 1995).

L'apparition tardive des défauts de ces embryons mutants pour la *β-caténine* pourrait s'expliquer par la présence résiduelle d'expression de protéine β-CATENINE maternelle ou par la production nouvelle d'ARN à partir des transcrits maternels qui sauveraient le phénotype causé par la perte de fonction de la *β-caténine*. Les embryons mutants maternel et zygotique pour la *β-caténine* n'ont pas été étudiés. En revanche, des embryons mutants partiels maternels pour la *β-caténine* (dû à une délétion partielle de l'allèle floxé de la *β-caténine* produisant une protéine β-CATENINE tronquée en partie N-terminale) et mutants maternels pour l'*E-cadhérine* révèlent l'importance de ces deux protéines pour le maintien de l'adhésion blastomérique (De Vries et al., 2004) résultant d'une mauvaise localisation de l'E-cadhérine au sein de ces embryons.

La protéine APC est une protéine clé dans la signalisation WNT et le contrôle de celle-ci est important puisqu'elle joue plusieurs rôles : elle promeut la phosphorylation et l'ubiquitination de la β-CATENINE par les protéines AXINE, elle séquestre la β-CATENINE dans le cytoplasme et elle permet, *via* sa localisation baso-latérale ou aux jonctions cellules-cellules, de contrôler la localisation cellulaire du complexe de dégradation AXINE/GSK3/APC.

La mutation APC<sup>min</sup> qui correspond à l'expression d'une forme tronquée de la protéine APC empêche la formation du complexe APC et entraîne, par conséquent, l'accumulation nucléaire de la β-CATENINE qui ne se lie pas au complexe de dégradation (Su et al., 1992). Cela induit une activation constitutive de la voie WNT (Chazaud and Rossant, 2006). Les embryons homozygotes APC<sup>min/min</sup> ne montrent de phénotype qu'après E4.75 dû à l'expression de la protéine APC maternelle jusqu'à E4.5.



La mutation induit l'expression ectopique de gènes cibles directs de la voie WNT canonique tels que *Brachyury* dans l'Epi (Chazaud and Rossant, 2006). L'expression de *Brachyury* n'est pas détectée au sein du TE et de l'EV. La formation du DVE est aussi inhibée chez ce mutant. L'étude de Chazaud and Rossant montre aussi qu'au stade E4.5, la  $\beta$ -caténine est exprimée, au niveau nucléocytoplasmique, au sein des cellules du TE faisant face aux cellules de l'EPr. Cette expression n'est plus détectée au stade E4.75. Une expression asymétrique d'autres gènes spécifiques au sein de l'EPr est aussi observée : les gènes *Hex* et *Pem* sont exprimés au sein de l'EPr puis ils se restreignent dans le DVE et de l'EXE, respectivement (Chazaud and Rossant, 2006) suggérant un rôle de la voie dans l'induction de l'axe proximo-distal puis antéro-postérieur ou dans la région charnière initiatrice de la différenciation de l'EPr en EP et EV.

Cependant, la génération d'une forme stabilisée tronquée sur l'exon 3 ( $\beta$ -caténine  $\Delta 3$ ) de la  $\beta$ -CATENINE non dégradée par le protéasome, ne montre pas d'accumulation de la  $\beta$ -CATENINE nucléocytoplasmique avant E5.5. Ces résultats suggèrent la présence d'une voie de dégradation alternative à celle du protéasome et révèle que la voie WNT/  $\beta$ -CATENINE n'est peut-être pas impliquée au cours du développement pré-implantatoire puisque le premier phénotype est observé au sein de l'ectoderme embryonnaire lors de la gastrulation au stade E6.5 (Kemler, 2004).

Néanmoins, d'autres indices sont en faveur d'un rôle de la voie WNT au cours de la préimplantation.

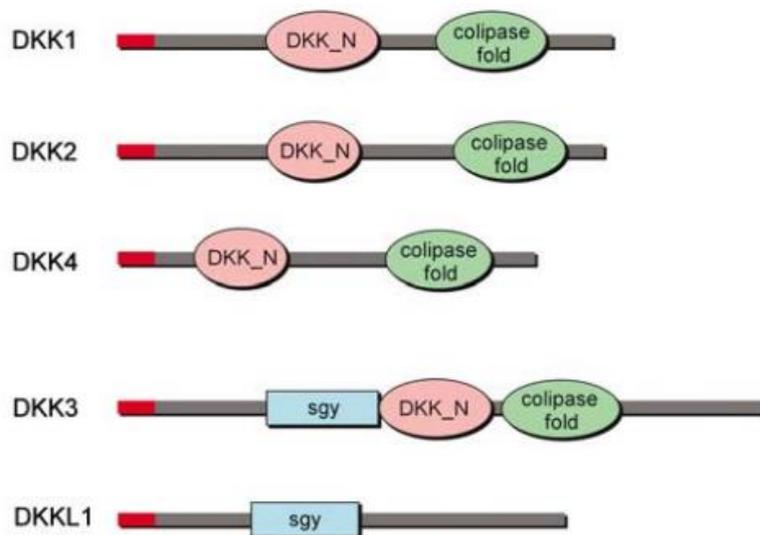
Par Western blot, Na et al ont détecté la protéine  $\beta$ -CATENINE déphosphorylée, donc potentiellement active, entre les stades E3.5 et E4.5 (Na et al., 2007).

L'utilisation de différents transgènes rapporteurs, contenant des éléments LEF/TCF (BAT-gal) dans ces embryons, révèle un signal dans l'Epi qu'à partir du stade E5.5. L'expression d'un transgène contenant l'élément cis-régulateur PEE du promoteur de *Nodal* dans les stades précoces, montre que la voie WNT canonique régule l'expression de *Nodal* au sein de l'Epi durant la pré-implantation via l'élément PEE (Granier et al., 2011). En effet, le transgène est exprimé *in vivo*, dès E3.5 au sein de l'Epi avec un nombre croissant de cellules au fil des stades et notamment avant et après implantation à E4.5. Ce transgène a été utilisé en contexte de perte et gain de fonction de la  $\beta$ -caténine. En condition de perte de fonction, aucune expression du transgène n'est observée au sein des embryons  $\beta$ -cat<sup>-/-</sup> à E4.75. En revanche, en contexte de gain de fonction, le transgène est exprimé de manière plus importante et de manière restreinte au sein de l'Epi dans les embryons *APC<sup>min/min</sup>* comparé aux embryons sauvages (Granier et al., 2011).

L'utilisation du rapporteur *Axin2<sup>LacZ/+</sup>* permet l'observation de l'activité WNT aux stades E3.5 et E4.5 au sein de la MCI puis aucun signal n'est détecté au stade E5.5 (ten Berge et al., 2011). De plus, le transgène TCF/Lef : H2B-GFP de l'équipe d'*Hadjantonakis* montre une localisation du signal GFP au



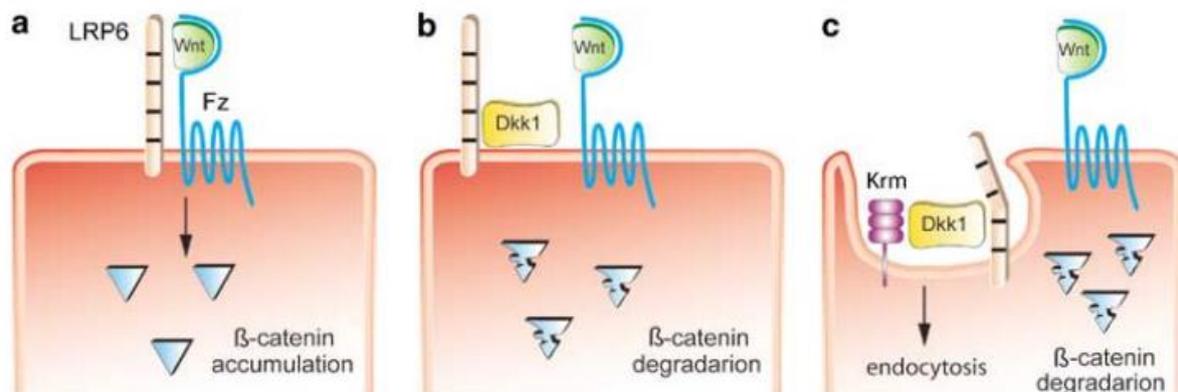
sein de l'EV au stade E5.5 et une colocalisation avec l'expression du marqueur d'EV HNF4 $\alpha$  (Ferrer-Vaquer et al., 2010). Aucune investigation n'a été menée à des stades plus précoces que le stade E5.5.



**Figure 68 : Structure protéique des domaines contenus dans chaque membre de la famille DKK**

(Pour revue Nierhs 2006)

Les protéines humaines DKK1 à DKK4 présentent des domaines DKK\_N (pfam04706, correspondant à un domaine Cys1) et un domaine colipase fold (pfam01114, pfam02740 qui sont aussi nommés domaine Cys2). DKKL1 aussi nommé SGY ou SOGGY, présente un domaine sgy retrouvé dans DKK3.



**Figure 69 : Modèle des interactions des facteurs DKK avec la signalisation WNT/β-caténine : mode d'action des protéines DKK1 et DKK2**

(Pour revue Nierhs 2006)

- La formation du complexe ternaire « ligand WNT/ récepteur Fz / corécepteur LRP6 » entraîne la stabilisation et l'accumulation de la β- CATENINE.
- Le facteur DKK1 va se lier au corécepteur LRP6 et empêcher la formation du complexe ternaire « ligand WNT/ récepteur Fz / corécepteur LRP6 » ce qui engendre l'activation du complexe de dégradation induisant la phosphorylation de la β- CATENINE et sa dégradation ce qui bloque la transduction du signal.
- Le facteur DKK1 va se lier au facteur KREMEN en plus de sa fixation au corécepteur LRP6. Cette double interaction provoque l'internalisation par endocytose du complexe et potentialise l'effet inhibiteur de DKK1 en entraînant la dégradation de la β- CATENINE phosphorylée par le complexe de dégradation ce qui bloque la transduction du signal.

L'ensemble de ces travaux confirment l'activation de la voie WNT au cours de l'embryogenèse pré-implantatoire. Cependant, différentes hypothèses peuvent être suggérées quant au rôle de la voie lors de l'embryogenèse. Dans les cellules ES, la voie semble jouer un rôle dans le maintien de l'identité épiblastique et l'inhibition de la voie serait en faveur du destin EPr. En embryon, un rôle post-implantation semble être mis en lumière. L'activation de la voie WNT dans les cellules XEN montre une différenciation en épithélium d'EV (Chuykin et al., 2013) ainsi que les résultats d'expression du transgène TCF/Lef : H2B – GFP montrant un signal au sein de l'EV, suggèrent un rôle de la voie WNT lors de la transition EV/EP.

#### **IV Antagonistes de la voie WNT canonique**

Il existe plusieurs types d'antagonistes de la signalisation WNT canonique tels que le facteur WIF-1 (« Wnt Inhibitory Factor 1 »), les protéines sécrétées SFRP (« secreted Frizzled-related proteins »), CERBERUS, FRZB, WISE, SOST, NAKED-CUTICLE, mais les principaux auxquels je vais m'intéresser sont les membres de la famille DKK (pour revue Cruciat and Niehrs, 2013).

##### **IV.A La famille DKK (pour revue Niehrs, 2006)**

###### **IV.A.1 Structure et homologie**

Les molécules sécrétées de la famille DKK (« Dickkopf ») ont été mises en évidence par l'équipe de Niehrs (Heidelberg, Allemagne) par criblage génétique suite à des études sur l'induction des structures antérieures comme la tête (Glinka et al., 1998), chez le Xénope. La famille DKK comprend 5 membres : DKK1 à DKK4 et SOGGY-1/DKKL1 (**Figure 68**). La protéine DKK1 a été identifiée dans l'équipe comme marqueur de l'EPr (Gerbe et al., 2008).

Les gènes DKK sont bien conservés. Seul DKK3 a divergé de la famille de par sa séquence génomique (Glinka et al., 1998), ainsi que SOGGY qui est le membre le plus distant en présentant une similitude de séquence avec DKK3 mais pas avec les autres membres, de par sa fixation à des effecteurs différents (Guder et al., 2006) (**Figure 68**). L'ensemble des protéines membres de la famille DKK sont des glycoprotéines sécrétées de poids moléculaires variables selon les types cellulaires étudiés (Fedi et al., 1999; Glinka et al., 1998; Krupnik et al., 1999). Ces protéines contiennent deux domaines riches en cystéines séparés par des régions « linker », qui s'étendent sur 50 à 55 acides aminés chez DKK1, -2 et -4 et seulement 12 acides aminés chez DKK3. Le premier domaine riche en cystéine est nommé Dkk\_N, autrement appelé Cys1, est unique alors que le second domaine nommé Cys2 montre un patron de 10 cystéines identiques à celles du domaine colipase fold (**Figure 68** - Aravind and Koonin, 1998). Le domaine colipase, le plus conservé au sein des membres de la famille, est nécessaire pour l'hydrolyse lipidique *via* des lipases pancréatiques et pour l'interaction avec les micelles lipidiques



(van Tilbeurgh et al., 1999). De plus, l'ensemble des membres de la famille présente une courte séquence similaire entre tous les membres (Glinka et al., 1998).

#### **IV.A.2 Fonction d'inhibiteurs de la voie WNT**

Les protéines de la famille DKK sont des régulateurs négatifs de la signalisation WNT (Belo et al., 2000; Glinka et al., 1998; Niehrs, 1999). Les protéines DKK modulent l'activité des protéines LRP5-6 (He et al., 2004) en empêchant la fixation de LRP5/6 avec le complexe récepteur FRIZZLED/ ligand WNT (**Figure 69B**). Tous les membres de la famille peuvent se fixer aux co-récepteurs LRP5/6 avec des affinités différentes (Bourhis et al., 2010; Niehrs, 2006). Il a aussi été mis en évidence que des mutations dans la protéine LRP5 réduisent ou peuvent absoudre la capacité aux facteurs DKK à inhiber la voie WNT (Ai et al., 2005; Balemans et al., 2007).

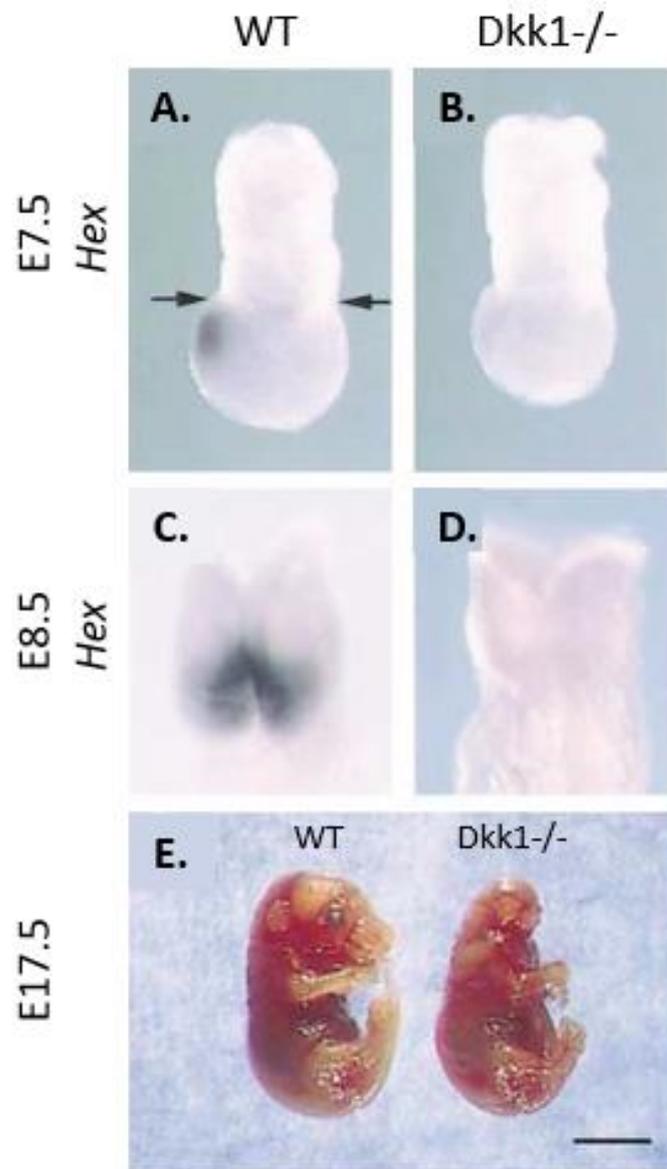
Il est aussi à noter que ces protéines DKK1, -2 et -4 interagissent avec KRM1 et KRM2 (« Kremen1 et -2 » respectivement), *via* leur domaine C-terminal (Mao and Niehrs, 2003), à la surface des cellules afin de permettre l'internalisation des co-récepteurs LRP5/6 et donc de déréguler la signalisation WNT (**Figure 69C** - Mao and Niehrs, 2003; Mao et al., 2002; Semenov et al., 2008; Wang et al., 2008). La protéine DKK2 présente néanmoins une capacité potentielle d'activation de la voie WNT. La fonction antagoniste de DKK3 n'a pas été encore démontrée.

Enfin, peu de choses sont connues à propos de SOGGY : la protéine est associée à la spermatogenèse et est localisée au niveau des acrosomes (Kaneko and DePamphilis, 2000; Kohn et al., 2005) mais de nombreuses choses restent à découvrir à son sujet.

#### **IV.A.3 Dickkopf-1 (DKK1)**

DKK1 est une protéine sécrétée, riche en cystéines, qui se lie, *via* son domaine C-terminal, au co-récepteur LRP5/6 en modulant son activité (Bafico et al., 2001; Brott and Sokol, 2002; He et al., 2004; Mao and Niehrs, 2003; Mao et al., 2001; Semenov et al., 2001). Des expériences de « crosslink » montrent une affinité de 1 :1 au sein du complexe DKK1/LRP6 (Bafico et al., 2001). L'étude de *Semenov et al* montre que cette liaison bloque l'interaction de LRP6 avec le complexe récepteur Fz/ ligand WNT et empêche ainsi la transduction du signal (Semenov et al., 2001).

L'interaction de DKK1 avec les protéines KRM1 et KRM2 potentialise la capacité de DKK1 à bloquer la voie WNT canonique. De plus, DKK1, KRM1 et KRM2 sont co-exprimés pendant le développement (Davidson et al., 2002; Monaghan et al., 1999; Nakamura et al., 2001). Chez le Xénope, la co-injection d'anticorps bloquants contre DKK1 et de morpholinos dirigés contre *Krm1* et *Krm2* engendre des défauts de formation de la tête plus sévères que les injections seules de ces différents éléments (Davidson et al., 2002; Glinka et al., 1998). Ainsi, DKK1 est considéré comme un inducteur de la tête au niveau embryonnaire.



**Figure 70 : Phénotype des embryons *Dkk1*<sup>-/-</sup>**

(Modifiée de Mukhopadhyay et al 2001)

Expression de l'ARNm du marqueur du neurectoderme *Hesx1* par HIS sur embryons WT ou sauvages au stade E7.5 (A et B) ou au stade E8.5 (C et D) et morphologie des embryons au stade tardif de E17.5.

Outre son rôle d'inhibiteur de la voie WNT canonique, DKK1 présente aussi d'autres rôles indépendants de la  $\beta$ -CATENINE. En effet, la surexpression de DKK1 dans les cellules H28 de mésothélium, délétées de manière homozygote pour la  *$\beta$ -caténine*, entraîne une augmentation de l'apoptose et une inhibition de la croissance de ces cellules (Lee et al., 2004). Ainsi, en absence de la  $\beta$ -CATENINE, DKK1 présente un effet qui passerait par la branche WNT/PCP *via* c-JNK (« c-Jun N-terminal Kinase ») puisqu'il a été constaté que cet effet est réduit lorsque des inhibiteurs de JNK sont ajoutés au milieu de culture (Lee et al., 2004). De plus, *Caneparo et al* montrent, chez le poisson-zèbre, que DKK1 active la voie WNT/PCP *via* JNK suggérant un rôle de commutateur de DKK1 entre la voie WNT canonique et WNT/PCP (Caneparo et al., 2007a). En effet, dans cette étude, l'injection d'ARNm de *Dkk1* est capable de promouvoir la phosphorylation de JNK et l'injection combinée d'ARN *Wnt11* et ARNm *Dkk1* augmente considérablement cette phosphorylation comparée à l'injection de l'ARNm de *Wnt8* qui quant à elle la bloque. Ainsi, DKK1 peut activer de manière directe la branche WNT/PCP, *via* le membre de la famille des héparane sulfates HSPG, KNYPEK, requis pour l'activité WNT/PCP (Topczewski et al., 2001).

Des travaux réalisés dans l'équipe ont mis en évidence son expression dans l'embryon murin au cours de l'embryogenèse entre les stades E3.5 et E4.5, par microarray, au niveau transcriptionnel (Gerbe et al., 2008). Cela confirme l'expression préférentielle de *Dkk1*, observée lors du microarray, dans les cellules XEN et dont la quantité d'ARNm augmente entre les stades E2.5 et E4.5 (Gerbe et al., 2008; Kemp et al., 2005). Ces nouveaux travaux ont aussi permis d'identifier DKK1 comme un marqueur de l'EPr (Gerbe et al., 2008).

La délétion homozygote de *Dkk1* chez la souris résulte, à E7.5, en une létalité embryonnaire qui s'accompagne d'une perte de structure antérieure de la tête et d'une fusion des vertèbres (**Figure 70** –Mukhopadhyay et al., 2001). Cela s'accompagne d'une perte du marqueur du neurectoderme antérieur *Hesx1*. Ceci a été le premier phénotype décrit et aucun phénotype plus précoce n'avait été observé. Il est à noter que les souris mutantes produites présentent un fond génétique mixte puisqu'elles sont issues de l'injection de clone ES mutants pour DKK1 de fond génétique 129/Sv (Nagy et al., 1993) dans un blastocyste hôte (Mukhopadhyay et al., 2001).

L'expression de DKK1 dans l'AVE a conduit *Mukhopadhyay et al* à étudier l'implication de DKK1 dans la morphogenèse antérieure. Pour cela, ils ont généré des chimères en injectant des cellules ES *Dkk1+/+* au sein d'embryon mutant *Dkk1-/-*. Les cellules ES contribuent à la formation de l'Epi et de ses dérivés alors que les tissus extra-embryonnaires tel que le VE sont mutés pour *Dkk1* (Mukhopadhyay et al., 2001). De plus, les chimères formées se développent correctement montrant que le défaut d'antériorisation des mutants *Dkk1* est indépendant du rôle de la protéine dans la formation de l'AVE.



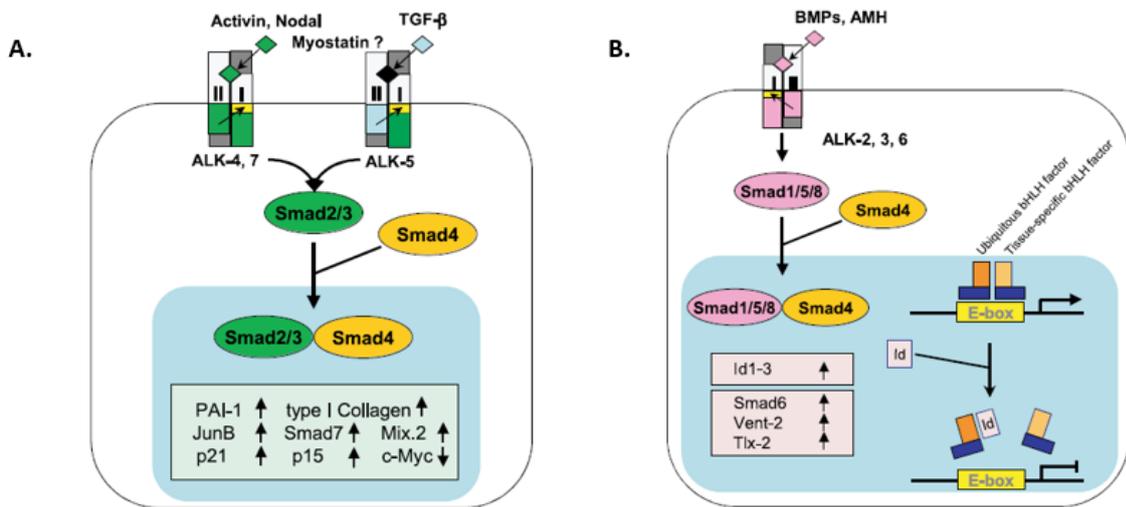
Ainsi, le phénotype tardif constaté au sein des embryons mutants homozygotes *Dkk1*, dans l'étude de *Mukhopadhyay et al*, suggère que, si un phénotype péri-implantatoire existe, il est sauvé par un autre facteur. De plus, l'expression de DKK1 est bien plus précoce que le phénotype observé à E7.5 puisqu'il commence à s'exprimer au sein de l'EPr dès E3.5 (Gerbe et al., 2008; Kurimoto, 2006). Les autres membres de la famille DKK ne se révèlent pas être de bons candidats. En effet, les membres DKK3, et par conséquent son homologue SOGGY, se révèlent être trop éloignés structurellement de DKK1 et ne sont que faiblement ou pas exprimés au stade blastocyste (Harwood et al., 2008; Kemp et al., 2005). De plus, les membres DKK2 et DKK4 sont peu ou pas exprimés lorsque DKK1 s'exprime et DKK4 est aussi structurellement différent de DKK1 (Harwood et al., 2008; Kemp et al., 2005). Par conséquent, le facteur pouvant potentiellement sauver le phénotype observé des mutants *Dkk1*, ne fait pas partie de la famille DKK.

## **V Interaction des voies WNT et de la voie BMP/TGF- $\beta$**

Il est connu que la voie WNT canonique peut interagir avec la voie BMP. Ainsi, la recherche des candidats potentiels s'est portée dans cette direction.

Tout d'abord, il a été montré que DKK1 et en particulier son domaine N-terminal, coopère avec un antagoniste des BMP. L'injection du domaine N-terminal de DKK1 et d'un dominant négatif un récepteur tronqué des BMP, le tBR, induisent la formation du mésoderme axial et pré-cordal chez l'embryon de Xénope (Korol et al., 2008). La co-injection d'ARNm de *Dkk1* et d'inhibiteurs de la voie BMP entraîne une induction totale et complète des structures de la tête dans les embryons de Xénope (Glinka et al., 1998). Ainsi ces expériences montrent une coopération par inhibition des voies WNT et BMP pour la régionalisation dorso-ventrale de l'axe de formation du corps contrôlant ainsi la formation correcte des structures antérieures comme la tête.

De plus, malgré l'absence de phénotype chez les mutants simples hétérozygotes *Dkk1* ou *Noggin*, les mutants doubles hétérozygotes présentent différents défauts dont la sévérité est progressive, suivant le nombre d'allèles délétés, au niveau des structures antérieures (del Barco Barrantes, 2003). Les mutants doubles hétérozygotes montrent une répression presque totale de l'expression de *Dkk1* ce qui n'est pas le cas dans les simples mutants hétérozygotes *Dkk1*. Ceci pourrait suggérer que *Dkk1* soit une cible de NOGGIN ce qui justifierait leur interaction génétique durant le processus de formation des structures antérieures. NOGGIN est un inhibiteur sécrété qui se lie aux BMP2, -4 et -7 (« Bone Morphogenic Protein ») pour empêcher la fixation du ligand BMP à son récepteur.



**Figure 71 : Signalisations majeures TGF- $\beta$ /Activine/Nodal et BMP**

(Pour revue Miyazawa et al 2002)

- A. La signalisation TGF- $\beta$ /Activine/Nodal signale au travers des récepteurs ALK4/7 et ALK5. Le signal est ensuite transmis via les protéines SMAD2/3 qui vont ensuite être transloquées dans le noyau où elles vont interagir avec la protéine SMAD4 pour l'induction des gènes cibles de la voie.
- B. La signalisation BMP signale au travers des récepteurs ALK2/3/6. Le signal est ensuite transmis *via* les protéines SMAD1/5/8 qui vont transloquées dans le noyau et interagir avec la protéine SMAD4 pour l'induction des gènes cibles tels que les Id1-3. Les facteurs Id vont ensuite dissocier les complexes bHLH réprimant ainsi la transcription des gènes régulés par ces derniers.

### V.A Généralités sur la voie BMP (pour revue Miyazawa and Miyazono, 2017)

La voie BMP est impliquée dans de nombreux processus biologiques comme la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaires (Mathura et al., 2000; Schuldiner et al., 2000; Suzuki et al., 2008) et joue un rôle majeur dans la formation des os et des cartilages ; rôle identifié à partir de cellules souches mésenchymateuses (Urist and Strates, 2009). La voie BMP, sous-partie de la voie des TGF- $\beta$  est constituée d'un ensemble de 22 facteurs de croissance correspondant aux ligands BMP (pour revue Chen et al., 2004). Les signalisations TGF- $\beta$  et BMP transmettent le signal par des récepteurs BMP de type I ou II, jusqu'au noyau *via* la phosphorylation des complexes des protéines SMAD: SMAD2/3 pour la signalisation TGF- $\beta$  (**Figure 71A**) et SMAD1/5/8 pour la branche BMP (**Figure 71B**). Ces protéines SMAD vont ensuite interagir avec SMAD4 pour induire la transcription et par conséquent, l'expression de gènes cibles (**Figure 71** – pour revue Chen et al., 2004) .

Il est connu que les voies RTK-FGF, LIF, TGF- $\beta$  et WNT interagissent avec la voie BMP afin de maintenir la pluripotence des cellules ES murines (James et al., 2005; Sato et al., 2003). De plus, de nombreuses études montrent que d'autres signalisations participent et complètent la réponse induite par la voie BMP et notamment les signalisations c-Jun, PI3K, NF $\kappa$ B etc (Lou et al., 2000; Xiao et al., 2002).

### V.B La voie BMP et l'embryogenèse

L'analyse transcriptomique des cellules internes et externes au stade 16 cellules montre l'expression des composants de la voie BMP avec notamment les cellules internes qui expriment les ligands BMP4 et BMP7 qui restent exprimés au sein de la MCI, et les cellules externes qui expriment le récepteur BMPR2 dont l'expression se poursuit au sein du TE au stade blastocyste (Coucouvanis and Martin, 1999; Graham et al., 2014; Guo et al., 2010; Tang et al., 2010). *Reyes et al* ont montré que la signalisation BMP est active à partir du stade 4 cellules dans les 4 blastomères puis elle se restreint dans l'ICM au stade blastocyste ainsi que dans le TE avec une forte expression de la forme active phosphorylée pSMAD1 au niveau nucléaire (Graham et al., 2014; Reyes de Mochel et al., 2015a; Yamamoto et al., 2009).

L'utilisation d'inhibiteurs de la voie BMP ou la micro-injection de dominant négatif *dnSmad4* ou *dnBmpr2* au sein d'un des blastomères du zygote au stade 2 cellules tardif, ou les *Knock-down* des ligands *Bmp4* et *Bmp7*, induisent une diminution significative du nombre de cellules du TE et de l'EPr au stade E4.5 sans altérer le lignage Epi. En effet, les traitements inhibiteurs à la protéine NOGGIN recombinante ou à la Dorsomorphine engendrent une augmentation de l'apoptose au sein de ces lignages (Graham et al., 2014).

Au stade E5.5, la voie BMP est requise pour le développement du lignage EV avec la signalisation Nodal (Yamamoto et al., 2009). En effet, au sein des embryons *Nodal*<sup>-/-</sup> et *Bmpr2*<sup>-/-</sup>, les



marqueurs d'EV embryonnaire ne sont pas induits contrairement aux marqueurs d'EV extraembryonnaire. De plus, l'expression de pSMAD1 est perdue au stade E5.5 (Yamamoto et al., 2009).

Le gène *Id2*, codant pour un facteur de transcription de type bHLH (« basic Helix-Loop-Helix ») est fortement exprimé dans les cellules ESCs murines et est réprimé progressivement lors du processus de différenciation. Les cellules ES ID2+ peuvent être maintenues en auto-renouvellement en présence de LIF seul sans sérum ou BMP4 dans le milieu de culture, rendant l'expression d'*Id2* suffisante pour bloquer la différenciation neurale de ces cellules (Ying et al., 2003). Ainsi, dans les cellules ES, la surexpression de SMAD1/4 ou d'une forme constitutivement active du récepteur BMP outrepassé les effets du LIF et pousse les cellules vers une différenciation non neurale soit mésodermique et endodermique en créant une sorte d'état d'équilibre entre STAT3 et SMAD (Ying et al., 2003).

Le traitement aux BMP4 ou BMP2 recombinants des cellules XEN qui entraîne leur différenciation en EV extra-embryonnaire (Artus et al., 2012; Paca et al., 2012) ou à l'inhibiteur de la GSK3 $\beta$  qui entraîne la différenciation en épithélium d'EV (Chuykin et al. 2013) pourraient justifier le projet d'élucider l'interaction entre DKK1 et la voie BMP, notamment NOGGIN, exprimés tous deux dans les cellules XEN non différenciées (Kunath et al., 2005).

### **V.C NOGGIN, inhibiteur de la voie BMP**

NOGGIN, glycoprotéine de 67 kDa, antagonise la voie BMP *via* sa fixation sur les ligands BMP2, 4 et BMP7 au niveau des sites de fixation aux récepteurs BMP de type I et de type II entraînant ainsi l'inhibition de la voie par « capture » des ligands (Greenwald et al., 2003; Groppe et al., 2002). L'ensemble des ligands BMP peuvent être ciblés et capturés par NOGGIN avec une réserve pour BMP6 par exemple qui semble être NOGGIN-résistant ; ce qui serait expliqué par l'émergence de mutations diminuant l'affinité de la fixation de NOGGIN, sur ces ligands BMP, (Schwaerzer et al., 2012; Song et al., 2010). L'interaction de NOGGIN avec l'Héparine et les héparanes sulfates (HS), en particulier les glycosaminoglycanes (GAGs), de la matrice extracellulaire, constitue une des régulations de NOGGIN puisque cette interaction permet la capture de la protéine NOGGIN sécrétée et sa localisation spatiale correcte (Masuda et al., 2014; Paine-Saunders et al., 2002).

Chez la souris, *Noggin* est exprimé à partir d'E7.5 dans le nœud et le mésendoderme antérieur (McMahon et al., 1998). Les individus *Noggin* *-/-* présentent une mortalité périnatale, tardive, causée par des défauts de fermeture du tube neural, des déficiences dans le développement des somites et des malformations au niveau des membres et des défauts de formation au niveau de la lentille (McMahon et al., 1998) alors que les individus hétérozygotes *Noggin* *+/-* montrent des défauts de cartilage (Brunet et al., 1998). L'ensemble de ces anomalies peut être imputé à une absence d'inhibition de la voie BMP qui joue un rôle crucial dans la formation de ces différents tissus.



Dans l'embryon, l'inhibition de la voie BMP par traitement pharmacologique *via* l'ajout dans le milieu de protéine NOGGIN recombinante ou par l'expression d'un dominant négatif du récepteur BMP, entraîne un délai dans le clivage cellulaire (Reyes de Mochel et al., 2015b). De plus, le traitement par NOGGIN recombinant injecté dans un des blastomères du zygote au stade 2 cellules tardif, diminue significativement le nombre de cellules de l'EPr par apoptose au stade E4.5 sans altérer le lignage Epi (Graham et al., 2014). A l'inverse, NOGGIN favorise le destin TE puisque *Murohashi et al* ont observé que la culture d'embryon supplémentée en NOGGIN augmente le nombre de cellules TE au sein de l'embryon (Murohashi et al., 2010). Cependant, ces derniers résultats ne correspondent pas à un nombre de cellules mais à une aire des cellules ICM ou TE ce qui pourrait expliquer les résultats contradictoires. De plus, les embryons ont été cultivés à partir du stade E3.5 durant 4 jours puis en présence de NOGGIN recombinant à partir du 1er ou 3ème jour de culture ce qui diffère des expériences de *Graham et al*.

Enfin, la supplémentation en NOGGIN dans la culture de cellules ESCs provoque la surexpression des marqueurs CDX2, répresseur d'*Oct4* (Wang et al., 2008). En embryons cultivés par FIV (« *In Vitro* fertilized ») avec du NOGGIN recombinant, le nombre de cellules OCT4+ est diminué comparés aux embryons contrôles (La Rosa et al., 2011). Dans les cellules humaines ESC, le *knockdown* d'*Oct4* augmente l'expression de BMP4 et de son gène cible *Id2* de la même façon qu'une réduction de l'expression de l'antagoniste de la voie la Chordine (Babaie et al., 2007) est observée révélant l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négatif entre OCT4 et BMP4 chez l'homme.

#### **V.D Double homozygote mutant *Dkk1/Noggin***

Enfin, l'argument le plus plausible d'une compensation de DKK1 par un autre facteur provient de l'observation du double homozygote mutant *Dkk1/Noggin*. En effet, l'isolement de ces embryons mutants s'est révélé impossible du fait de leur mort avant E6.0 (del Barco Barrantes, 2003). Ainsi, la probable synergie entre DKK1 et un antagoniste de la voie BMP, l'absence de phénotype chez les simples mutants *Dkk1* et *Noggin* et les résultats sur embryons mutants hétérozygotes, nous ont amené à nous interroger au sujet d'un mécanisme compensatoire au niveau pré-implantatoire.



---

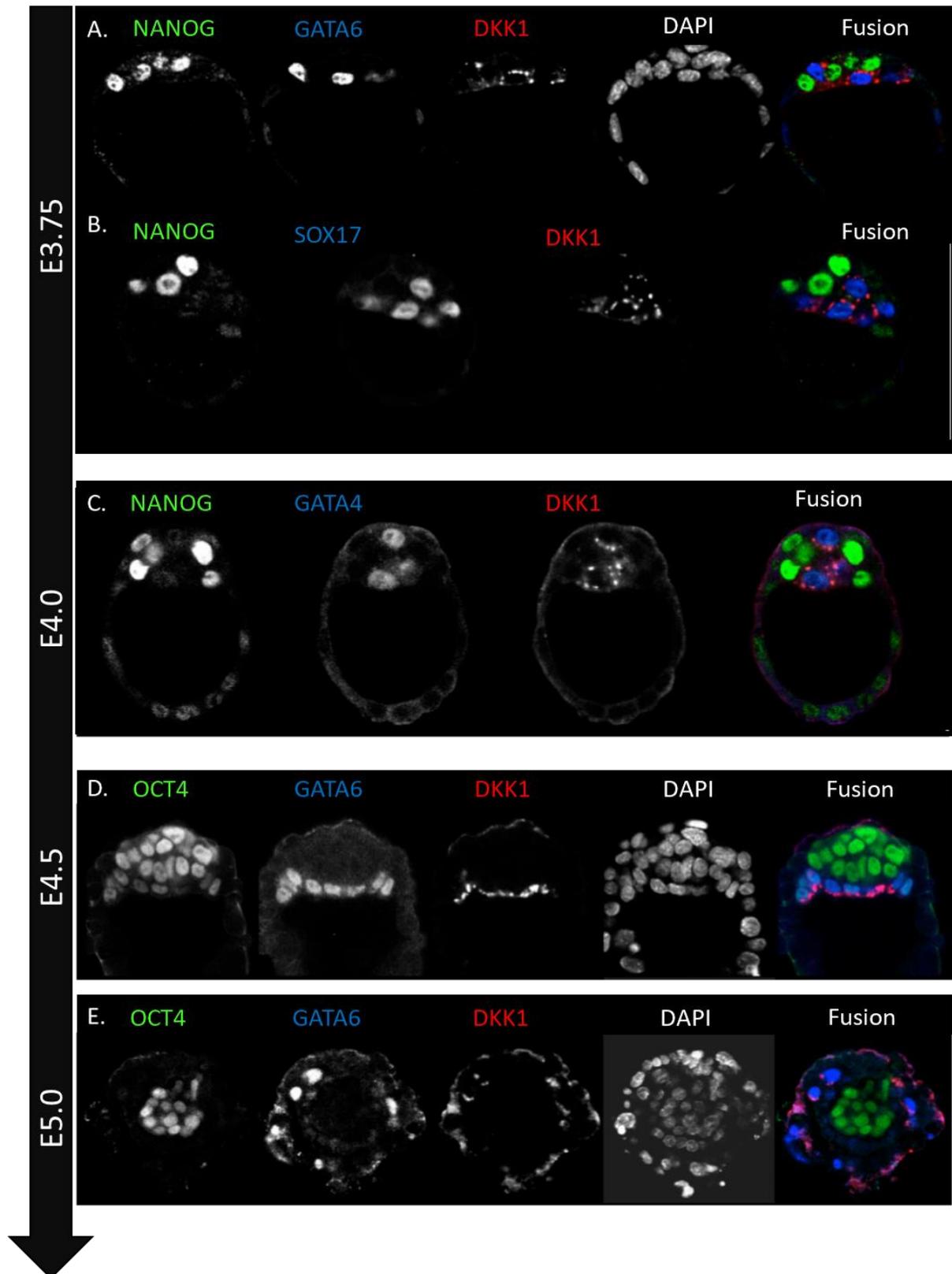
## Objectifs – Projet 2

---

D'autres voies de signalisation ont été identifiées lors de la différenciation de l'EPr. L'analyse de cellules XEN a permis de montrer que les voies BMP et WNT favorisent une identité EV plutôt que EP (Artus et al., 2012; Chuykin et al., 2013; Kunath et al., 2005; Paca et al., 2012).

Le micro-array réalisé dans l'équipe à différents stades embryonnaires a identifié DKK1, inhibiteur de la voie Wnt/ $\beta$ -CATENINE et un activateur de la voie PCP (Caneparo et al., 2007b) comme marqueur de l'EPr (Gerbe et al., 2008; Kurimoto, 2006). Aucun phénotype péri-implantatoire n'a été observé dans les mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup>. Cela suggère un effet compensatoire d'un autre facteur.

NOGGIN, inhibiteur de la voie BMP (McMahon et al., 1998) peut interagir génétiquement avec DKK1 (del Barco Barrantes, 2003). Des défauts sévères de formation de l'axe antéro-postérieur sont présents chez les doubles mutants hétérozygotes. La double mutation *Dkk1*<sup>-/-</sup>*Noggin*<sup>-/-</sup> est létale avant E6,0 (del Barco Barrantes, 2003). Ainsi, le second projet de ma thèse a été d'étudier le rôle de la double inhibition/activation des voies WNT et BMP lors de la formation de l'EPr et de sa différenciation en EP.



**Figure 72 : Profil d'expression du marqueur de l'EPr DKK1**

(Réalisée par M. GASNIER)

Expression de DKK1(en rouge), des marqueurs de l'EPr GATA6, SOX17 ou GATA4 (en bleu) et des marqueurs de l'épiblaste NANOG et OCT4 (en vert) au sein d'embryons sauvages au stade E3.75 (A, B), E4.0 (C), E4.5 (D) et E5.0 (E).

---

## Etat de l'art – Projet 2

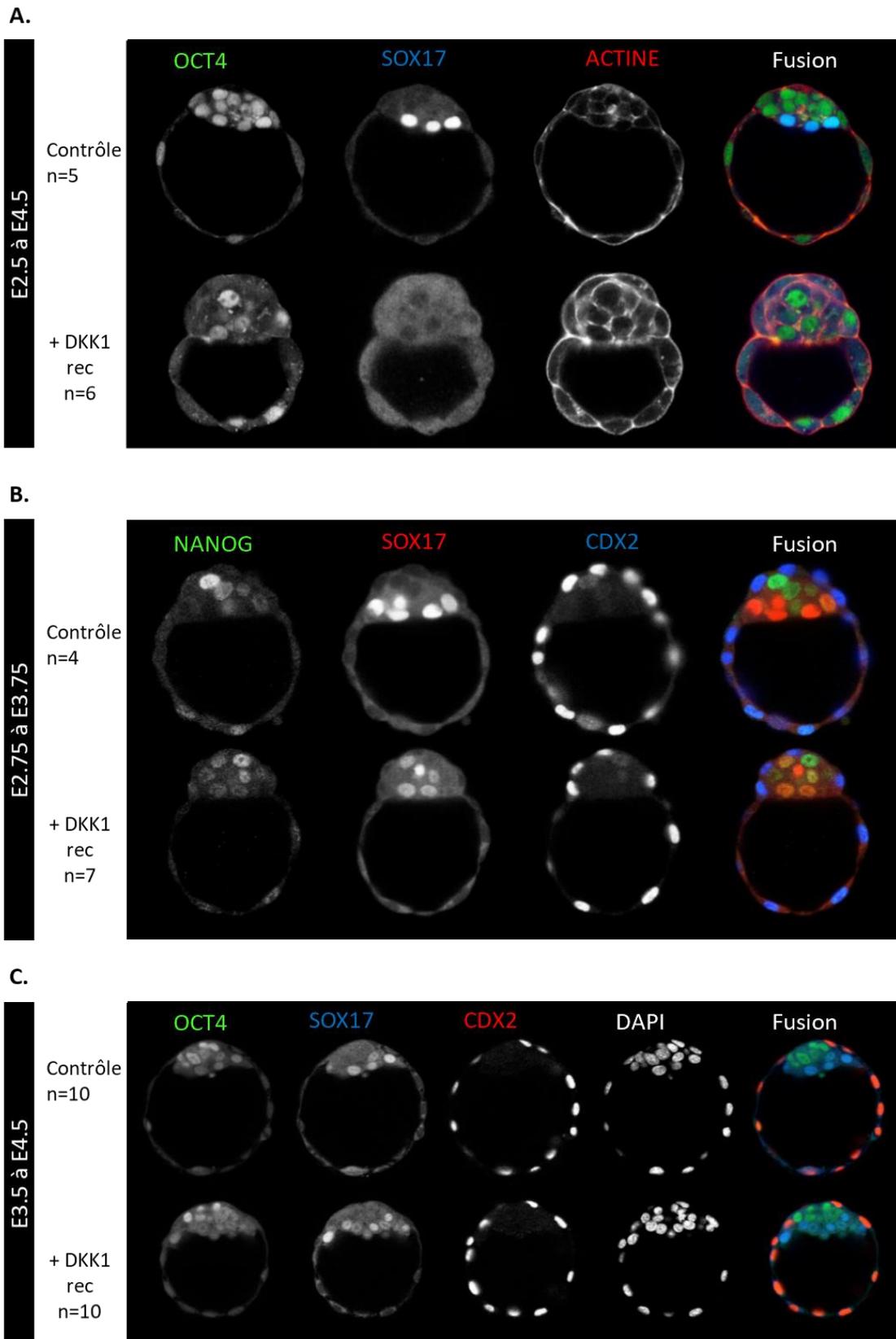
---

### I Expression de DKK1, marqueur de l'endoderme extra-embryonnaire

DKK1 a été identifié comme nouveau marqueur de l'endoderme extraembryonnaire par un microarray réalisé dans l'équipe d'accueil (Gerbe et al., 2008; Kurimoto, 2006; Ohnishi et al., 2014). Ces expériences ont révélé une expression de l'ARN de *Dkk1* dès le stade E3.5. De plus, le profil d'expression au niveau protéique de DKK1 a été réalisé avant mon arrivée au laboratoire par M. GASNIER. Il montre une co-expression spécifique de celui-ci, dans les cellules de l'EPr, avec les marqueurs d'EPr tels que GATA6, SOX17 et GATA4 dès E3,75 (**Figure 72**). A ce stade, son expression est localisée dans le cytoplasme des cellules EPr et est exclue des cellules d'Epi exprimant NANOG et de celles du TE (**Figure 72A**). Quelques cellules exprimant GATA6 sont aussi exemptes d'expression de DKK1 montrant que la maturation des cellules d'EPr n'est pas concomitante dans toutes les cellules. Ces expériences de co-marquages entre les différents marqueurs de l'EPr révèlent une hiérarchie d'expression : GATA6 > SOX17 (E3.5) > DKK1 (E3.75) > GATA4 (E4.0).

Ensuite, l'expression cytoplasmique de DKK1 localisée dans les précurseurs d'EPr, se polarise, à E4.5, du côté apical des cellules de l'épithélium (**Figure 72D**). Enfin, son expression va se restreindre aux cellules d'EP et semble s'exprimer au front de migration des cellules, lors de la différenciation de l'EPr en deux tissus distincts que sont l'EV et l'EP, après E4,5 (**Figure 72E**). Ainsi, il pourrait jouer un rôle sur le tri des cellules d'EPr vers la surface de la MCI, lors de la formation de l'épithélium d'EPr et/ou lors de l'induction/migration de l'EP pendant la TEM. Il est à noter, pour la suite des résultats, qu'au stade E4.5 le marqueur OCT4 est exprimé au sein de l'ensemble des cellules de la MCI puis son expression se restreint aux cellules de l'Epi uniquement au stade E5.0 avec une diminution de son expression qui débute au stade E4.5/E4.75 (**Figure 72D et 72E**).

Lorsque DKK1 est exprimé ectopiquement à l'aide d'une protéine recombinante, on observe que les embryons traités de E2.5 à E4.5 adoptent une morphologie retardée d'embryon au stade E3.5 et ils n'expriment pas le marqueur SOX17 comparés aux embryons contrôles dans lesquels les cellules SOX17+ sont ségréguées correctement à la surface de la MCI (**Figure 73A**). Cela suggère que DKK1 pourrait jouer un rôle dans le développement et la maturation de l'embryon. L'étude de fenêtres de traitement plus courtes allant des stades E2.75 à E3.75 (**Figure 73B**) ou des stades E3.5 à E4.5 (**Figure 73C**) montrent que les embryons traités ne diffèrent en aucun point des embryons contrôles dans lesquels des cellules d'EPr exprimant SOX17 sont produites et correctement ségréguées. L'effet du traitement avec ajout de DKK1 recombinant a lieu entre les stades E2.5 à E2.75, ce qui a été inattendu puisque DKK1 endogène est



**Figure 73 : Cultures d'embryons sauvages sans ou avec traitement au DKK1 recombinant (1µg/mL)**

(Réalisée par M. GASNIER).

Expression des marqueurs de l'EPr SOX17, de l'épiblaste NANOG et OCT4, du TE CDX2 et visualisation de l'ACTINE membranaire au sein d'embryons contrôles et traités de E2.5 à E4.5 (A), de E2.75 à E3.75 (B) et de E3.5 à E4.5 (C).

exprimé à partir du stade E3.5. Puisque DKK1 n'est pas exprimé à ce stade, il s'agit d'un effet ectopique probablement pas dû à DKK1 mais à la voie WNT.

Les cellules XEN indifférenciées expriment DKK1 (Kunath et al., 2005) et leur différenciation en épithélium d'EV est induite par activation de la voie WNT canonique passant par l'inhibition de la GSK3 $\beta$  (Chuykin et al., 2013). Ainsi, la différenciation des cellules en EP passerait par l'inhibition de la voie WNT et pourrait donc être médiée par DKK1. Lorsque des cellules XEN sont traitées avec du DKK1 recombinant pendant 48h, on observe que l'expression de la thrombomoduline, marqueur spécifique de l'EP (Healy et al., 1995), est augmentée (**Figure 74**).

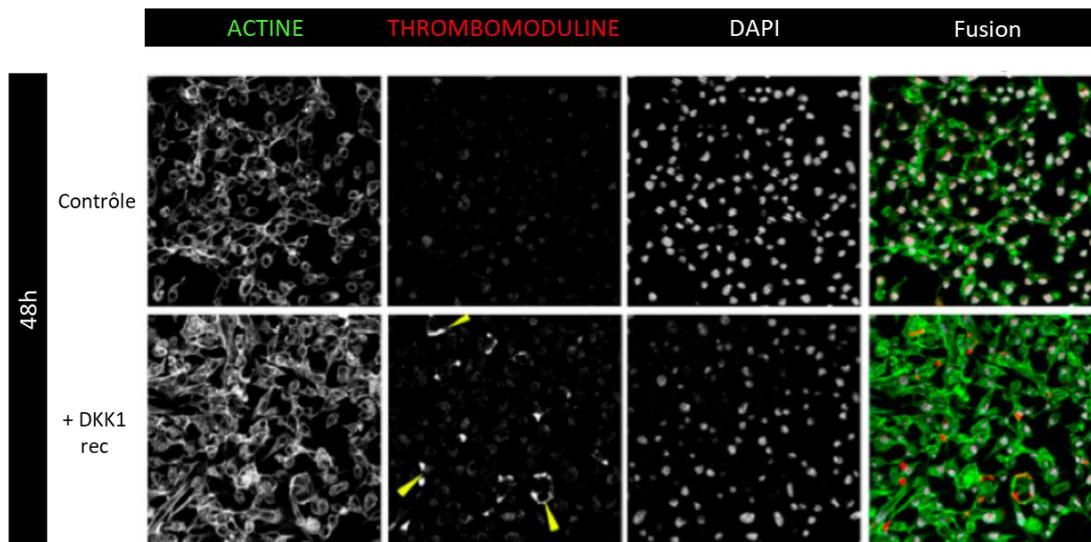
## II DKK1, inhibiteur de la voie canonique WNT/ $\beta$ -CATENINE

DKK1 est connu pour être un inhibiteur de la voie canonique WNT/ $\beta$ -CATENINE. Par conséquent, des expériences fonctionnelles ont été réalisées sur modèles cellulaires (F9) et sur embryons.

En premier lieu, cette voie a été activée afin de mimer une inhibition de DKK1. Pour ce faire, des expériences de traitement d'embryons sauvages soit avec du BIO, inhibiteur de la GSK3, soit avec du CHIRON, un inhibiteur spécifique de la GSK3 $\beta$ , ont été réalisées. Le traitement des embryons entre les stades E2.75 à E3.75 bloque leur développement au stade E3.25, avec une forte co-expression des marqueurs GATA6 et NANOG au sein de la MCI. Il a aussi été constaté une diminution de l'expression de GATA6 avec le BIO dans les embryons traités des stades E3.75 à E4.5 et une répression importante de l'expression de SOX17 ce qui confirme le rôle de l'inhibition de la voie WNT/ $\beta$ -CATENINE dans la formation de l'EPr. Cependant, ces expériences ont été réalisées avec de fortes concentrations en inhibiteurs et la diminution des cellules de l'EPr, par apoptose, constatée, pourrait être due à un trop fort traitement et non à un réel effet de l'activation de la voie.

D'autres expériences ont été réalisées afin d'observer le devenir des cellules d'EPr et leur maturation. Des cellules F9 ont été cultivées en corps embryonnaires (CE) ensemencés sur des lamelles pour récapituler la différenciation de l'EPr avec la formation d'EP. Lorsque ces CE sont traités avec des inhibiteurs de la GSK3 (inhibiteur BIO), activant ainsi la voie WNT/ $\beta$ -CATENINE, il y a moins de cellules migratrices (**Figure 75**). Néanmoins, ces cellules n'ont pas été caractérisées.

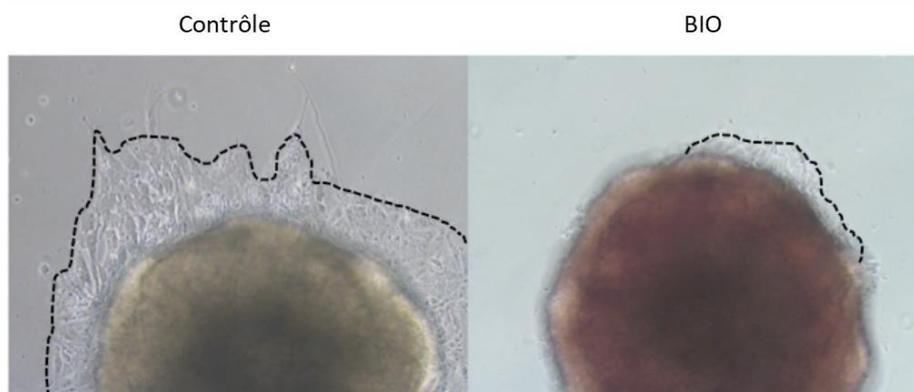
De plus, les explants d'embryons sauvages APC $^{+}/+$ , forment un EPr qui, au contact de la fibronectine, se différencie en EP (**Figure 76** - Behrendtsen et al., 1995). Dans les embryons mutants APC $^{Min}/Min$ , qui activent ectopiquement la  $\beta$ -CATENINE, un défaut de présence d'EP, marqué par l'absence d'expression de la LAMININE1, à la fois dans les embryons *in toto*, et lors de cultures d'explants de MCI (**Figure 76**) ainsi que la persistance d'une forte expression de l'E-CADHERINE dans toutes les cellules (**Figure 77**). L'ensemble de ces résultats montre que l'activation ectopique de la voie  $\beta$ -CATENINE inhibe soit la différenciation de l'EP, soit sa survie, ou soit sa migration, ce qui est en accord avec l'hypothèse que DKK1 jouerait un rôle dans la formation de l'EP.



**Figure 74 : Expression de la Thrombomoduline dans des cellules XEN traitées au DKK1 recombinant après 48h.**

(Réalisée par M. GASNIER)

La THROMBOMODULINE est visualisée en rouge et l'ACTINE en vert.



**Figure 75 : L'inhibition de la GSK3 (BIO) empêche la formation de l'EP *in vitro* au sein de corps embryonnaire formés à partir de cellules F9.**

(Réalisée par M. GASNIER)

Les corps embryonnaires traités au BIO ne présentent pas de cellules d'EP qui migrent (pointillés noirs) comparés aux corps embryonnaires sans traitement.

### III Analyse des mutants homozygotes *Dkk1*<sup>-/-</sup> et implication de *Noggin*

Il a été noté que les embryons homozygotes mutants pour *Dkk1* ne présentent pas de phénotype pré-implantatoire puisque les premiers défauts sont observés à partir du stade E7.5 avec des défauts d'antériorisation et de formation de la tête (Mukhopadhyay et al., 2001).

Cela suggère qu'au niveau pré-implantatoire la perte de *Dkk1* est compensée par un autre facteur, s'il a une fonction. La coopération entre les voies WNT et BMP peut constituer une piste à explorer. En effet, les cellules XEN peuvent se différencier en EV extra-embryonnaire après traitement aux BMP4 ou BMP2 recombinants (Artus et al., 2012; Paca et al., 2012) ou par activation de la voie WNT (Chuykin et al., 2013). De plus, la signalisation BMP est impliquée dans le maintien des cellules de l'EPr puisque l'inhibition de la voie par siARN dirigés contre BMP4 et BMP7, entraîne une diminution des cellules de l'EPr (**Figure 78** - Graham et al., 2014).

DKK1, antagoniste de la voie WNT et NOGGIN, antagoniste de la voie BMP sont tous deux exprimés au sein des XEN indifférenciées (Kunath et al., 2005). Des expériences complémentaires ont été réalisées en utilisant des souris *Noggin*<sup>+LacZ</sup> (Chuykin et al., 2013). Même si dans la littérature aucune expression de *Noggin* n'a été détectée avant E7.5 ; le rapporteur *LacZ* révèle une expression X-gal à E3.5 dans l'ICM et non dans le TE, ainsi qu'une expression dans l'EP et dans la charnière EP/EV à E5.5 (**Figure 79**). Néanmoins il faudra confirmer ces expériences par immunomarquage ou RT-qPCR.

Etant des protéines sécrétées, il n'est pas nécessaire de retrouver DKK1 et NOGGIN exprimées dans les mêmes tissus pour coopérer. Cependant, l'expression de ces deux inhibiteurs au même stade serait un indice en faveur d'une inhibition conjointe des voies WNT et BMP. Cela suggérerait que les deux voies WNT et BMP soient actives pour permettre la différenciation des cellules de l'EPr et de ses dérivés. Cependant, d'autres résultats suggèrent plutôt que la voie BMP soit nécessaire et active alors que la voie WNT devrait être inhibée pour induire cette différenciation en EPr (Graham et al., 2014).

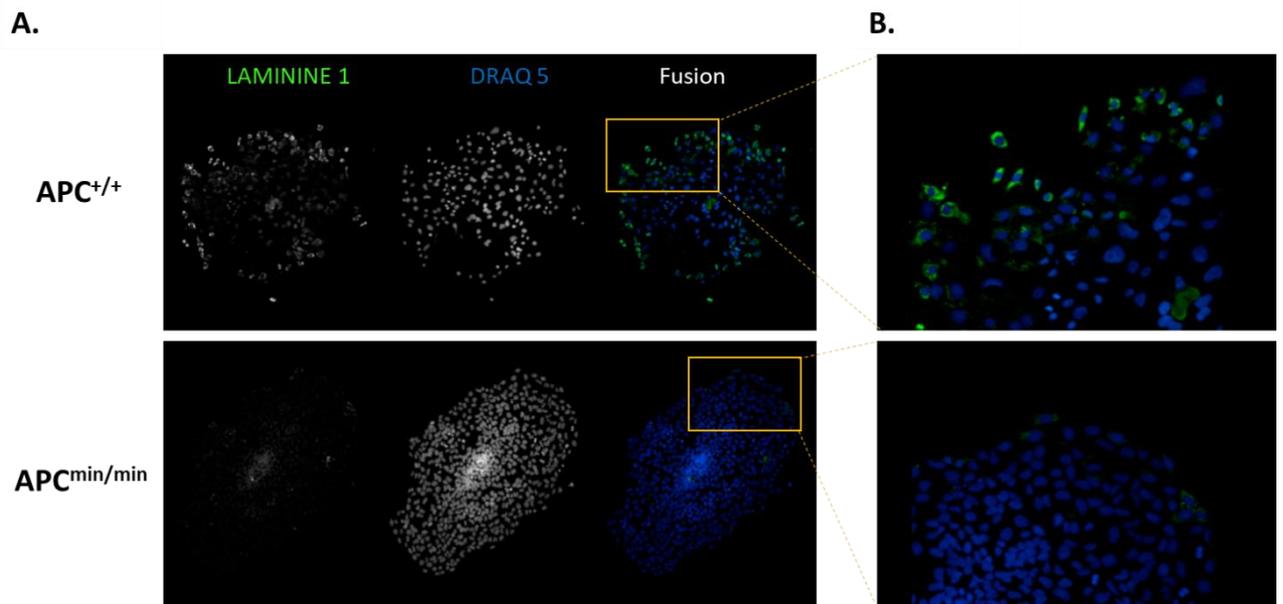
### IV Analyse des doubles homozygotes mutants *Dkk1*/*Noggin* en fond mixte

Des croisements ont été effectués pour obtenir des embryons *Dkk1*<sup>-/-</sup>*Noggin* *LacZ*/*LacZ*.

Les premiers embryons obtenus, dans un fond génétique mixte, par M. GASNIER ont été analysés (2/44embryons) mais seulement un embryon présente, à E4.5, une MCI désorganisée, où les cellules coexprimant OCT4 et GATA6 colonisent une partie de la cavité blastocoelique (**Figure 80**). Or, l'analyse d'un second mutant, ne montre aucun défaut de MCI (**Figure 80**).

Aucun double mutant n'a été obtenu entre E4.75 et E5.0 (0/31). Au stade E5.5, le génotypage a été impossible du fait de la contamination lors de la dissection par du tissu maternel.

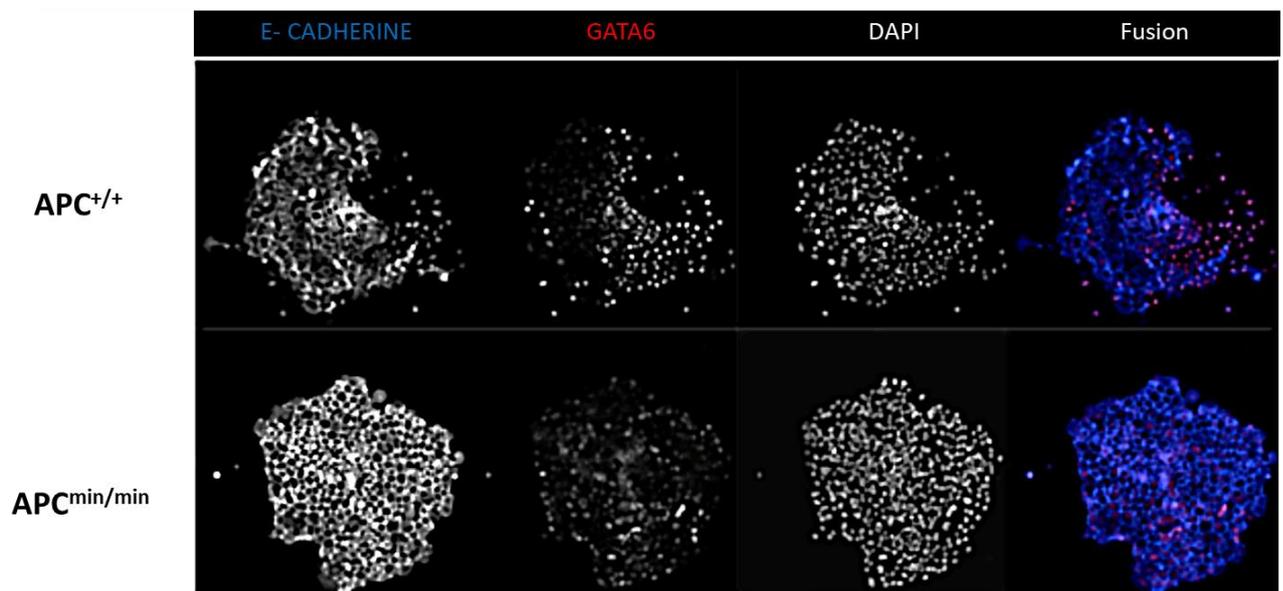
Les travaux réalisés sur les doubles hétérozygotes par *del Barco Barrantes et al* (del Barco Barrantes, 2003) et sur les embryons *Noggin*<sup>+/-</sup> par *Tylzanowski et al* (Tylzanowski et al., 2006) montrent que le fond génétique est crucial pour la sévérité du phénotype. J'ai donc repris ce projet afin de mener à



**Figure 76 : Culture d'explants de MCI sauvages (APC<sup>+/+</sup>) ou mutants (APC<sup>min/min</sup>) cultivés durant 72h en milieu N2B27**

(Réalisée par M. GASNIER).

- A. L'EPr est marqué par la LAMININE1, visualisée en **vert** et les noyaux sont marqués par DraQ5 en **bleu**.  
 B. Une partie de chaque explant a été agrandie (**carrés jaunes**).

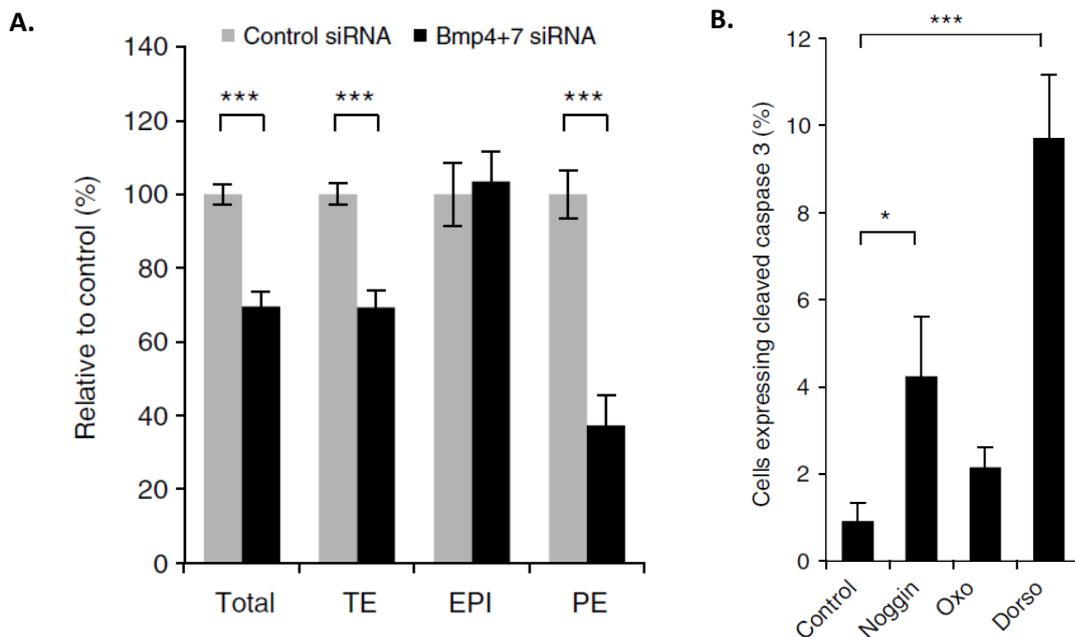


**Figure 77 : Etude de l'épithélisation des explants de MCI sauvages (APC<sup>+/+</sup>) ou mutants (APC<sup>min/min</sup>) cultivés durant 72h en milieu N2B27.**

(Réalisée par M. GASNIER)

L'EPr est marqué par GATA6, visualisée en **rouge** et l'épithélium est visualisé par l'expression de l'E-CADHERINE en **bleu**.

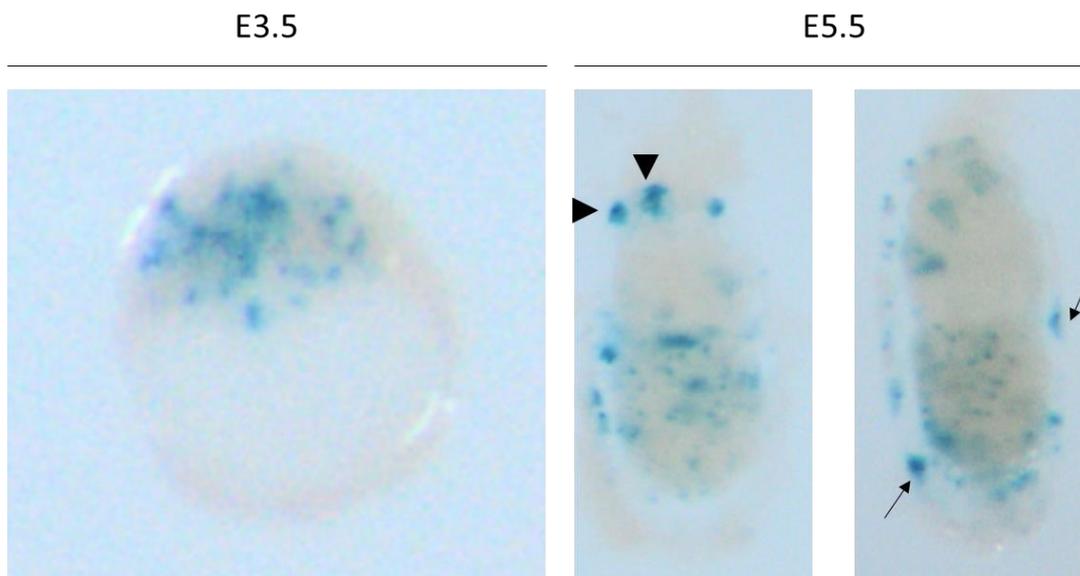
bien l'analyse de ces doubles mutants en fond C57BL6 pur pour plus de pénétrance et de sévérité du phénotype s'il existe.



**Figure 79 : Implication de la voie BMP dans le maintien des lignages TE, EPI et PE au sein des embryons au stade E4.5.**

(Issue de Graham et al 2014)

- A. Les embryons au stade E4.5 ont été traités avec des siARN contrôle (n=13) ou siARN dirigés contre *Bmp4* et *Bmp7* (n=12). Le pourcentage de cellules pour chaque lignage TE, EPI et PE a été déterminé et rapporté au pourcentage obtenu en condition siARN contrôle.
- B. Pourcentage de cellules exprimant la Caspase 3 après traitement avec du NOGGIN recombinant ou de la Dorsomorphine, des inhibiteurs de la voie BMP.



**Figure 78 : Profil d'expression génique de *Noggin***

(Réalisée par M. GASNIER)

Les croisements entre les femelles CD1 et des mâles *Noggin*<sup>+</sup>/LacZ (MacMahon et al 1998) permettent de révéler par marquage X-gal, l'activité du promoteur *Noggin* aux stades E3.5 et E5.5. Au stade E5.5, le  $\beta$ -galactosidase est exprimée au sein des cellules de l'EP (flèches noires) et au sein de la charnière EP/EV (tête de flèches).

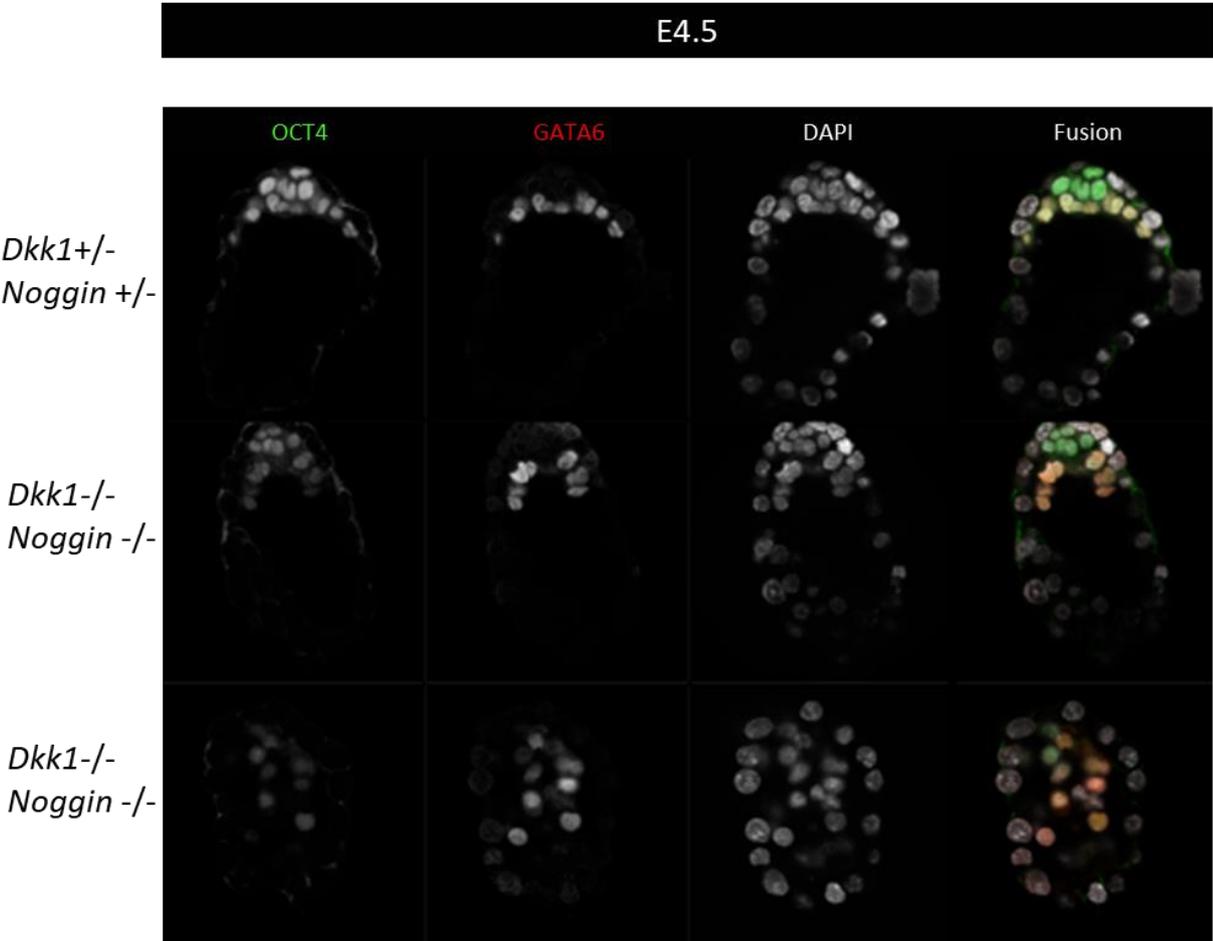
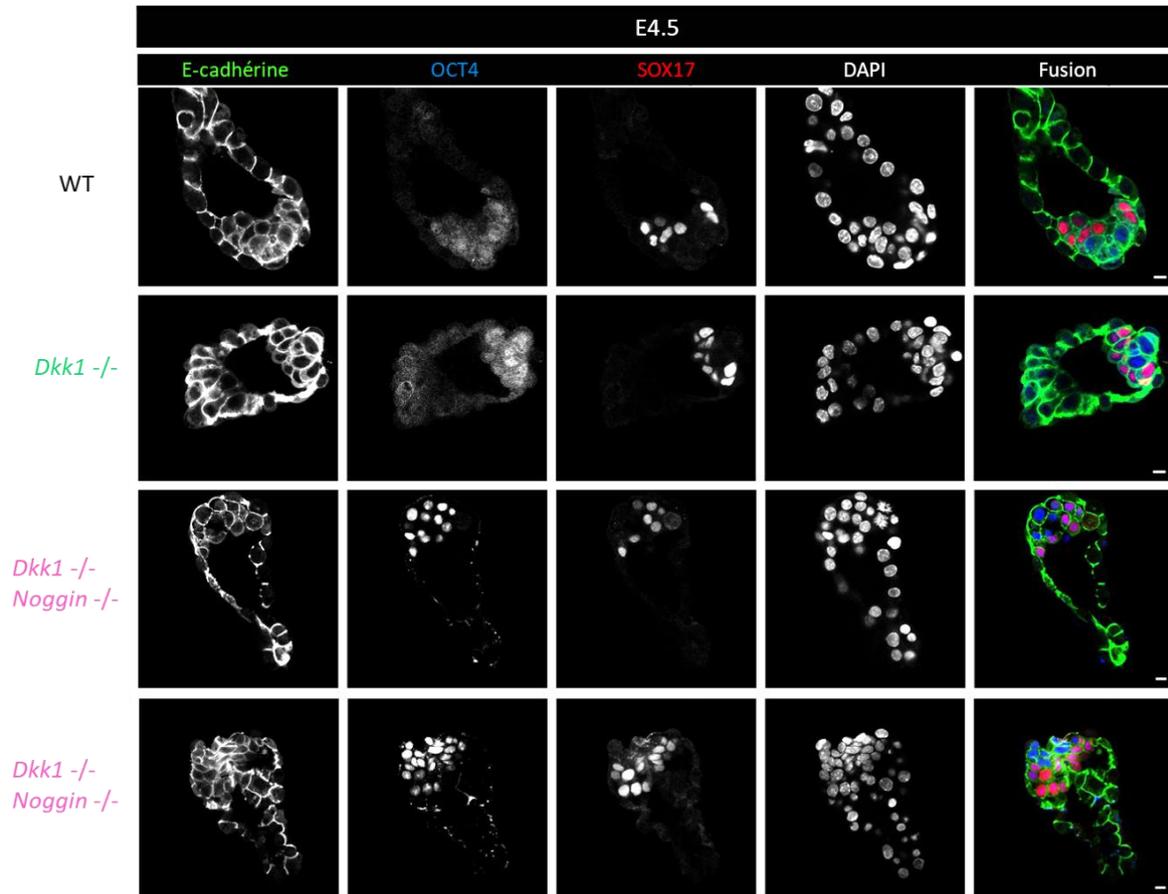


Figure 80 : Phénotypes des embryons doubles mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> en fond mixte au stade E4.5. L'expression des marqueurs d'Epi OCT4 (vert) et d'EPr GATA6 (rouge) sont visualisés.



**Figure 81** Phénotype des embryons doubles mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> en fond C57Bl6 pur au stade E4.5.

L'expression des marqueurs des membranes et jonctions serrées E-CADHERINE(vert), d'Epi OCT4 (bleu) et d'EPr GATA6 (rouge) sont visualisés.

---

## Résultats – Projet 2

---

### I Etablissement de lignées murines en fond C57/Bl6 pur

J'ai ainsi redéveloppé la colonie de souris doubles hétérozygotes en fond pur C57/Bl6 afin de produire par la suite des embryons homozygotes mutants dans ce fond génétique.

De plus, en parallèle, ayant des souris floxées pour le gène *Dkk1*, nous avons décidé d'utiliser des lignées ZP3-Cre afin d'augmenter le nombre d'embryons mutants, puisque l'action de la Cre, sous contrôle du promoteur ZP3, a lieu durant l'ovogenèse. Ainsi, j'ai tenté d'obtenir des souris femelles triples mutantes *Dkk1<sup>F/-</sup> Noggin<sup>+LacZ</sup> Cre<sup>+</sup>* afin de les croiser avec des mâles au moins *Dkk1<sup>+/-</sup> Noggin<sup>+LacZ</sup>*. Cependant, seulement une seule femelle a été obtenue et son état vital s'est rapidement dégradé ne permettant pas son accouplement.

Par conséquent, des croisements classiques utilisant des femelles doubles hétérozygotes *Dkk1<sup>+/-</sup> Noggin<sup>+/-</sup>* ont été réalisés afin de prélever des embryons aux stades E4.5 et E4.75.

J'ai réalisé des immuno-marquages afin d'observer la répartition de chaque lignage au sein des embryons avec les marqueurs suivant : SOX17 marqueur de l'EPr en début de maturation, l'E-cadhérine marqueur membranaire et molécule d'adhésion épithéliale et enfin OCT4, marqueur spécifique de l'Epi à partir du stade E4.5. Ces marqueurs permettent de distinguer différents types de populations : des cellules SOX17+OCT4-, spécifiées et différenciées en EPr qui n'expriment pas OCT4; les cellules OCT4+SOX17-, spécifiées et différenciées en Epi qui n'expriment pas SOX17 et des cellules OCT4+SOX17+ co-exprimant les deux marqueurs. L'E- CADHERINE permet de voir si les jonctions membranaires sont correctement établies et permet, avec le DAPI, de faciliter le comptage du nombre de cellules totales afin de déduire le nombre de cellules du TE.

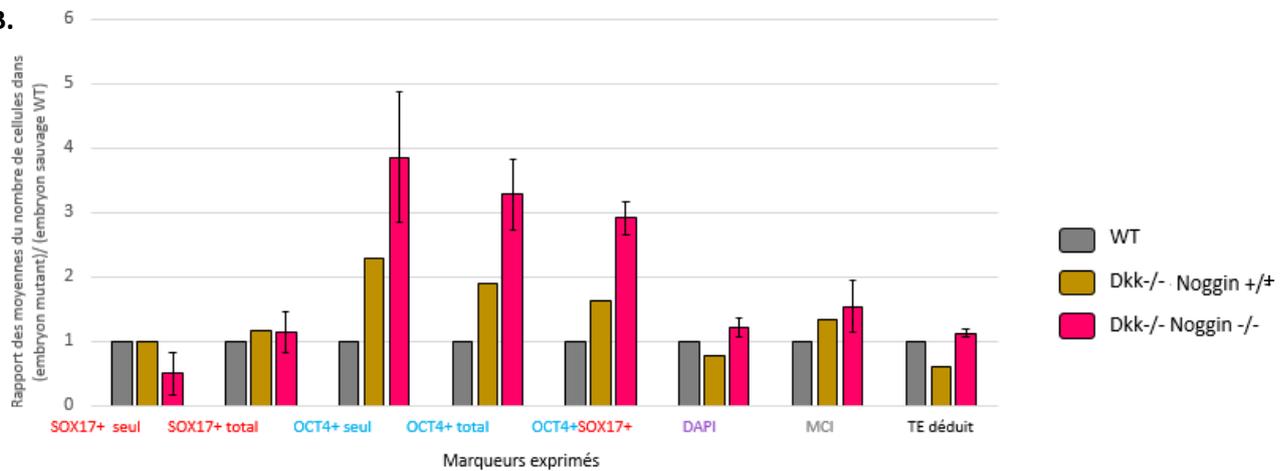
L'observation générale des embryons mutants des différents génotypes montre que chaque embryon exprime OCT4, SOX17 et l'E- CADHERINE aux stades 4.5 (**Figure 81**). Des marquages similaires sont obtenus au stade E4.75 (*données non montrées*). Ainsi, à l'œil, on peut observer une co-expression des marqueurs SOX17 et OCT4, correspondant à la population OCT4+SOX17+, plus forte dans certains embryons (**Figure 81**).

Par conséquent, les cellules ont été comptées pour chaque marqueur. Le tableau récapitulatif de ces comptages est détaillé pour le stade E4.5 (**Figure 82B**) et pour le stade E4.75 (**Figure 83A**). Pour chaque population, les valeurs ont été rapportées à celles des embryons sauvages (valeur de 1 - **Figure 82C, 82D** pour E4.5 et **Figure 83B** pour E4.75).

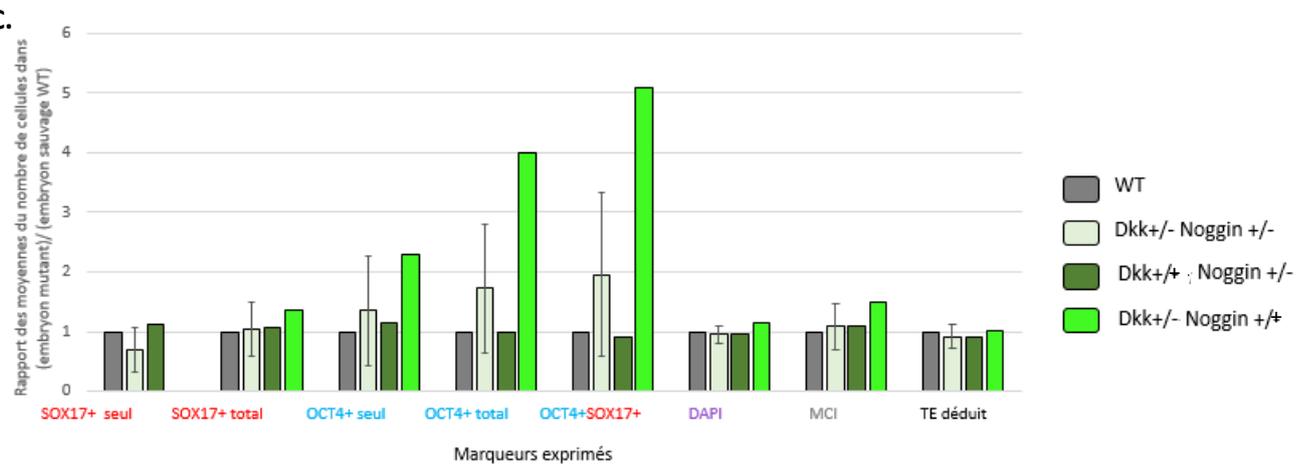
A.

Génotypage	Nombre d'embryon	Sox17+ seul	Sox17+ totale	Oct4+ seul	Oct4+ totales	Co-expression Oct4+ Sox17+	DAPI	ICM	TE déduit
Dkk1+/+ Noggin +/+ (WT)	2	15	20,5	3,5	9	5,5	102	24	78
Dkk+/- Noggin +/-	4	10,5	21,25	4,75	15,5	10,75	97,5	26	71,5
Dkk +/+ Noggin +/-	1	17	22	4	9	5	98	26	72
Dkk-/- Noggin +/+	1	0	28	8	36	28	116	36	80
Dkk-/- Noggin +/+	1	15	24	8	17	9	79	32	47
Dkk-/- Noggin-/-	2	7,5	23,5	13,5	29,5	16	124,5	37	87,5

B.



C.



**Figure 82 : Phénotype observé pour chaque génotype pour chaque lignage au stade E4.5.**

- Tableau récapitulatif des comptages du nombre de cellules pour chaque lignage.
- Graphique des rapports entre le nombre de cellules comptées dans les embryons mutants (*Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggn*<sup>+/-</sup> et *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup>) et le nombre de cellules comptées en embryon sauvage WT pour chaque lignage. Les écart-types sont indiqués pour les phénotypes pour lesquels plusieurs embryons ont été obtenus.
- Graphique des rapports entre le nombre de cellules comptées dans les autres embryons mutants et le nombre de cellules comptées en embryon sauvage WT pour chaque lignage. Les écart-types sont indiqués pour les phénotypes pour lesquels plusieurs embryons ont été obtenus.

## II Le nombre de cellules exprimant OCT4 est augmenté lorsque *Dkk1* est déplété

On peut constater qu'au stade E4.5, les embryons doubles homozygotes mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> présentent un nombre de cellules du TE similaire au nombre de cellules obtenu pour les embryons sauvages (**Figure 82A et 82B**). De plus, le nombre de cellules de la MCI est augmenté (x1,5 fois) comparé aux embryons sauvages dû au fait que les populations OCT4+SOX17<sup>-</sup> et OCT4+SOX17<sup>+</sup> sont augmentées. En effet, on observe que les embryons doubles homozygotes mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> montrent deux fois plus de cellules OCT4+SOX17<sup>-</sup> et trois fois plus de cellules co-marquées OCT4+SOX17<sup>+</sup> que les embryons sauvages (**Figure 82A et 82B**). Néanmoins, les marqueurs utilisés ne permettent pas de déterminer si la population OCT4+SOX17<sup>+</sup> correspond à une population de cellules précurseurs ou s'il s'agit d'une population de cellules spécifiées en EPr mais non différenciées puisque exprimant encore OCT4. Ainsi, des immunomarquages avec des marqueurs de cellules progénitrices au sein de la MCI tels que SOX2 ou spécifique de l'Epi tel que NANOG seront à utiliser afin de caractériser les cellules de cette population.

Au stade E4.5, l'augmentation de ces deux sous-populations exprimant OCT4 suggère deux hypothèses: (*hypothèse 1*) les cellules OCT4+SOX17<sup>-</sup> ou OCT4+SOX17<sup>+</sup> prolifèrent plus, ou (*hypothèse 2*) la perte de DKK1 empêche les embryons de réprimer OCT4 au sein de la population OCT4+SOX17<sup>+</sup> spécifiée et destinée à se différencier en EPr. Dans les deux cas, un surplus de cellules exprimant OCT4 apparaît (**Figure 82A et 82B**).

L'observation du seul mutant *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>+/-</sup> obtenu à E4.75, montre que l'on augmente les rapports concernant les populations SOX17+OCT4<sup>-</sup> et OCT4+SOX17<sup>-</sup> en diminuant la population co-exprimant OCT4+SOX17<sup>+</sup>. Cela pourrait suggérer que la spécification et la différenciation des lignages a bien lieu (**Figure 82A et 82B**).

Les simples homozygotes mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> présentent un rapport plus élevé de cellules OCT4+SOX17<sup>-</sup> et de cellules co-marquées OCT4+SOX17<sup>+</sup> par rapport aux embryons sauvages (**Figure 82A et 81B**). Ce phénotype est similaire, mais moindre, par rapport aux embryons doubles homozygotes mutants puisque deux fois plus de cellules OCT4+SOX17<sup>-</sup> et de cellules co-marquées OCT4+SOX17<sup>+</sup> sont présentes dans ces embryons doubles homozygotes mutants par rapport aux embryons simples homozygotes mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> (**Figure 81A et 81B**). Un seul embryon *Dkk1*<sup>-/-</sup> a cependant été analysé pour chaque stade E4.5 et E4.75 et on constate qu'au stade E4.75 l'embryon serait plutôt mourant (**Figure 81, 82 et 83**).

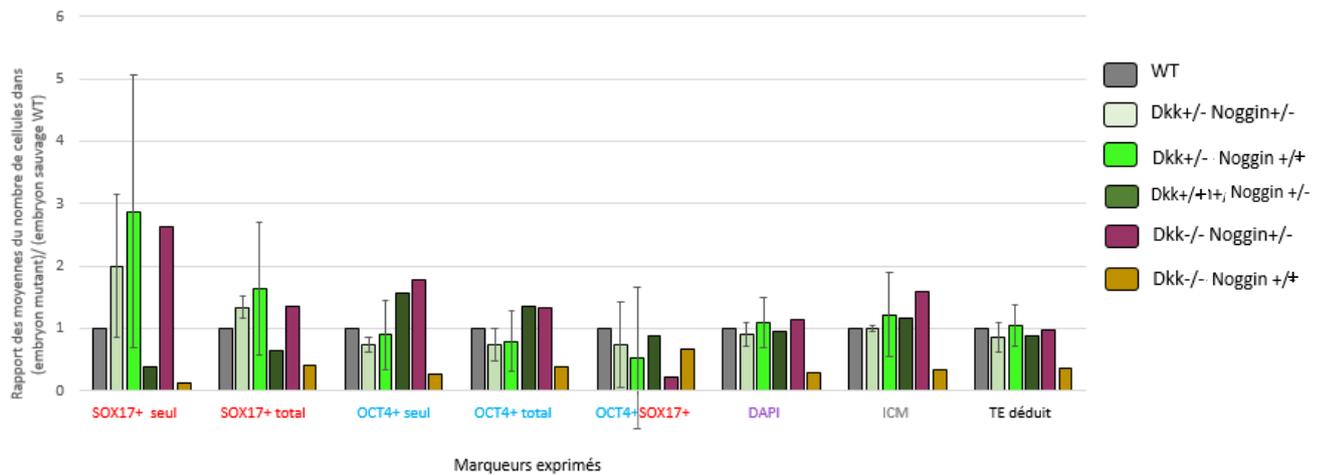
Ainsi, si la perte de DKK1 entraîne un blocage de l'inhibition d'OCT4, on peut penser que DKK1 serait un répresseur d'OCT4 et que cela passerait par l'inhibition de la voie WNT.

L'observation des autres phénotypes obtenus n'est pour le moment pas suffisamment claire. En effet, des variations phénotypiques sont constatées mais le faible nombre d'embryon par génotype

A.

Génotypage	Nombre d'embryon	Sox17+ seul	Sox17+ totale	Oct4+ seul	Oct4+ totales	Co-expression Oct4+ Sox17+	DAPI	ICM	TE déduit
Dkk1+/+ Noggin +/+ (WT)	4	8	17	22,5	31,5	9	145	39,5	105,75
Dkk+/- Noggin +/-	3	16	22,66	16,66	23,33	6,66	131,66	39,33	90,66
Dkk+/- Noggin +/+	3	23	27,8	20,2	25	4,8	158,6	48	110,6
Dkk1+/+ Noggin +/-	1	3	11	35	43	8	138	46	92
Dkk-/- Noggin +/-	1	21	23	40	42	2	166	63	103
Dkk-/- Noggin +/+	1	1	7	6	12	6	41	13	38

B.



**Figure 83 : Phénotype observé pour chaque génotype pour chaque lignage au stade E4.75.**

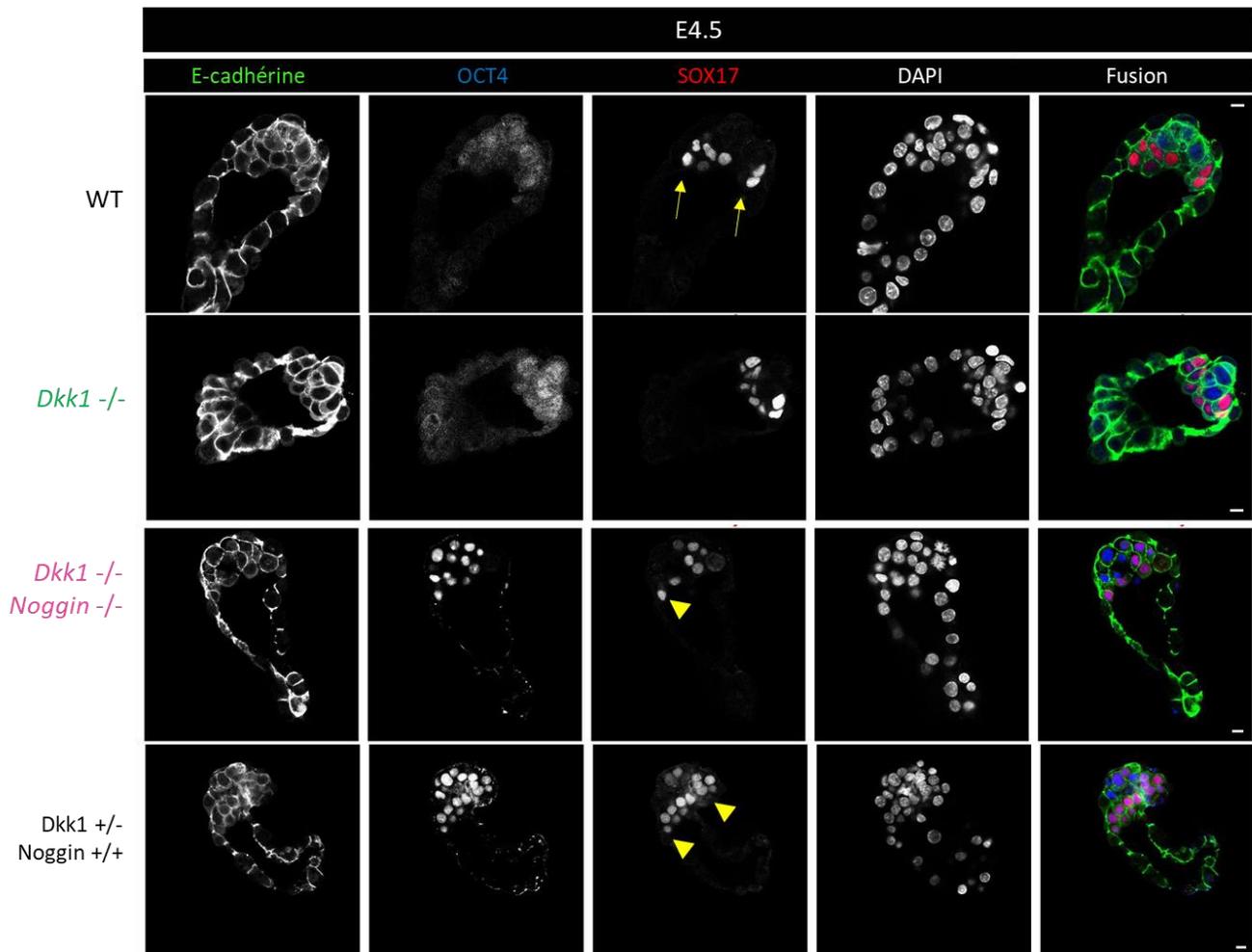
- Tableau récapitulatif des comptages du nombre de cellules pour chaque lignage
- Graphique des rapports entre le nombre de cellules comptées dans les embryons mutants et le nombre de cellules comptées en embryon sauvage WT pour chaque lignage. Les écart-types sont indiqués pour les phénotypes pour lesquels plusieurs embryons ont été obtenus.

ne permet pas de conclure pour le moment et nécessite d'augmenter le nombre d'embryon (**Figure 82B et 82C**).

Il semble se dégager le fait que DKK1 pourrait être impliqué dans le contrôle et notamment la répression, de l'expression d'OCT4, avec un potentiel effet dose finement régulé à la fois par chacun de ses deux allèles et renforcé par la perte de *Noggin*, au stade E4.5.

### **III La déplétion de *Dkk1* entrainerait-elle un effet sur la migration des cellules d'EPr ?**

On peut aussi observer que certaines cellules exprimant SOX17+ OCT4- au sein des embryons sauvages WT débutent leur migration le long du TE au stade E4.5 et E4.75 (**Figure 84**). Or il est observé que DKK1 est exprimé du côté apical des cellules d'EPr et du côté du front de migration de ces cellules (**Figure 84**). Au sein des embryons mutants pour *Dkk1*, comme les embryons *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>+/+</sup>, *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> ou *Dkk1*<sup>+/-</sup> *Noggin*<sup>+/+</sup> ; on peut noter que l'on n'observe pas ou peu de cellules migrantes le long du TE (**Figure 84**). Cela pourrait suggérer que DKK1 soit un acteur contrôlant ou déclenchant cette migration et que son absence bloque celle-ci. Cependant, cette hypothèse reste à vérifier car trop peu d'embryons a été obtenu pour le moment.



**Figure 84 : Phénotype sur la migration des cellules d'EPr des embryons simple mutant *Dkk1*<sup>-/-</sup> et doubles mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> en fond C57Bl6 pur au stade E4.5.**

L'expression des marqueurs de l'Epi OCT4 (bleu), d'EPr SOX17 (rouge) et la molécule d'adhésion membranaire E-CADHERINE (vert) est visualisée.

Les cellules qui ont débutées leur migration le long du TE sont indiquées avec des flèches jaunes; celles qui n'ont pas débuté leur migration sont indiquées par des têtes de flèches jaunes.

---

## Conclusion - Projet 2

---

L'étude des doubles homozygotes mutants, obtenus en fond C57/Bl6 pur, montre que DKK1 pourrait réprimer *Oct4*. De plus, ces embryons présentent un phénotype similaire mais plus sévère que l'embryon simple homozygote mutant *Dkk1*<sup>-/-</sup> suggérant que la perte de NOGGIN renforce les défauts induits par la perte de DKK1.

Il a été montré que la voie WNT joue un rôle en faveur de la pluripotence et que le ligand WNT3a est capable d'induire l'expression d'*Oct4* (Thomson et al., 2011). DKK1 est un antagoniste de la voie WNT donc la répression de DKK1 entraîne une activation de la voie WNT. Ainsi, mes résultats semblent indiquer que DKK1 contrôlerait négativement l'expression d'*Oct4* au travers de la voie WNT. De plus, les résultats obtenus semblent indiquer que la voie WNT devrait être inhibée pour induire la différenciation en EPr.

En revanche, le rôle de NOGGIN reste moindre et semble devoir être combiné à celui de DKK1. De ce fait, on pourrait avoir un phénotype graduel avec un phénotype visible avec la perte seule de DKK1 ou la perte seule de NOGGIN. La perte additionnelle des deux facteurs viendrait alors augmenter la sévérité du phénotype. Différents niveaux de sévérités seraient donc constatés suivant le nombre d'allèles délétés pour chaque gène mais cela reste, bien entendu, à quantifier en augmentant le nombre d'embryons par phénotypes. Le mécanisme de coopération entre DKK1 et NOGGIN n'est donc pour le moment pas défini.



---

## *Discussion et Perspectives – Projet 2*

---

Ce second projet porte sur l'implication des voies WNT et BMP lors de la différenciation des cellules d'EPr. Ainsi, nous nous sommes intéressés à deux régulateurs de ces voies : DKK et NOGGIN.

### **I Importance du fond génétique**

Aucun phénotype préimplantatoire n'a été décrit au sein de la littérature, concernant la perte d'expression de DKK1 ce qui suggère une compensation par un autre facteur. La coopération des signalisations WNT et BMP ont permis d'émettre l'hypothèse que l'inhibiteur de la voie BMP, *Noggin*, serait ce facteur compensateur.

Différentes études ont été réalisées sur simples mutants *Dkk1* ou *Noggin* et sur doubles mutants. Or, il a été montré que la sévérité du phénotype dépend du fond génétique des souris, que cela soit pour *Noggin* ou pour *Dkk1*. En effet, la première étude menée sur *Noggin* a été faite en fond génétique mixte entre des souris 129/Sv et C57/Bl6 (McMahon et al., 1998). L'étude réalisée sur *Dkk1* a été faite en fond C57/Bl6 (del Barco Barrantes, 2003). Les doubles mutants ont été réalisés en croisant ces deux lignées murines et leur fond génétique a été purifié en fond C57/Bl6 (del Barco Barrantes, 2003).

L'étude de *Del Barco Barrantes et al*, réalisée à partir du stade E6.0/ E6.5, a montré que la sévérité du phénotype observée au stade E10.5 dépend du fond génétique. Aucun embryon *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> n'a été obtenu au stade E6.5. De plus, des différences ont été observées entre les phénotypes constatés dans les études précédentes de *McMahon et al* et *Mudkhopadhyay et al* et dans l'étude de *Del barco Barrantes et al*. Pour exemple, les mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>+/-</sup> de chez *Del Barco Barrantes et al* montrent le même phénotype que les embryons simples homozygotes *Dkk1*<sup>-/-</sup> de chez *Mudkhopadhyay et al* (del Barco Barrantes, 2003; Mukhopadhyay et al., 2001). Cependant, les embryons *Dkk1*<sup>+/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> de chez *Del Barco Barrantes et al* présentent un phénotype beaucoup plus sévère de défauts de structures antérieures que le simple mutant *Noggin*<sup>-/-</sup> de chez *McMahon et al* (del Barco Barrantes, 2003; Mukhopadhyay et al., 2001). Cela met en évidence un effet dose de la perte d'un ou plusieurs allèle de ces gènes *Dkk1* et *Noggin*.

Dans notre équipe, avant mon arrivée au laboratoire, les souris doubles hétérozygotes *Dkk1*<sup>+/-</sup> *Noggin*<sup>+/-</sup> étaient en fond génétique mixte. Seulement deux embryons *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> ont été isolés au stade E4.5, et la faible pénétrance n'a pas permis de conclure quant à la coopération potentielle de DKK1 et NOGGIN à ces stades embryonnaires. Ainsi, j'ai purifié les lignées murines mixtes en fond C57/Bl6 pur afin d'obtenir des résultats plus clairs.



## II Phénotype des embryons *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup>

J'ai observé que les deux embryons doubles homozygotes mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> obtenus en fond C57/Bl6 pur présentent le même phénotype : le nombre de cellules des sous-populations co-marquées OCT4+SOX17+ et OCT4+SOX17- est augmenté comparé aux embryons sauvages.

La double délétion semble affecter l'expression d'OCT4 qui pourrait être contrôlée par les facteurs DKK1 et NOGGIN. La sévérité du phénotype de ces embryons doubles homozygotes mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> est plus importante que celle observée pour l'unique embryon isolé simple homozygote mutant *Dkk1*<sup>-/-</sup>. Cela suggère que la perte de NOGGIN ajoute un degré de sévérité supplémentaire au phénotype comparé à celui provoqué par la perte de DKK1 seul. Ainsi, la perte de DKK1 ou NOGGIN seuls reflèterait un niveau de sévérité du phénotype qui serait augmenté à un niveau supérieur lorsque ceux-ci sont déplétés ensemble. Désormais, il est nécessaire d'augmenter le nombre d'embryons mutants pour chaque génotype afin de confirmer cela.

## III Identité des cellules qui expriment OCT4

Deux hypothèses sont envisagées pour expliquer le nombre plus élevé de cellules exprimant OCT4 au sein de la MCI des embryons doubles homozygotes mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup>.

La première hypothèse est que les cellules exprimant OCT4 sont soit des cellules précurseurs de la MCI soit des cellules spécifiées correctement en Epi présentant une prolifération augmentée, ce qui, par conséquent, augmente leur nombre. La seconde hypothèse est que la perte de DKK1 retarde la répression OCT4. Dans les deux cas, un surplus de cellules exprimant OCT4 apparaît. S'il on est en présence d'une augmentation de la prolifération des cellules (*hypothèse 1*), on devrait voir une augmentation de la sous-population OCT4+SOX17- uniquement. Or, s'il s'agit d'un blocage de la répression d'OCT4 (*hypothèse 2*), les cellules vont se diriger vers un destin Epi avec une augmentation à la fois des populations OCT4+SOX17+ et OCT4+SOX17-. Cette seconde hypothèse semble être privilégiée puisque ces deux sous-populations sont sur-représentées suggérant plutôt un effet sur la répression d'OCT4.

Le maintien d'expression d'OCT4 vient à poser la question de l'identité de ces cellules OCT4 positives (OCT4+SOX17- ou OCT4+SOX17+). En effet, OCT4 est un marqueur clé de la pluripotence et il est connu qu'un niveau précis d'expression d'OCT4 permet le maintien de la pluripotence alors que une augmentation ou une diminution de ce niveau d'expression, contrôle, *via* des co-facteurs différents, l'engagement des cellules dans un lignage précis (Niwa et al., 2000). *In vitro*, la répression d'OCT4 dans les cellules ES conduit à la différenciation des cellules en TE alors qu'une augmentation d'environ 50% du niveau d'expression d'OCT4 conduit à l'adoption d'un destin d'endoderme primitif et de mésoderme (Niwa et al., 2000). Par conséquent, les variations du niveau d'expression d'OCT4



tendent à diriger les cellules vers un programme de différenciation différent suggérant le rôle d'OCT4 dans le contrôle de l'engagement cellulaire.

Au sein des embryons doubles homozygotes mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup>, l'augmentation des cellules doubles marquées OCT4+SOX17+ pourrait nous indiquer un problème dans l'engagement des cellules vers un destin Epi ou EPr. Ces cellules pourraient être restées au stade de précurseurs. Il serait donc intéressant de réaliser des immuno-marquages avec d'autres marqueurs comme SOX2, marqueur le plus précoce des précurseurs de la MCI et du destin Epi ; NANOG, marqueur spécifique des cellules de l'Epi ; GATA6, marqueur précoce de l'EPr et enfin CDX2, marqueur du TE. Cela nous permettrait de classer les cellules en différentes catégories (comme : SOX2+OCT4+SOX17- ; SOX2+OCT4+ SOX17+ ; SOX2-OCT4+ SOX17+ ou SOX2-OCT4-SOX17+) et de caractériser l'identité de ces cellules afin de savoir s'il s'agit de cellules précurseurs qui prolifèrent ou de cellules spécifiées en EPr précoce dans lesquelles OCT4 ne serait pas réprimé

La sous-population de cellules Epi OCT4+ seul est elle aussi augmentée. Ainsi, il serait intéressant de voir si le maintien d'OCT4 produit un biais vers un destin Epi. Cependant, au vu de l'augmentation du nombre de cellules de la MCI, il sera difficile de déterminer si ce biais existe vraiment. Si tel est le cas, on pourrait voir diminuer en conséquence le nombre de cellules EPr. Cela semble être le cas dans les embryons doubles homozygotes mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup>. Cependant, le seul embryon simple homozygote mutant *Dkk1*<sup>-/-</sup> ne présentent pas de diminution du nombre de cellules EPr exprimant SOX17 mais un seul embryon ne permet pas de conclure précisément quant à l'existence de ce biais potentiel. Il est donc nécessaire d'observer le devenir de ces cellules OCT4+ afin de voir si elles sont maintenues avec un nombre inchangé ou une prolifération plus forte *via* des expériences de marquage avec du Ki67 ou si elles sont éliminées, du fait de leur trop grand nombre, par apoptose, *via* des expériences de TUNNEL. Les expériences au stade E4.75 et à des stades plus précoces pourraient nous aider dans cette analyse.

#### **IV Synergie entre DKK1 et NOGGIN**

Mêmes si mes résultats semblent indiquer que la délétion de DKK1 maintient l'expression d'OCT4 par la voie WNT, le rôle de NOGGIN et sa coopération potentielle avec DKK1 ne sont pour le moment pas déterminés. La délétion seule de DKK1 semble avoir un effet mais la délétion combinée des deux facteurs DKK1 et NOGGIN dans les doubles homozygotes mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> semble avoir un effet encore plus drastique, sur la population exprimant OCT4, au stade E4.5. Cela suggère que si l'inhibition de ces deux inhibiteurs des voies WNT et BMP, engendre un effet de blocage de la répression d'OCT4 ; les deux voies doivent être actives pour permettre la répression d'OCT4. Les résultats obtenus avec le BIO/CHIRON et de traitement au NOGGIN recombinant, montrent que pour



induire la différenciation des cellules en EPr, la voie WNT devrait être inhibée alors que la voie BMP serait activée lors de ce processus (Graham et al., 2014). Par conséquent, on aurait potentiellement deux mécanismes : un mécanisme de coopération des deux voies sur la répression d'OCT4 au sein des précurseurs et un autre mécanisme permettant l'induction de la différenciation des cellules d'EPr au sein des cellules spécifiées dans lequel les deux voies s'antagoniseraient.

Ainsi, il pourrait être envisagé de traiter les embryons *Noggin*<sup>-/-</sup> avec du BIO ou du CHIRON afin de voir si l'on observe le même phénotype qu'au sein des doubles homozygotes mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup>.

Cependant, s'il s'agit d'un phénotype plus subtil, tel que suggéré et observé pour les mutants *Pdgfra* et *Sox17* (Artus et al., 2010, 2011), nous devons envisager de retarder le développement des embryons afin d'observer sur un temps plus long et plus séquentiel des événements rapides. L'induction de diapause artificielle peut permettre cela. En effet, l'événement naturel de diapause se produit lorsque la femelle est encore en lactation mais il peut être provoqué artificiellement par traitement hormonal ce qui permet de bloquer les embryons au moment de l'implantation au stade E4.5.

Enfin, il est nécessaire et primordial d'analyser un plus grand nombre d'embryons pour confirmer les résultats obtenus.

## **V Devenir des cellules d'EPr ; destin EV et EP**

L'effet sur les cellules d'EPr implique d'étudier le devenir de ces cellules et l'impact, à un stade plus tardif, sur leur différenciation en EP ou EV. Peu de données sont connues à propos de cette différenciation. Un des processus clé dans cette différenciation est la migration des cellules qui pourrait influencer le devenir des cellules suivant leur position et leur contact avec les cellules voisines.

Ainsi, il serait envisagé de caractériser les cellules débutant leur migration et constituant la charnière EV/EP. Cela impliquerait d'étudier, plus en détail, la localisation polarisée de DKK1 afin de voir si celle-ci perdure au front de migration des cellules d'EP ainsi que le déplacement/position des cellules d'EP ce qui permettra peut-être d'étudier l'implication de la voie non canonique WNT/PCP lors de la migration de ces cellules (LaMonica et al., 2009). Enfin, des expériences d'immunomarquage de marqueurs de la polarité tels que DAB2, LRP2 ou aPKC pourraient nous permettre de voir si les cellules sont correctement polarisées et débutent une migration ou pas.



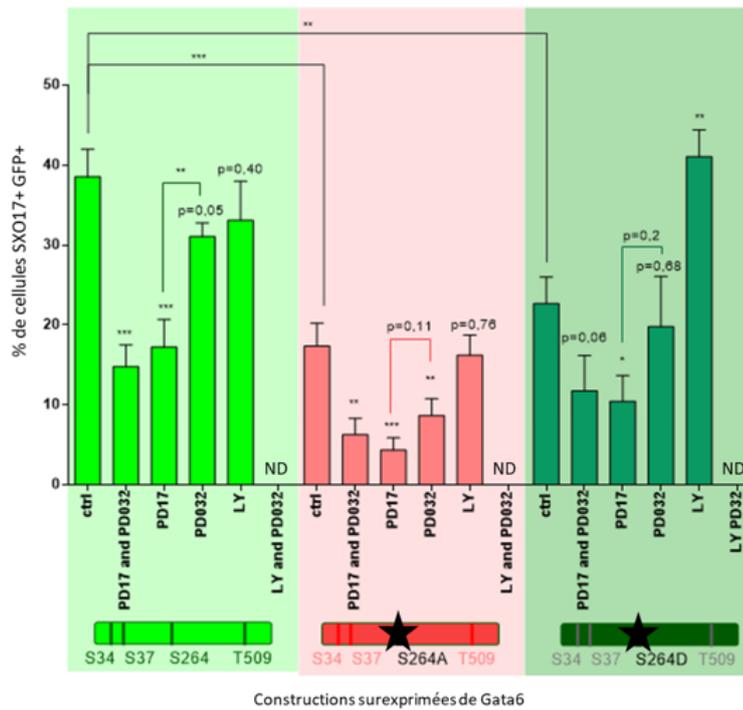
---

*ANNEXES PROJET 1*

---

Expression de SOX17 au sein des cellules transfectées GFP+ en 32h

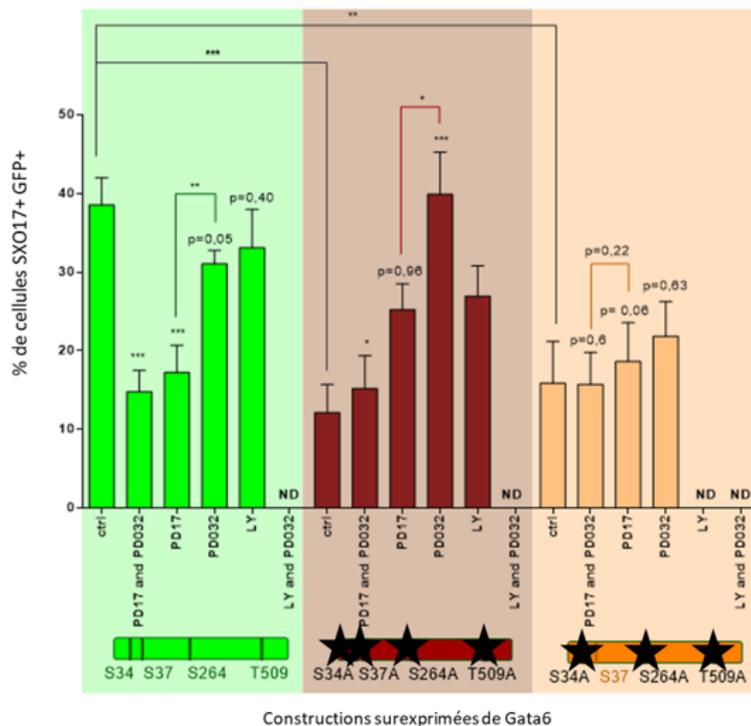
**A.**



Constructions surexprimées de Gata6

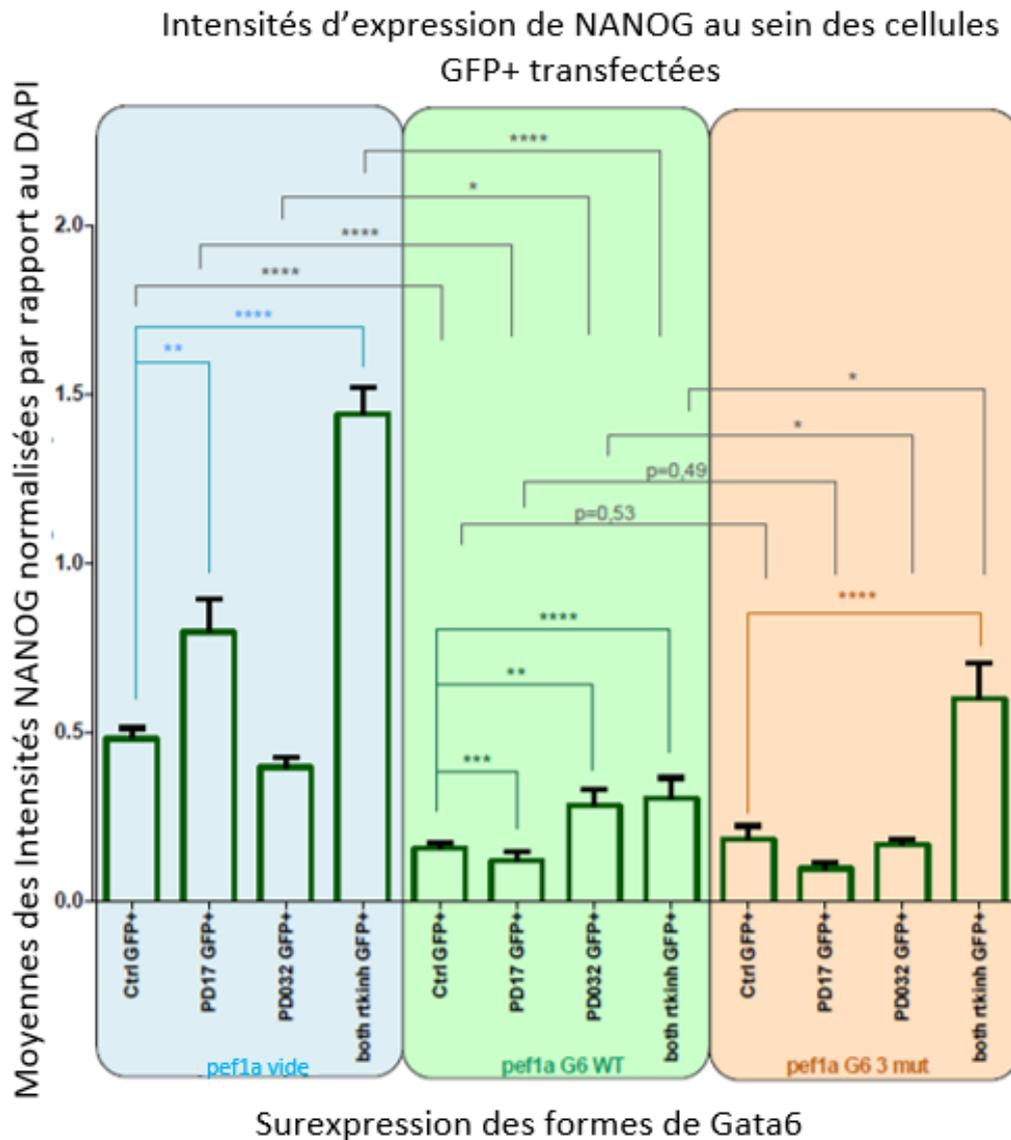
**B.**

Expression de SOX17 au sein des cellules transfectées GFP+ en 32h

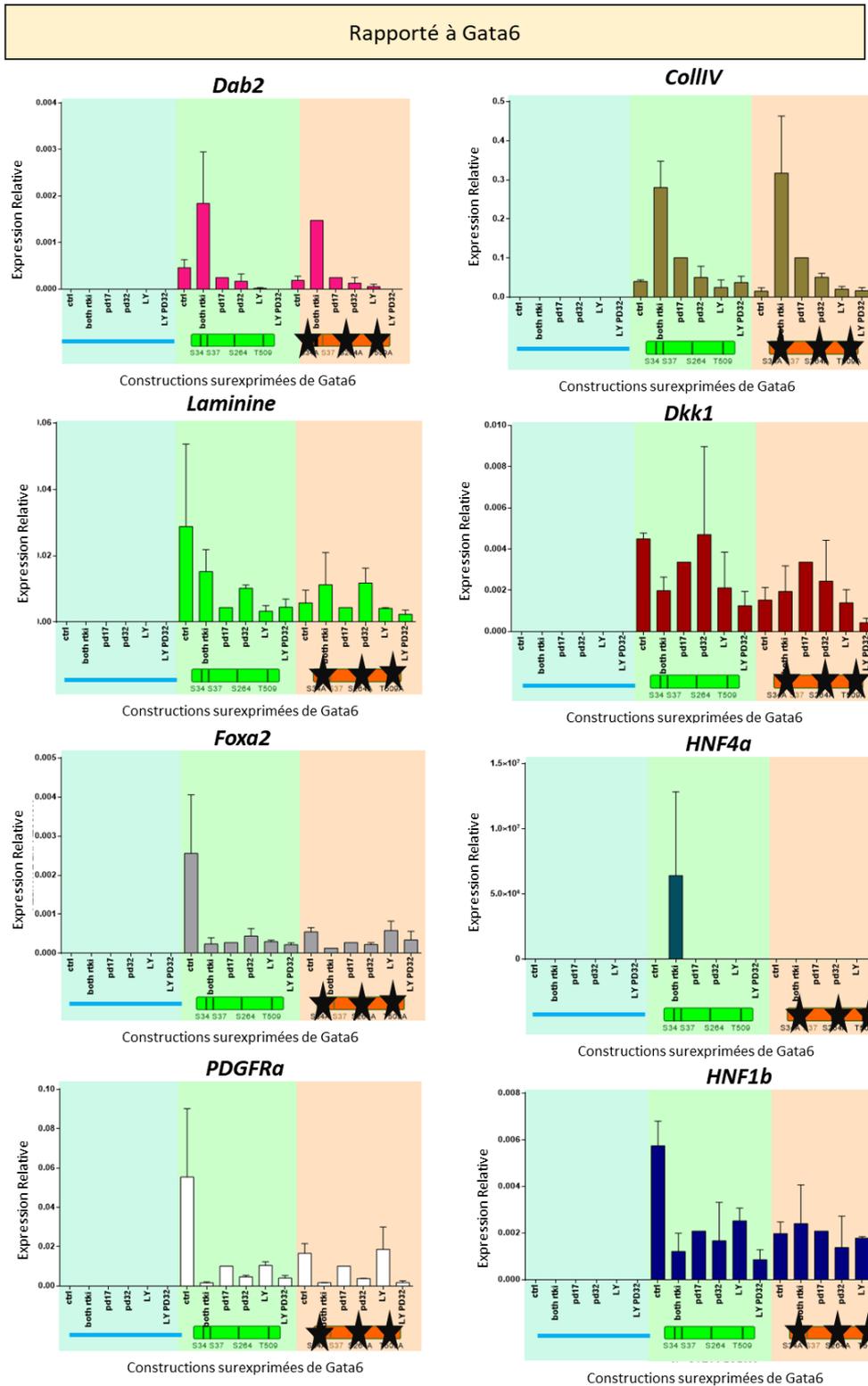


Constructions surexprimées de Gata6

**Figure ANNEXE 1:** Pourcentage de cellules exprimant SOX17 parmi la population de cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> transfectées GFP+ et traitées avec des inhibiteurs de la signalisation RTK-FGF, après 32h de surexpression des différentes formes de *Gata6*. Une expérience a été réalisée (n=1). Les résultats ont été représentés suivant la moyenne entre chaque pourcentage de chaque image (n=10 images/conditions) ± SEM. La significativité statistique des résultats a été testée par un T-test et est indiquée sur le graphique: (T-Test \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001, \*\*\*\*P<0,0001)).



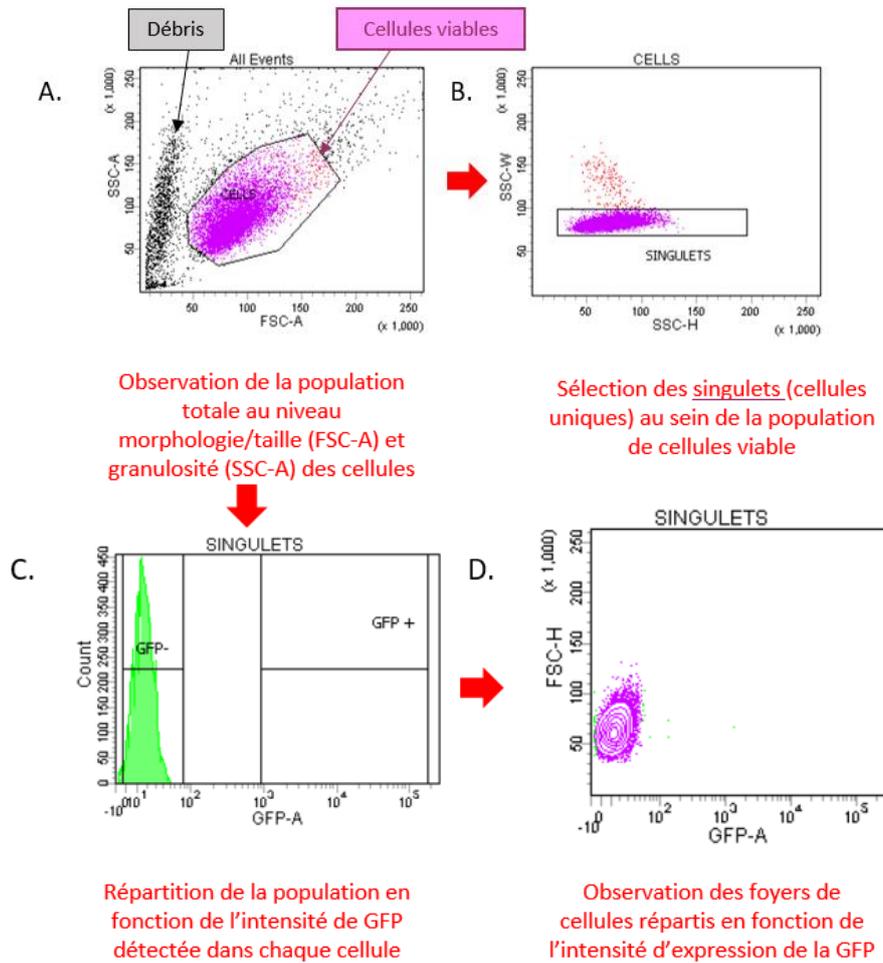
**Figure ANNEXE 2:** Intensité de signal pour NANOG au sein des cellules GFP+ transfectées après 24h de surexpression des formes *Pef1a vide*, *Gata6 WT* ou *Gata6 3mut* en fonction des différents traitements aux inhibiteurs de la voie RTK-FGF appliqués. La normalisation de l'intensité du signal NANOG a été réalisée par rapport à l'intensité du signal DAPI. Les résultats ont été représentés suivant la moyenne entre chaque valeur d'intensité NANOG pour chaque cellule (n=10 images/conditions) ± SEM.



**Figure ANNEXE 3:** Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes de différenciation de l'EPr, après 24h de surexpression des plasmides *Pef1a* vide, *Gata6* WT et *Gata6* 3mut.

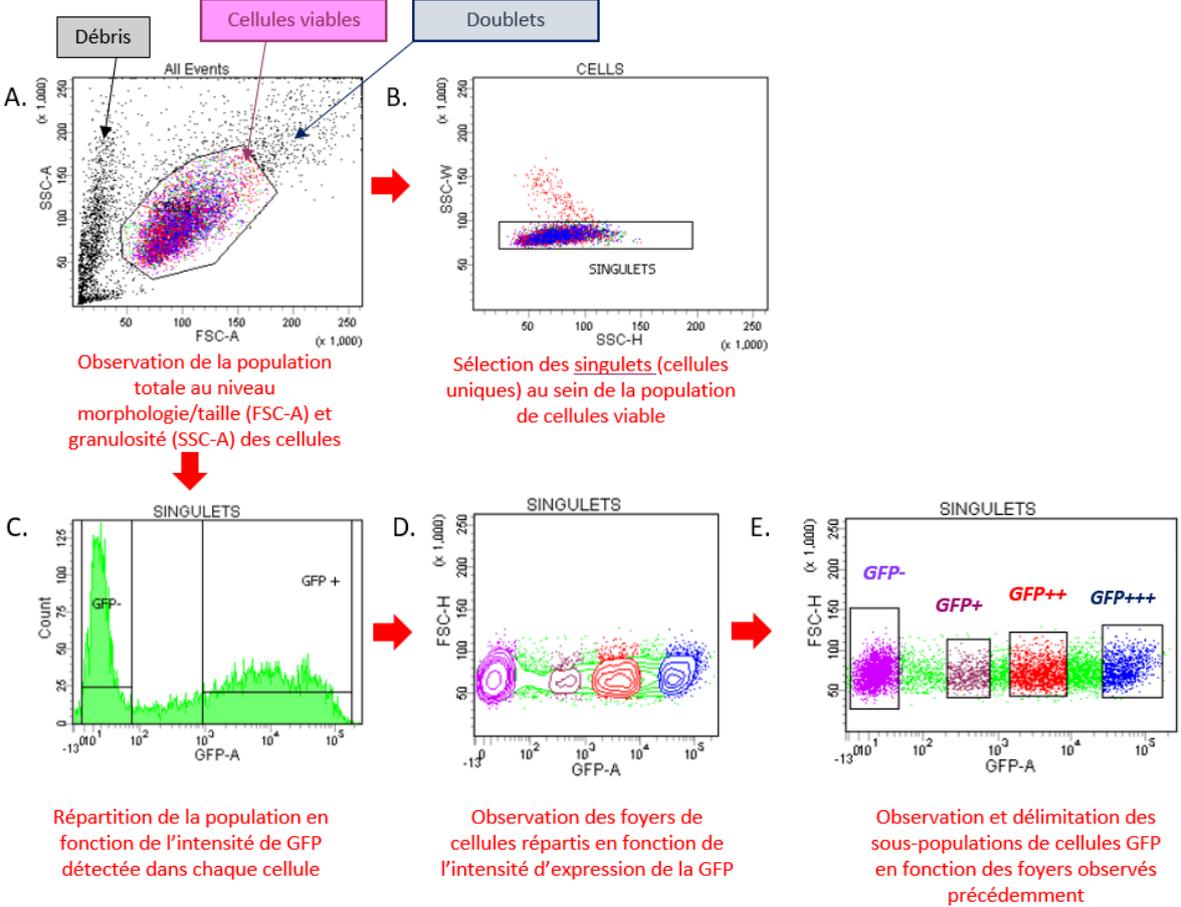
Un rapport a été réalisé entre ces valeurs normalisées par rapport aux gènes de ménage et la valeur normalisée obtenue pour *Gata6* (plasmide) pour chaque condition. Les graphes représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Deux réplicats ont été réalisés (n=2). « Both RTKi » = PD17 + PD32

## Sans transfection

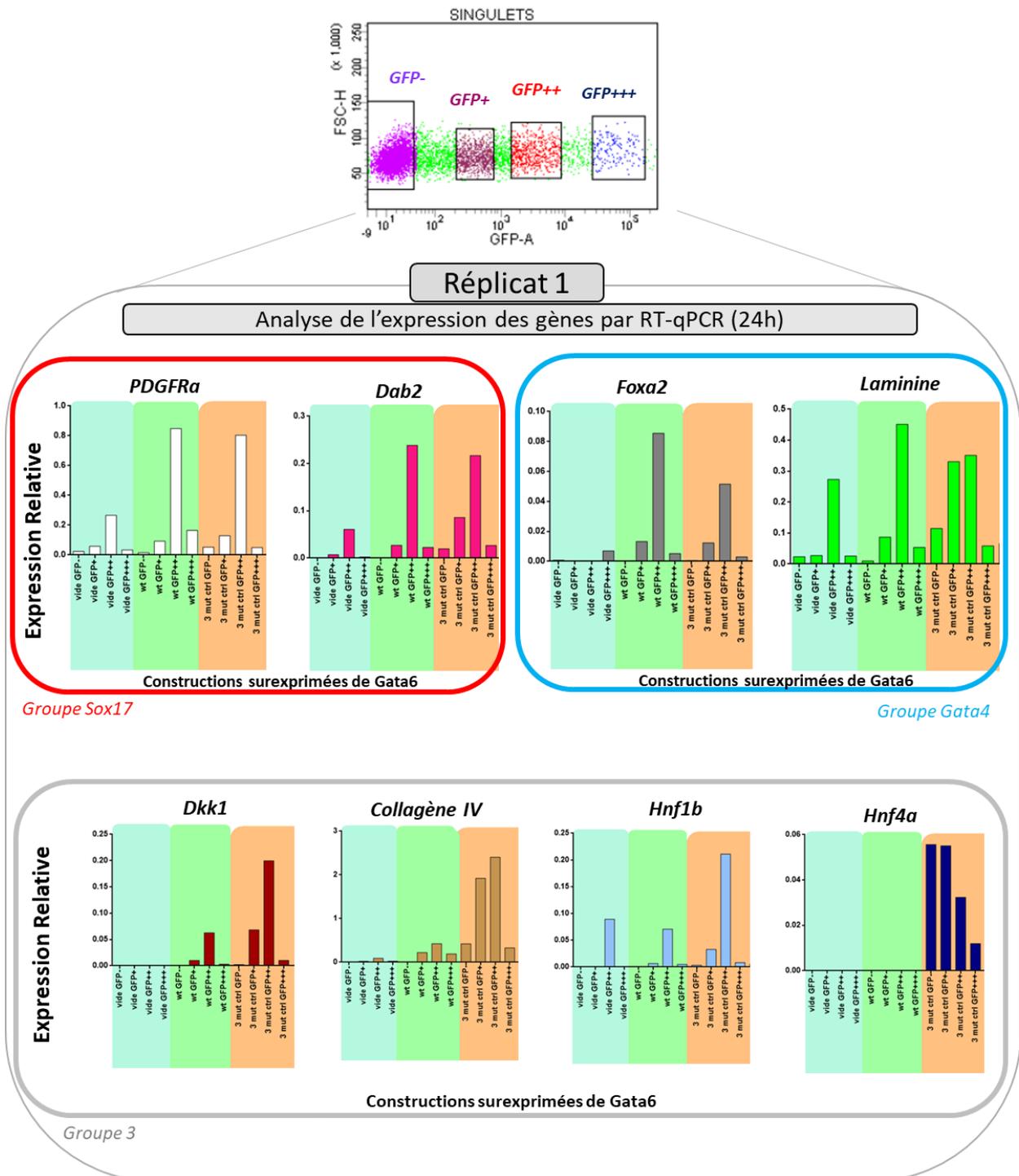


**Figure ANNEXE 4:** Détail des réglages pour le tri des cellules au FACS ARIA II dans les cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> sans transfection.

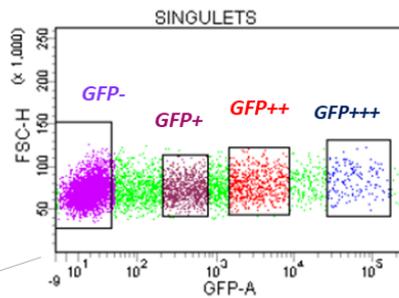
Surexpression du plasmide *Pef1a vide* (24h)



**Figure ANNEXE 5:** Détail des réglages pour le tri des cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> au FACS ARIA II en condition de surexpression de *Pef1a vide* après 24h.



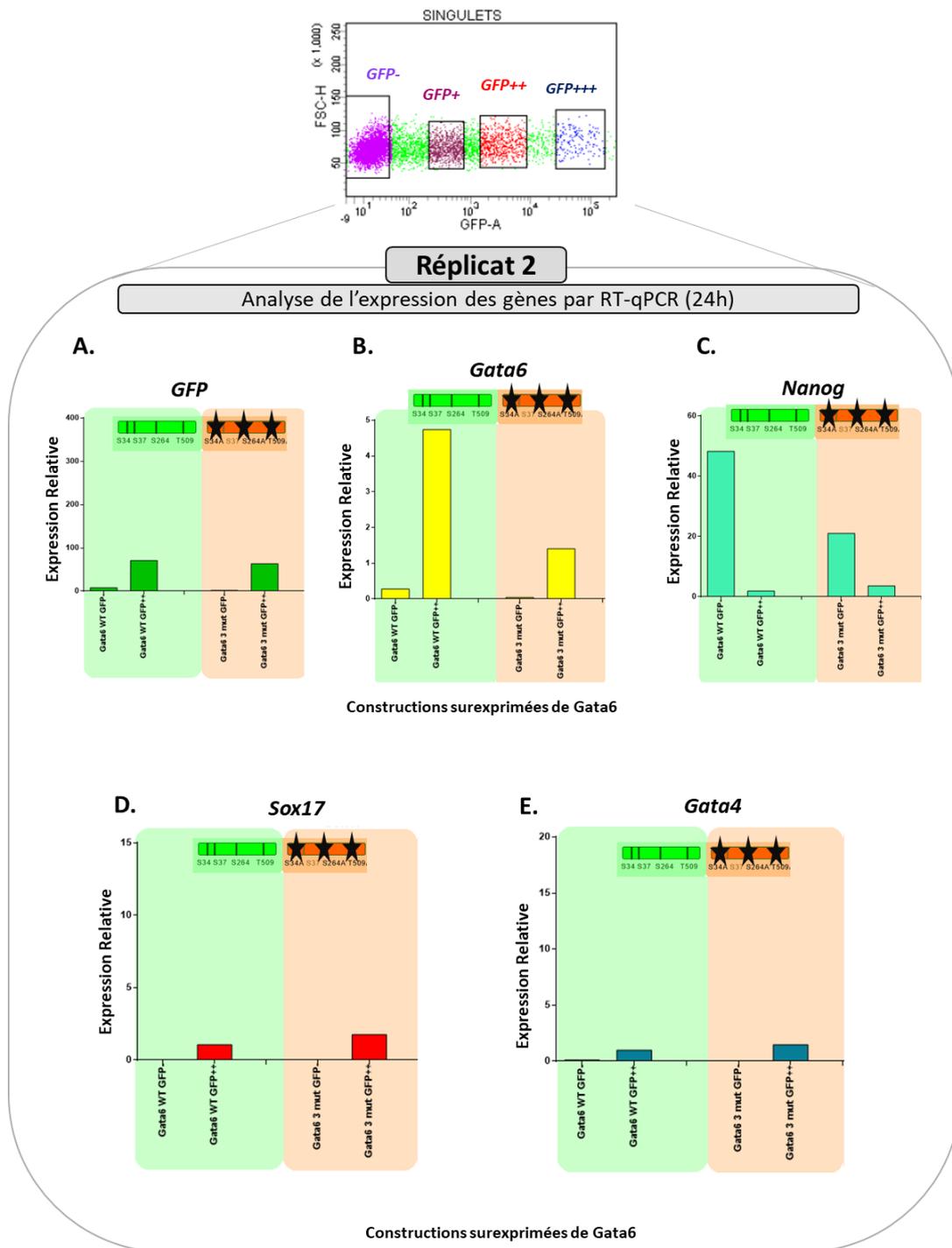
**Figure ANNEXE 6:** Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes *PDGFRa*, *Dab2*, *Foxa2*, *Laminine*, *Dkk1*, *CollIV*, *HNF1b* et *HNF4a* après 24h de surexpression des plasmides *Pef1a* vide, *Gata6* WT et *Gata6* 3mut. Les trois groupes ont été classés suivant la similarité des profils d'expression obtenus. La normalisation a été réalisée classiquement avec la moyenne géométrique des gènes de ménages *Rps17* et *Rpl30*. Une expérience a été réalisée ici (n=1).



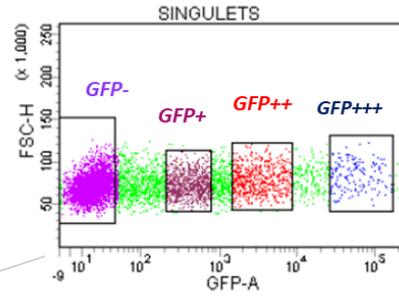
Réplicat 1

		Populations triées	Cellules triées			
			nombre	pourcentage catégories GFP(%)	pourcentage total GFP- et GFP+(%)	
ARN	24h	PEF1a vide Ctrl	GFP-	461086	48,11	51,89
			GFP+	90877	9,48	
			GFP++	235694	24,59	
			GFP+++	170842	17,82	
	24h	Gata6 WT Ctrl	GFP-	690808	71,10	28,90
			GFP+	149672	15,40	
			GFP++	105200	10,83	
			GFP+++	25924	2,67	
	24h	Gata6 3mut Ctrl	GFP-	3412009	76,16	23,83
			GFP+	750998	16,76	
			GFP++	303215	6,74	
			GFP+++	14406	0,32	

**Figure ANNEXE 7:** Nombre de cellules et pourcentage de cellules transfectées obtenus après tri réalisé au cytomètre ARIA II pour l'expérience des Figures 50, 51 et 52 et Figure ANNEXE 6.



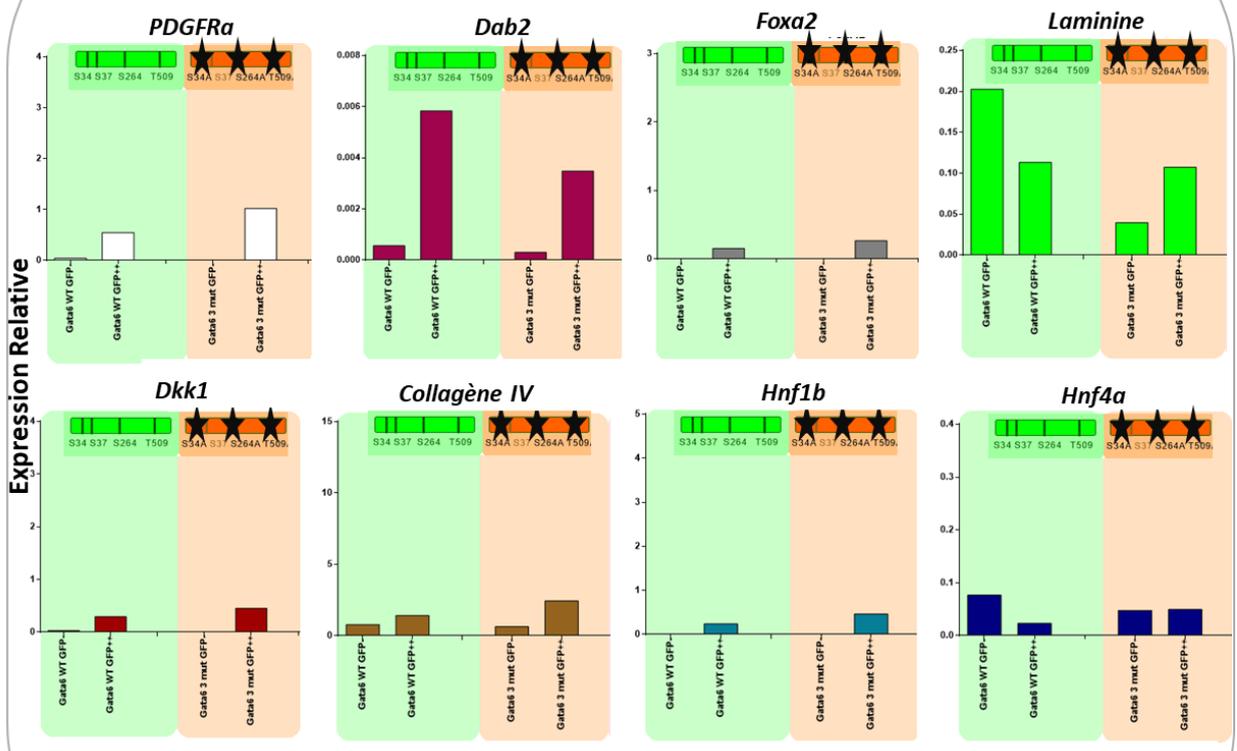
**Figure ANNEXE 8:** Quantification par RT-qPCR de l'expression, en 24h, des gènes *GFP* (A) et *Gata6* (plasmide) (B), *Nanog* (C), *Sox17* (D) et *Gata4* (E) après 24h de surexpression des formes *Gata6 WT* et *Gata6 3mut*. La normalisation a été réalisée classiquement avec la moyenne géométrique des gènes de ménages *Rps17* et *Rpl30*. Une expérience a été réalisée ici (n=1).



A.

**Réplicat 2**

Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR (24h)



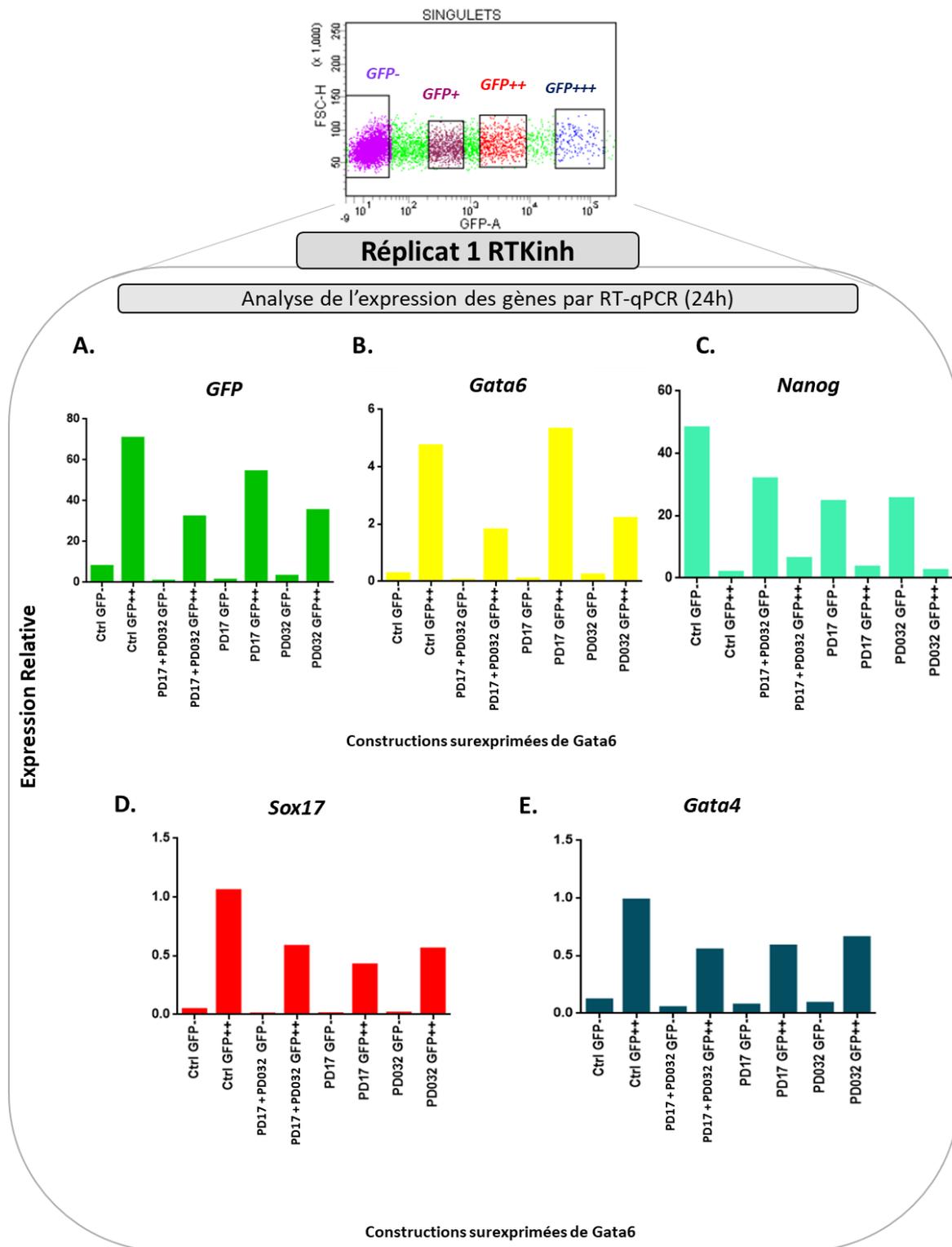
Constructions surexprimées de Gata6

B.

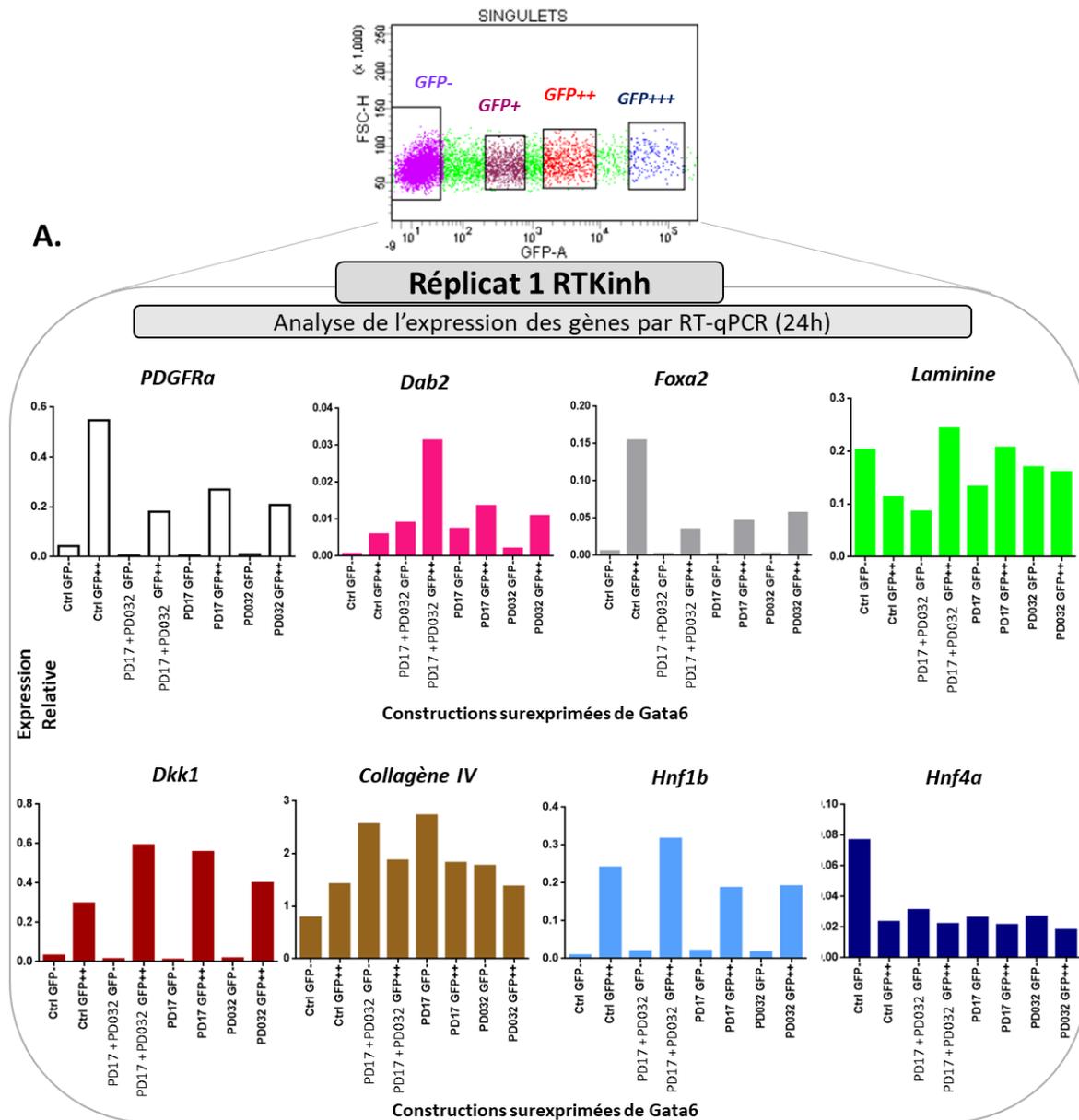
ARN	24h	Populations triées	Cellules triées		
			nombre	pourcentage GFP- et GFP+(%)	
GATA6 WT Ctrl		GFP-	1873166	97,47	
			48476	2,52	
		GATA6 3MUT Ctrl	GFP-	2102312	98,32
				35775	1,67

**Figure ANNEXE 9:**

- A. Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes exprimés dans l'Epr après 24h de surexpression des formes *Gata6 WT* et *Gata6 3mut*. La normalisation a été réalisée classiquement avec la moyenne géométrique des gènes de ménages *Rps17* et *Rpl30*. Une expérience a été réalisée ici (n=1).
- B. Nombre de cellules et pourcentage de cellules transfectées obtenus après tri réalisé au cytomètre ARIA II pour l'expérience de la figure ANNEXE 8 et 9A.



**Figure ANNEXE 10:** Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes *GFP* (A) et *Gata6* (plasmide) (B), *Nanog* (C), *Sox17* (D) et *Gata4* (E) après 24h de surexpression de *Gata6 WT* avec ou sans traitement aux inhibiteurs de la voie RTK-FGF. La normalisation a été réalisée classiquement avec la moyenne géométrique des gènes de ménages *Rps17* et *Rpl30*. Une expérience a été réalisée ici (n=1).

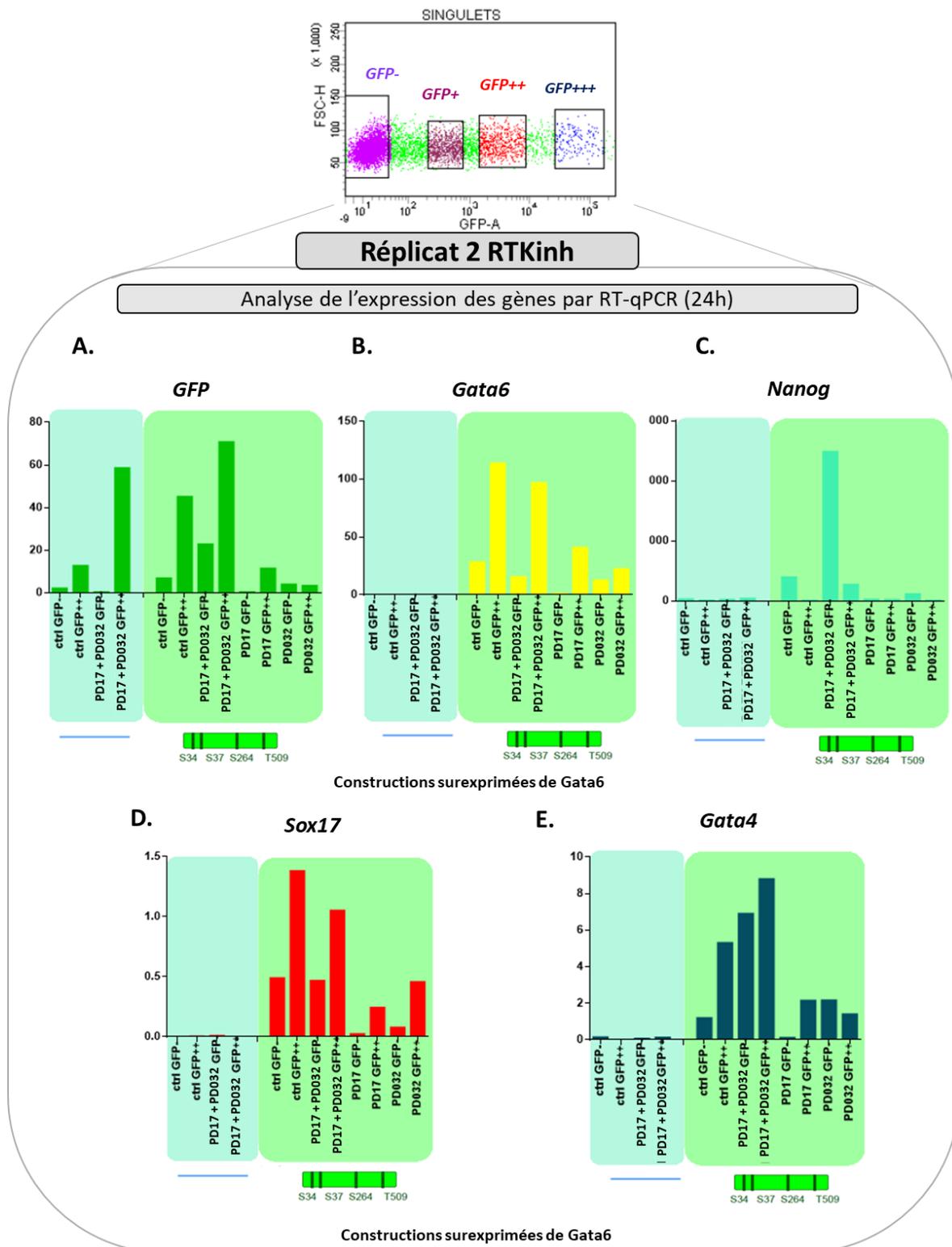


**B.**

ARN	24h	Populations triées	Cellules triées	
			nombre	pourcentage GFP- et GFP+(%)
			G6 WT Ctrl	GFP-
		GFP++	48476	2,52
	G6 WT + PD17	GFP-	1769202	98,51
		GFP++	26672	1,48
	G6 WT + PD032	GFP-	1957306	97,69
		GFP++	46146	2,30
	G6 WT + PD17 + PD032	GFP-	1574109	99,42
		GFP++	9048	0,57

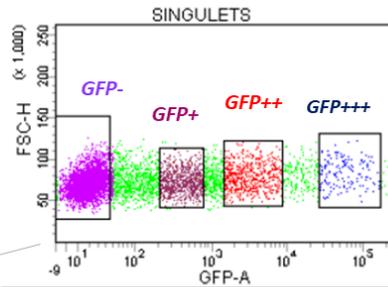
**Figure ANNEXE 11:**

- Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes exprimés dans l'EPr après 24h de surexpression de *Gata6* WT avec ou sans traitement aux inhibiteurs de la voie RTK-FGF. La normalisation a été réalisée classiquement avec la moyenne géométrique des gènes de ménages *Rps17* et *Rpl30*. Une expérience a été réalisée ici (n=1).
- Nombre de cellules et pourcentage de cellules transfectées obtenues après tri pour l'expérience de la figure ANNEXE 10 et 11A.



**Figure ANNEXE 12:** Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes *GFP* (A) et *Gata6* (plasmide) (B), *Nanog* (C), *Sox17* (D) et *Gata4* (E) après 24h de surexpression des plasmides *Pef1a vide* et de *Gata6 WT* avec ou sans traitement aux inhibiteurs de la voie RTK-FGF. La normalisation a été réalisée classiquement avec la moyenne géométrique des gènes de ménages *Rps17* et *Rpl30*. Une expérience a été réalisée ici (n=1).





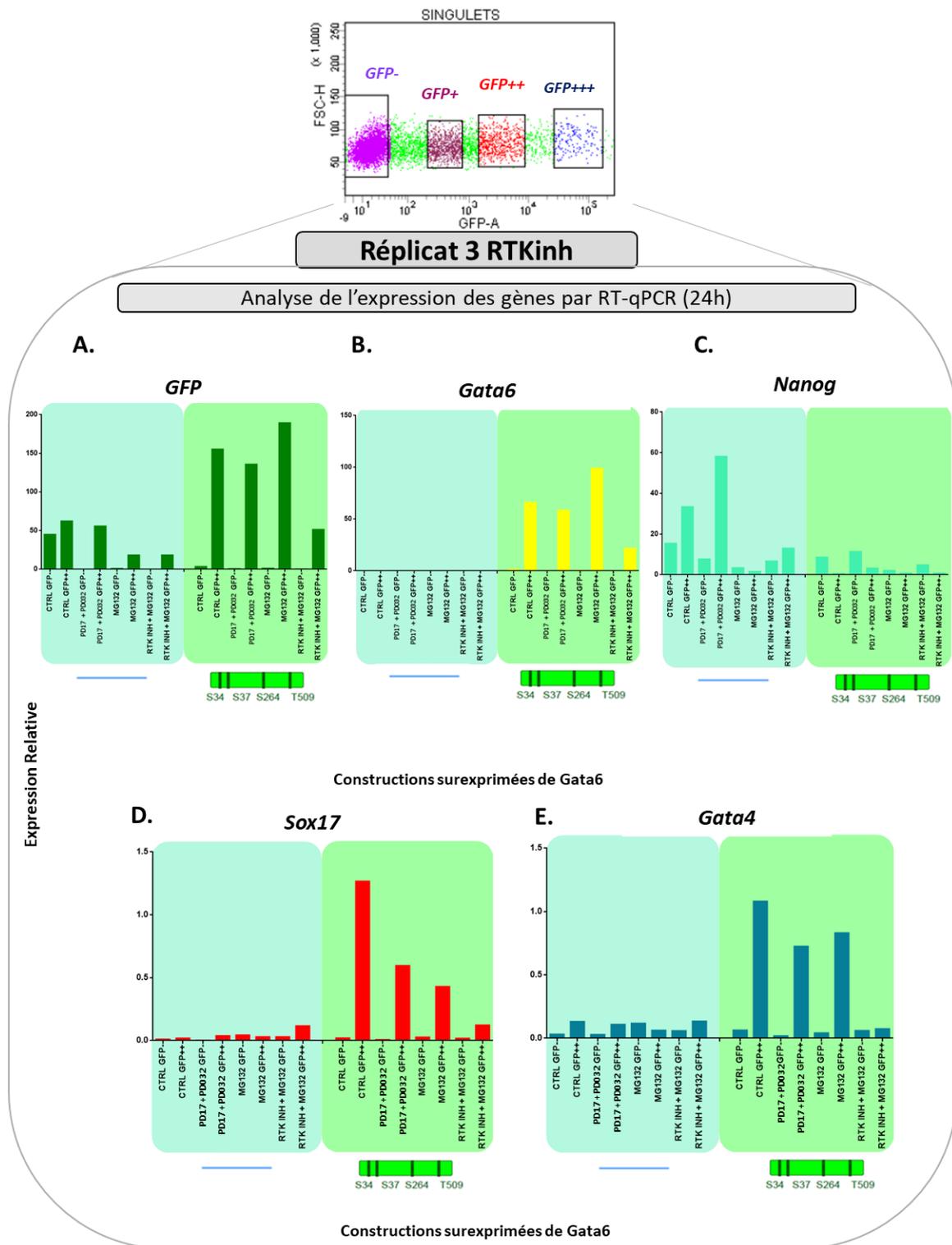
### Réplicat 2 RTKinh

Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR (24h)

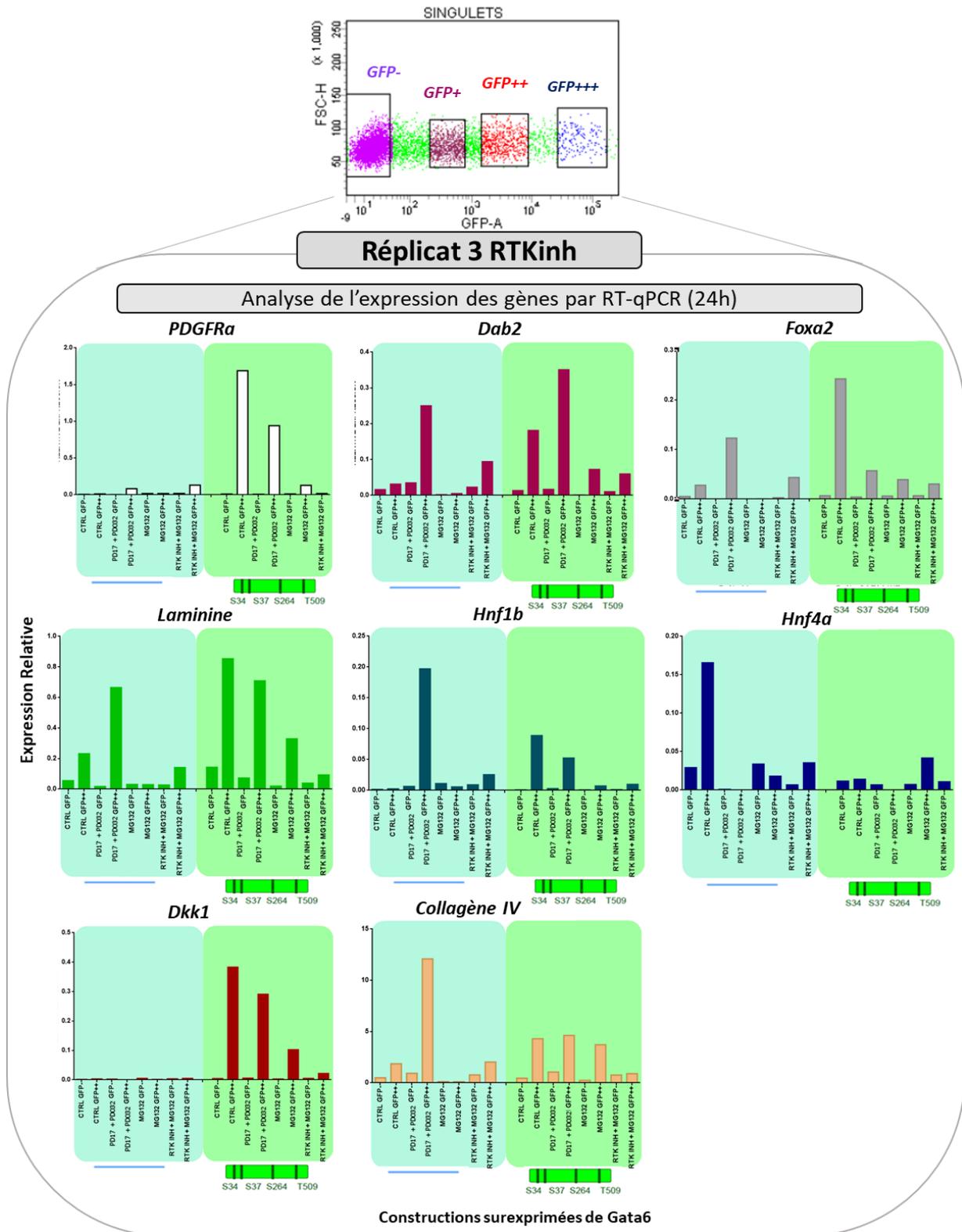
	Populations triées	Cellules triées				
		nombre		pourcentage (%) catégories GFP		Pourcentage total GFP- et GFP+(%)
ARN 24h	PEF1a vide Ctrl	GFP-	1 880 775	1 617 378	69,43	
		GFP++	426 829	367 224	15,76	30,56
	PEF1a vide + PD17 + PD032	GFP-	1 805 579	1 441 151	88,36	88,36
		GFP++	107 050	86 666	5,27	11,63
	G6 WT Ctrl	GFP-	1 839 080	1 504 226	82,03	82,03
		GFP++	121 280	99 516	5,41	17,96
	G6 WT + PD17 + PD032	GFP-	1 803 343	364 936	96,57	96,57
		GFP++	10 540	2 149	0,56	3,42
	G6 WT + PD17	GFP-	1 804 387	749 397	91,78	91,78
		GFP++	34 654	14 489	1,76	8,21
	G6 WT + PD032	GFP-	1 831 861	1 347 242	88,05	88,05
		GFP++	69 915	51 360	3,35	11,94

#### Figure ANNEXE 14:

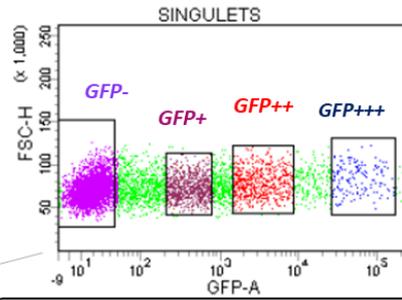
Nombre de cellules et pourcentage de cellules transfectées obtenues après tri pour l'expérience de la figure ANNEXE 12 et 13.



**Figure ANNEXE 15:** Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes *GFP* (A) et *Gata6* (plasmide) (B), *Nanog* (C), *Sox17* (D) et *Gata4* (E) après 24h de surexpression des plasmides *Pef1a* vide et de *Gata6* WT avec ou sans traitement aux inhibiteurs de la voie RTK-FGF. La normalisation a été réalisée classiquement avec la moyenne géométrique des gènes de ménages *Rps17* et *Rpl30*. Une expérience a été réalisée ici (n=1).

**Figure ANNEXE 16:**

Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes exprimés dans l'EPr après 24h de surexpression des plasmides *Pef1a* vide et de *Gata6* WT avec ou sans traitement aux inhibiteurs de la voie RTK-FGF et avec/ sans MG132. La normalisation a été réalisée classiquement avec la moyenne géométrique des gènes de ménages *Rps17* et *Rpl30*. Une expérience a été réalisée ici (n=1).



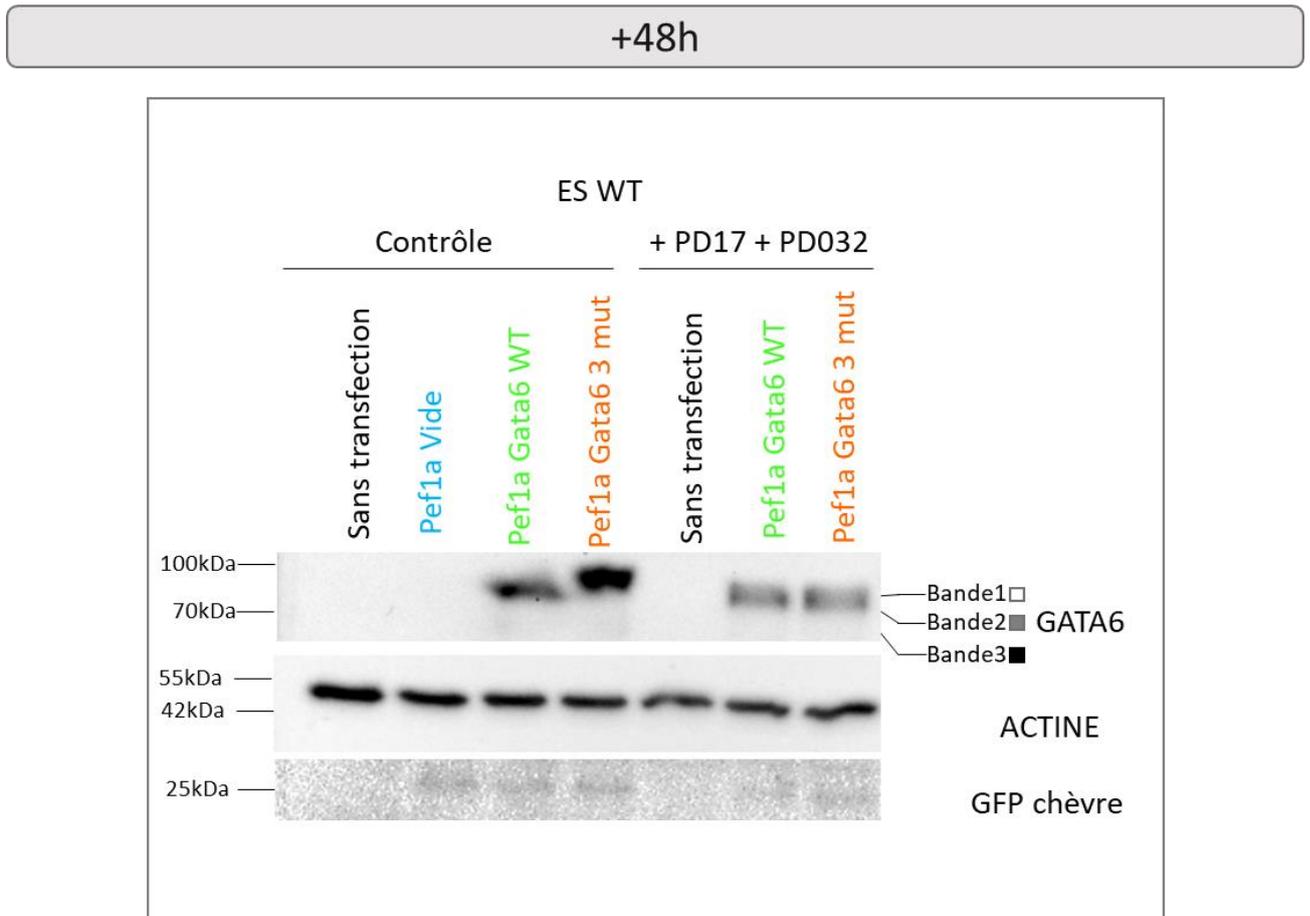
**Réplicat 3 RTKinH**

Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR (24h)

	Populations triées	Cellules triées		
		nombre	pourcentage GFP- et GFP+(%)	
ARN 24h	PEF1a vide Ctrl	GFP-	260 315	56,48
		GFP++	200 562	43,51
	PEF1a vide + PD17 + PD032	GFP-	287 325	96,53
		GFP++	10 316	3,46
	PEF1a vide Ctrl + MG132	GFP-	273 171	64,39
		GFP++	151 068	35,60
	PEF1a vide + PD17 + PD032 + MG132	GFP-	266 728	97,90
		GFP++	5 710	2,09
	G6 WT ctrl	GFP-	220 142	70,53
		GFP++	91 961	29,46
	G6 WT + PD17 + PD032	GFP-	171205	90,23
		GFP++	18518	9,76
	G6 WT ctrl + MG132	GFP-	111 163	69,62
		GFP++	48 508	30,37
	G6 WT + PD17 + PD032 + MG132	GFP-	159 979	93,86
		GFP++	10 462	6,13

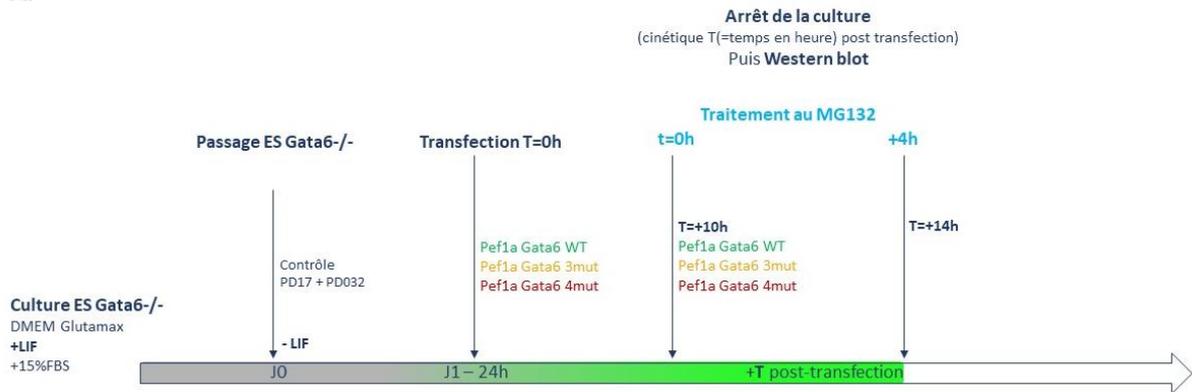
**Figure ANNEXE 17:**

Nombre de cellules et pourcentage de cellules transfectées obtenues après tri pour l'expérience de la figure ANNEXE 15 et 16.

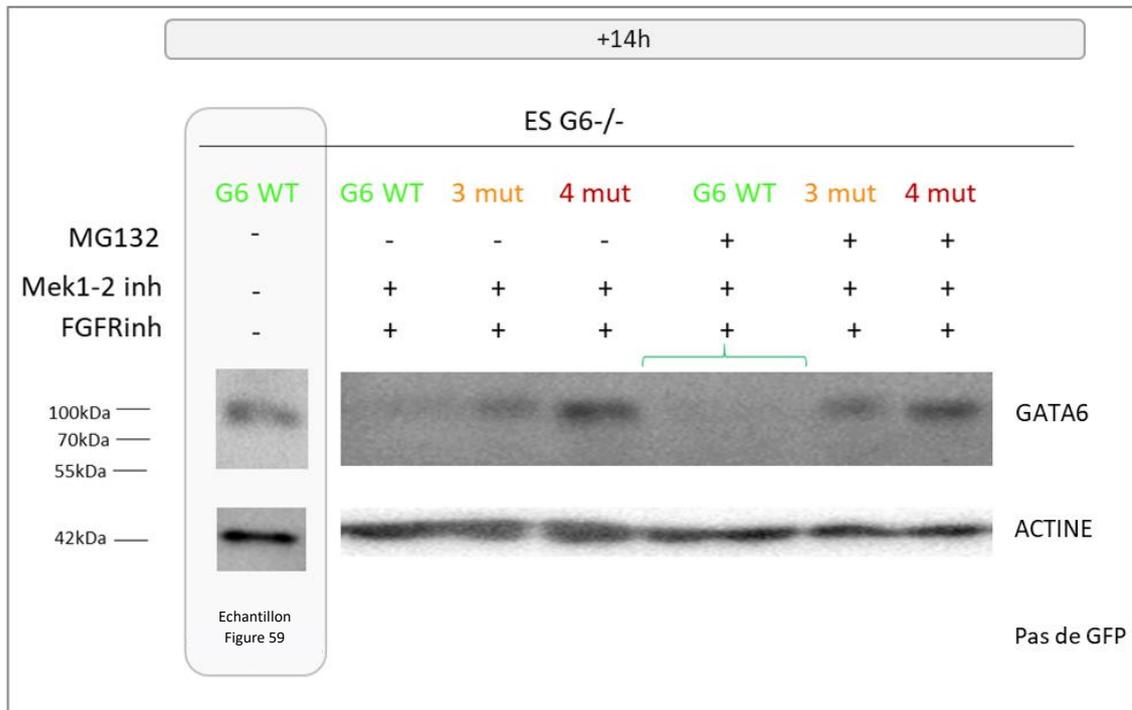


**Figure ANNEXE 18:** Analyse de l'expression protéique de Gata6 au sein des cellules ES WT avec ou sans traitement aux inhibiteurs PD17 + PD032, après 48h de surexpression des constructions *Pef1a vide*, *Gata6 WT* et *Gata6 3mut*.

**A.**



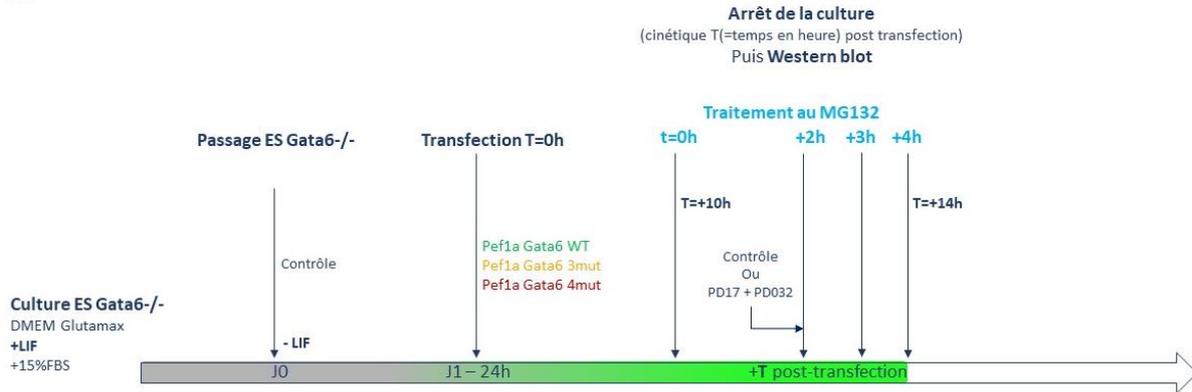
**B.**



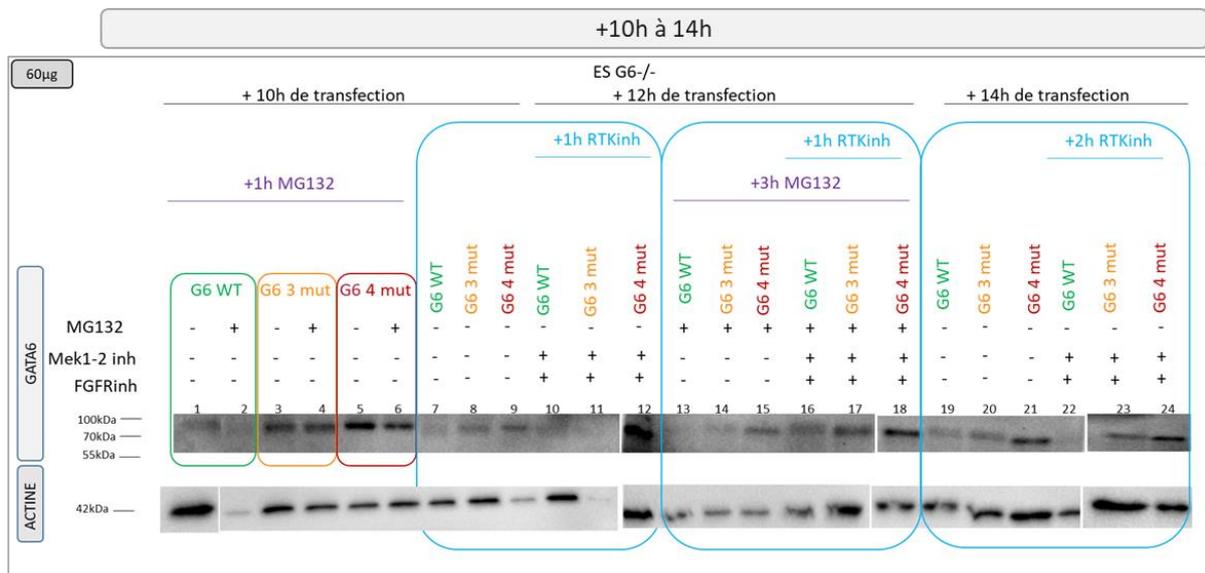
**Figure ANNEXE 19:** Expression protéique de GATA6 au sein des cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup>

- A. Stratégie expérimentale avec ou sans traitement aux inhibiteurs PD17 + PD032 appliqué simultanément au traitement MG132 (t=3h) après 14h de surexpression des constructions *Gata6* WT et *Gata6* 3mut, *Gata6* 4mut.
- B. Western Blot

A.



B.



**Figure ANNEXE 20:** Expression protéique de GATA6 au sein des cellules ES *Gata6*<sup>-/-</sup> avec/sans MG132, avec/sans les inhibiteurs PD17+ PD032

- A. Stratégie expérimentale avec ou sans traitement aux inhibiteurs PD17 + PD032 appliqué au cours du traitement MG132 et cinétique réalisée après surexpression des constructions *Gata6* WT et *Gata6* 3mut, *Gata6* 4mut.
- B. Western Blot



---

*MATERIELS ET METHODES*

---

Gènes	Primers	Programme PCR	Taille du produit
<i>Cre</i>	Cre Forward : 5'- GGAAATGGTTTCCCGCAGAACCTG – 3' Cre Reverse : 5'- ACGGAAATCCATCGCTCGACCAGT – 3'	2 min 95 °C 30x (10 sec 95 °C 30 sec 62 °C 30 sec 72 °C) 7 min 72 °C	499 bp
<i>Noggin</i>	D20 (KOVpneo) : 5'- GGGAACAAACGGATTGACCG - 3' D214 (nog LacZ F) : 5' – GGGGGAATTGCGACCAACTC – 3'	2 min 94 °C 40x (10 sec 94 °C 30 sec 62 °C 45 sec 72 °C) 10 min 72 °C	D20 (KOVpneo)- D214 (nog LacZ F) : allèle WT 372 bp D214 D215 : allèle mutant 550 bp
<i>Dkk1</i>	KE08: 5'-AGAACTAACCCAGCCCCACAGCAGA – 3' KE24: 5' – CCCGGGAAGTACTGCAAAAATGGTG – 3' KE25: 5' – GTGCTCAAACACAAGCCAGTGACGA – 3'	2 min 94 °C 30x (10 sec 94 °C 30 sec 62 °C 30 sec 72 °C) 10 min 72 °C	KE08-KE25 : allèle mutant 250 bp KE24-KE25 : allèle WT 185 bp

**Tableau 1 : Amorces utilisées pour le génotypage des embryons étudiés**

## I Prélèvement et isolement des embryons

Les femelles sont mises en présence des mâles. Si l'accouplement a eu lieu, on observe, après la mise en contact, la présence d'un bouchon vaginal, de couleur blanche et d'aspect visqueux, à l'aide d'une sonde que l'on insère délicatement dans le vagin de la femelle. La présence de ce bouchon indique qu'un accouplement a eu lieu la nuit précédente, soit environ 6h après la mise en contact entre le mâle et la femelle souris correspondant à un stade embryonnaire de 0.5j après fécondation (E0.5). De ce fait, le lendemain du bouchon vaginal, à midi, on sera à 1.5j (E1.5) après fécondation. Les stades sont ainsi calculés pour les jours suivants ; ce qui nous permet de prélever les embryons au stade souhaité. Ainsi, les oviductes sont prélevés et flushés avec du PBS 1X afin de récolter les embryons des stades E0.5 à E2.5. Les cornes utérines sont prélevées et flushées avec du PBS 1X pour les embryons des stades E3.0 à E4.25. Les cornes sont disséquées, immergées en PBS 1X en boîte de Pétri, pour les embryons des stades E4.5 ou plus.

Ensuite, les embryons peuvent soit être mis en culture suivant le stade, soit subir des expériences d'immunomarquage ou d'hybridation *in situ* suivies, d'un génotypage par PCR pour les embryons issus de portées/croisements « mutant(e)s ».

### 2) Génotypage des embryons et des souris pour l'entretien des lignées murines

Le génotypage des souris est réalisé suite au prélèvement de la phalange distale des souriceaux âgés de 9 à 11 jours. Ces « doigts » sont ensuite lysés dans 300µL de tampon de lyse (Tris HCL pH=9,0 100mM ; EDTA 5mM ; 0,2% SDS ; NaCl 20mM) dans lequel est diluée de la Protéinase K (100 µg/mL, P6556, Sigma Aldrich) sans agitation sur une nuit à 55°C. Puis les échantillons sont ensuite centrifugés 10 minutes à 13000 rpm afin de collecter le surnageant. L'ADN est précipité avec 1 mL d'éthanol absolu froid et isolé par centrifugation 1 minute à 13000 rpm. Le culot est enfin séché et repris dans 100 µL de TE (Tris 10mM ; EDTA 1mM).

Le génotypage des embryons frais ou en culture a lieu après une expérience d'immunomarquage ou d'hybridation *in situ*. L'ADN des embryons est extrait dans 10µL de tampon de lyse froid (KCL 50mM ; Tris pH=8,3 10mM ; MgCl<sub>2</sub> 2mM ; Gélatine 0,1 mg/mL ; NP-40 0,45% ; Tween-20 0,45%) supplémenté extemporanément de Protéinase K 100µg/mL et incubé pendant 2 heures à 55°C sans agitation. Puis, la Protéinase K est inactivée pendant 10 minutes à 94°C.

Les ADNs extraits des doigts ou des embryons sont génotypés par PCR, réalisées avec de la Taq polymérase (Invitrogen) en utilisant le Tampon 10X fournit par Invitrogen et selon les recommandations du fournisseur pour les allèles *Cre*, *Dkk1* et *Noggin* (**Tableau1**). Les produits PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose 2% supplémenté en BET.

### 3) Entretien des lignées de cellules souches embryonnaires ES

- Caractérisation des lignées de cellules souches embryonnaires ES

Les cellules souches utilisées sont des cellules souches embryonnaires murines (mES) soit sauvages mES CK35, appelées ES WT, soit mutantes mES *Gata6*<sup>-/-</sup> car déplétées dans l'expression du *Gata6* endogène, données par de J. Artus (Morrissey et al, 1998).

- Condition de culture des cellules souches embryonnaires ES WT et *Gata6*<sup>-/-</sup>

Les cellules souches ES ont été cultivées en milieu DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate (Gibco, réf : 31966021) supplémenté par du ESGRO® mLIF Medium Supplement (Merck Milipore, ref : ESG1107, 10<sup>3</sup> unités), du sérum de veau fœtal FBS 15% décomplémenté (GE HealthCare lot : A10111-1536) et du β-mercapto-éthanol (Sigma, ref : M3145, 100µM) pour leur amplification. Les cellules sont cultivées sur support plastique, en boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre enduites au préalable, 1h minimum, avec de la Gélatine (Gélatine Porcine Skin 0,1%, diluée dans de l'eau, G1890- 500mG Type A). Si les cellules sont destinées à être observées au microscope, elles seront déposées sur lames de plastique gélatinées (Thermanox Nunc, 174950) ou sur lames de verre



prétraitées à la gélatine 0,1 % puis incubées pendant 30 minutes avec de la glutaraldéhyde 0,5% (stock 25%) afin de fixer la gélatine sur le verre et ensuite, lavées en D-PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) no calcium, no magnesium 1X (Gibco, réf : 14190136) ; afin d'éliminer toute traces résiduelles de glutaraldéhyde toxique pour les cellules.

Pour l'amplification, les cellules sontensemencées à 500 000 cellules ou  $1.10^6$  cellules par boîtes de 6 cm de diamètre pour arriver à environ 80% de confluence au prochain passage. Pour les expériences de traitements avec ou sans inhibiteurs RTK, les cellules sontensemencées à environ 200 000 cellules par puits dans des plaques 24 puits (Falcon Polystyrene Microplates Corning Inc 353226) ou 1 à 2 millions de cellules par boîtes B60, si un western blot est envisagé par la suite et suivant le temps de l'expérience (24h à 48h). Lors des passages, les cellules sont décollées avec de la Trypsine-EDTA, 0,25%, phénol red (Gibco ThermoFisher Scientific 2520006) et la trypsine est inhibée avec du milieu de culture.

#### **4) Entretien des lignées de cellules de carcinome embryonnaire F9**

Les cellules F9 présentent des conditions de culture similaires aux cellules ES. Elles sont elles aussi cultivées sur boîtes de Pétri, au préalablement gélatinées (Gélatine 0,1%, diluée dans de l'eau) et cultivées en milieu DMEM-Glutamax, sans antibiotiques, et avec du sérum de veau fœtal FBS 10% décomplémenté.

#### **5) Inhibition de la voie RTK :**

Pour les traitements aux inhibiteurs de la voie RTK : l'inhibition des récepteurs FGFR est réalisée avec l'inhibiteur PD173074 (P2499, Sigma Aldrich) à la concentration de 100 nM et l'inhibition de la protéine MEK1-2 est réalisée avec l'inhibiteur PD0325901 (PZ0162 Sigma Aldrich) à la concentration de 500 nM (Nichols et al, 2009 ; Yamanaka, Lanner et Rossant, 2010 ; Frankenberg et al, 2011). L'inhibition de la branche PI3K a été réalisée avec du LY294002 à la concentration de 1 $\mu$ M.

#### **6) Traitement à l'acide rétinoïque RA**

Le traitement à l'ATRA a été réalisé durant 48h, à la concentration de 1  $\mu$ M (pour une concentration physiologique de 0,1  $\mu$ M). La dilution du RA, à partir de la solution mère, a été faite dans du DMSO (« Diméthylsulfoxyde »). Les conditions « contrôle » (sans traitement au RA) correspondent à une culture en DMSO à la même concentration que le RA lors du traitement.

#### **7) Surexpression de différentes formes WT ou mutées de GATA6 par lipo-transfection des cellules mES**

- Agent transfectant : Lipofectamine 2000 ou 3000

Les expériences de transfection ont été réalisées sur des cellules mES WT ou mES *Gata6*<sup>-/-</sup> en utilisant, en respectant les conditions du fournisseur (dilution dans de l'Opti-MEM TM Reduced Serum Medium 1X Thermo Fisher Scientific 31985062), la lipofectamine 2000 puis 3000 comme agent transfectant (Invitrogen). Afin d'avoir une efficacité de transfection optimale (entre 50 à 80% des cellules transfectées), il est à noter que la transfection est optimale lorsque la solution de ADN + lipofectamine (ratio ADN/lipofectamine de 1 $\mu$ g/2,5 $\mu$ L - Nowling et al 2002) est mise en contact avec des cellules qui sont en pleine division, soit lors du cycle cellulaire. Je n'ai cependant pas déterminé quelle phase du cycle cellulaire était la plus idéale (potentiellement la phase S). De plus, il est aussi à noter que la durée de l'incubation préalable de la lipofectamine seule diluée dans de l'Opti-MEM ainsi que du plasmide seul (ADN) dilué dans l'Opti-MEM également, puis du mélange entre l'ADN et la lipofectamine n'est pas déterminante. En effet, après plusieurs tests (TEST1 : 5 min des solutions lipofectamine/ Opti-

Protéine ciblée	Espèce hôte	Dilution		référence
En immunomarquage				
		Sur embryons	Sur cellules	
Cdx2	Souris	1 /1		ABCAM, ab86949
E-cadhérine	Rat	1/400		Sigma-Aldrich U3254
Gata6	chèvre	1/50	1/100	R&D systems, AF1700
Gata6	Lapin	1/100	1/100	Santa Cruz, sc-9055
Gata4	Lapin	1/50	1/100	Santa Cruz, sc-9053
Nanog	Lapin	1/50	1/100	ABCAM, ab80892
Oct4	Lapin	1/400	1/400	Santa Cruz, sc-9081
Dkk1	Chèvre	1/10		R&D systems, AF1765
Sox17	Chèvre	1/50	1/100	R&D systems, AF1924
Sox2	Souris	1/150	1/300	R&D systems, MAB2018
En Western Blot				
B-actine	souris	1/10 000		

**Tableau 2 : Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence**

Fluorochromes	Espèce hôte	Dilution		référence
En immunomarquage				
		Sur embryons	Sur cellules	
Cyanine 3	Souris, rat, lapin, chèvre	1 /300	1 /300	Jackson Immunoresearch
Cyanine 5	Souris, rat, lapin, chèvre	1/300	1/300	Jackson Immunoresearch
Alexa 488	Souris, rat, lapin, chèvre	1/300	1/300	Jackson Immunoresearch
Chromo 494 Streptavidine		1/50	1/100	
En Western Blot				
Ac HRP Dkk anti-souris		1/5000		Santa Cruz Sc-2314
Ac HRP Dkk anti-Lapin		1/5000		Santa Cruz Sc-2313
Ac HRP Chèvre anti-souris		1/5000		Santa Cruz Sc-2005
Ac HRP Chèvre anti-poulet		1/5000		Santa Cruz Sc-2428
Ac HRP Chèvre anti-lapin		1/5000		Santa cruz Sc-2004

**Tableau 3 : Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence et Western Blot**

MEM et ADN/Opti-MEM ; puis 20min lipofectamine/ADN/ Opti-MEM ou TEST2 : 5 min des solutions lipofectamine/ Opti-MEM et ADN/ Opti-MEM ; puis 5min lipofectamine/ADN/ Opti-MEM), il s'est avéré que l'efficacité de transfection ne variait pas outre mesure si l'on était au moment de la division cellulaire.

- Plasmides des formes WT et mutées de GATA6

Les différentes formes plasmidiques de Gata6 utilisées et transfectées ont été décrites en début de partie Résultats Projet 1. Les constructions **S34A**, **S37A** et **T509A** ont été réalisées à l'aide des primers indiqués dans le Tableau 4 (**Tableau 4**). Le programme PCR utilisé pour la mutagenèse dirigée pour les formes **S34A** et **S37A** est le suivant : 98°C pendant 30 secondes puis 25 cycles de 98°C pendant 10 secondes, 68°C pendant 6 minutes. Le programme PCR utilisé pour la mutagenèse dirigée pour les formes **T509A** est le suivant : 98°C pendant 30 secondes puis 25 cycles de 98°C pendant 10 secondes, 63.1°C pendant 1 minute, 72°C pendant 6 minutes et enfin une étape à 72°C pendant 10 minutes. Les constructions ont été ensuite digérées avec l'enzyme *Dpn1* afin d'éliminer le plasmide maternel non muté méthylé et de garder le plasmide fille muté non méthylé. Puis les constructions ont été amplifiées en bactéries C600 et vérifiées par séquençage avec les amorces indiquées dans le Tableau 5 (**Tableau 5**).

## 8) Immunofluorescence

- Sur embryons

Une fois les embryons prélevés, ils sont fixés en paraformaldéhyde 4% (PFA diluée dans du PBS 1X) pendant 30 minutes à température ambiante, sous agitation, ou sur la nuit à 4°C. Puis, 3 lavages successifs de 10 minutes en PBS 1X Triton 0,1% (Triton X-100), sous agitation, sont effectués. Une perméabilisation peut être réalisée en PBS 1X Triton 0,5% lorsque les embryons sont au stade E4.5 ou suivant les anticorps. On procède ensuite à une saturation des sites aspécifiques en PBS 1X Triton 0,1% Sérum de vœu fœtal 10%, sous agitation, pendant 30 minutes. Enfin, les embryons sont déposés dans un puits en plaque Terasaki, en atmosphère humide, contenant la solution d'anticorps primaires (**Tableau 2**). Ils incuberont ainsi une nuit entière à 4°C.

Le jour suivant, nous procédons à des lavages successifs en PBS 1X Triton 0,1% pendant 5, 10, 15 et 2 fois 20 minutes. Puis, deux possibilités de protocoles sont réalisées :

- ♦ Protocole classique sans amplification du marquage: les embryons sont déposés et incubés, durant 1h30 sous agitation, en plaque 4 puits dans un volume de 300 µL de solution d'anticorps secondaires couplés à des fluorochromes dilués au 1/300 (488, Cy3 et Cy5 Jackson Immunoresearch) (**Tableau 3**) et de DAPI au 1/1000 (Sigma-Aldrich D8417-1MG) dans du PBS 1X Triton 0,1% FBS 10%. Enfin, 3 lavages successifs de 10 minutes en PBS 1X Triton 0,1% sont réalisés et les embryons sont montés en PBS 1X Triton 0,1% entre lame et lamelle (52µL) ou en plaque Ibidi (25µL/puits) avant l'observation des embryons au microscope confocal Leica SPE et leur analyse à l'aide des logiciels ImageJ (NIH) et Imaris (Bitplane).
- ♦ Protocole avec amplification du marquage (utilisé pour le marquage DKK1 notamment) : Les embryons ont été préalablement perméabilisés pendant 15min dans du PBS 1X Triton 0,5% avant l'étape de saturation des sites aspécifiques. Après incubation avec l'anticorps primaire sur la nuit (**Tableau 2**) et les lavages, les embryons sont incubés avec un anticorps secondaire couplé à la *horseradish peroxidase* (HRP) dilué au 1/200 (**Tableau 3**) durant 1h30 sous agitation, en plaque 4 puits dans un volume de 300 µL de solution. Ensuite, 3

Primers F(oward) et R(everse)	Séquence  (mise en valeur du résidu à muter)	"off"  Ser > Ala	"on"  Ser > Glu
<b>S34F</b>	GCG CGG GAG CCC TCC <b>TCG</b> CCG CTT TCC CCC ATC	<b>GCC</b>	<b>GAG</b>
<b>S34R</b>	GAT GGG GGA AAG CGG <b>CGA</b> GGA GGG CTC CCG CGC	<b>GGC</b>	<b>CTC</b>
<b>S37F</b>	CCC TCC TCG CCG CTT <b>TCC</b> CCC ATC TCG TCT TCG	<b>GCC</b>	<b>GAG</b>
<b>S37R</b>	CGA AGA CGA GAT GGG <b>GGA</b> AAG CGG CGA GGA GGG	<b>GGC</b>	<b>CTC</b>
<b>S264 F</b>	GCA CGC TTT CCC TAC <b>TCG</b> CCC AGC CCG CCC ATG	<b>GCC</b>	<b>GAG</b>
<b>S264 R</b>	CAT GGG CGG GCT GGG <b>CGA</b> GTA GGG AAA GCG TGC	<b>GGC</b>	<b>CTC</b>
<b>T509 F</b>	GGC TCT GTC CCT ATG <b>ACT</b> CCT ACT TCC TCT TCT	<b>GCC</b>	<b>GAG</b>
<b>T509R</b>	AGA AGA GGA AGT AGG <b>AGT</b> CAT AGG GAC AGA GCC	<b>GGC</b>	<b>CTC</b>
<b>S34S37F</b>	GCG CGG GAG CCC TCC <b>TCG</b> CCG CTT <b>TCC</b> CCC ATC TCG TCT TCG	<b>GCC</b>	<b>GAG</b>
<b>S34S37R</b>	CGA AGA CGA GAT GGG <b>GGA</b> AAG CGG <b>CGA</b> GGA GGG CTC CCG CGC	<b>GGC</b>	<b>CTC</b>

**Tableau 4 : Séquences des primers ayant servi à la mutagenèse dirigée des résidus d'intérêts de *Gata6*.**

Primers de séquençage (F(oward) et R(everse))	Séquence
Séq1R	AGTAAGAGCAACAGGTCCTC
Séq2R	TGATTGCTGGGCCCGCTG
Séq4F	CACTACCTTATGGCGTAGAAA
Séq5F	CTCTACAGCAAGATGAATG
Séq5R	CCATTCATCTTGCTGTAGAG
Séq6F	TCCGGCTGGCCTACC TCA
Séq7R	CCCATGGAGTTTCATATAGA
Séq8F	GGAGGAAATGTACCAGAC
H2B-GFP	GCCGACAAGCAGAAGAAC

**Tableau 5 : Séquences des primers ayant servi lors du séquençage des différentes formes mutées créées de *Gata6***

- ♦ lavages successifs de 20 minutes en PBS 1X Triton 0,1% sont réalisés puis la réaction de révélation est faite en incubant tout d'abord dans la solution « d'amplification diluent » du kit TSA Cyanin system (Kit TSA Perkin Elmer) durant 5 minutes. Puis la suite de la réaction s'effectue dans le noir en incubant les embryons dans la solution de TSA couplé à un fluorochrome (Cy-5 ou Cy-3
- ♦ dilués au 1/100 dans la solution d'Amplification Diluent, Perkin Elmer) durant 7 minutes pour des embryons entre E3.5 et E4.5 et 10 minutes pour des stades plus tardifs ou des marquages plus fiables. Enfin, 3 lavages successifs de 10 minutes en PBS 1X Triton 0,1% sont réalisés. Pour un double marquage DKK1 et marqueur de l'EPr (tels que GATA6, SOX17 et GATA4) les embryons sont fixés dans le la PFA 4% après le marquage DKK1 puis après lavages en PBS 1X Triton 0,1%, les embryons sont incubés avec l'anticorps primaire dirigé contre le marqueur de l'EPr sur la nuit et la suite du protocole expliqué ci-dessus est effectué. Enfin, les embryons sont montés en PBS 1X Triton 0,1% entre lame et lamelle (52µL) ou en plaque Ibidi (25µL/puits) avant l'observation des embryons au microscope confocal Leica SPE et leur analyse à l'aide des logiciels ImageJ (NIH) et Imaris (Bitplane).

- Sur cellules ES

Les cellules, adhérentes, sont cultivées sur lames de verre ou de plastique afin de réaliser facilement l'immunomarquage. Pour procéder à celui-ci, il faut au préalable préparer des boîtes en plastique recouvertes par du parafilm sur lequel sera déposé, en goutte, les différentes solutions d'incubation. L'immunomarquage se déroule comme suit : les cellules, sur lames, sont fixées, directement dans les puits des boîtes de culture, en PFA 4% pendant 30 minutes à température ambiante. Il est aussi possible de fixer les cellules sur la nuit à 4°C. Puis, 3 lavages successifs de 10 minutes en PBS 1X Triton 0,1%, 500µL, sont effectués. On procède ensuite à une saturation des sites aspécifiques en PBS 1X Triton 0,1% FBS 10%, 500µL, pendant 30 minutes. Enfin, les lames sont retournées, la face « cellules » au contact de la goutte de 20µL de solution contenant les anticorps primaires dilués (**Tableau 1**). Les lames sont laissées ainsi pendant 1h à température ambiante ou à 4°C sur la nuit en atmosphère humide.

Puis, les lames sont lavées, toujours la face « cellules » contre les gouttes, en PBS 1X Triton 0,1% pendant 3 fois 10 minutes. Les lames sont ensuite mises en contact, durant 1h, avec des gouttes de 20µL de solution d'anticorps secondaires (**Tableau 2**) couplés à des fluorochromes. Enfin, 3 lavages successifs de 10 minutes en PBS 1X Triton 0,1% sont réalisés et les lames sont montées sur grande lamelle (Thermanox TM Nunc TM ThermoFisher Scientific 150067) face « cellules » en contact avec du liquide de montage Fluoromount G® (Southern Biotech Clinisciences 0100-01) et laissées à 4°C une nuit minimum avant l'observation des lames au microscope confocal Leica SPE et leur analyse à l'aide des logiciels ImageJ (NIH) et Imaris (Bitplane).

## 9) Comptages cellulaires

Les comptages cellulaires ont été réalisés manuellement et de manière semi-automatique sur le logiciel Imaris afin de déterminer :



- Pour les embryons : le nombre de cellules de chaque lignage (Epi : OCT4+; PrE : SOX17+). Le nombre total de cellules au sein de l'embryon est déterminé par le comptage des cellules marquées par le DAPI. Le nombre de cellule de la MCI est calculé via la soustraction DAPI – (OCT4+SOX17- + OCT4+SOX17+ + SOX17+OCT4-). Le nombre de cellules du TE a aussi été déduit par DAPI –MCI.
- Pour les cultures cellulaires mES *Gata6*<sup>-/-</sup> ou mES WT : Détermination du nombre de cellules transfectées GFP+ exprimant *Gata6* et comptages au sein de cette population transfectée du nombre de cellules exprimant SOX17 (GFP+ SOX17+) et exprimant GATA4 (GFP+ GATA4+).

### 10) Analyses Statistiques

La significativité des données obtenues a été testée grâce au logiciel Prism6 (Graphpad). Les résultats ont été analysés par un test non paramétrique de Mann-whitney ou par un T-test. Les variations sont considérées comme statistiquement significatives donc différentes lorsqu'elles dépassent un seuil de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

### 11) Western Blot

Les cellules mES ont été lysées avec du RIPA en présence d'un cocktail d'inhibiteur de phosphatases et protéases diluées dans de l'eau 1X (Complete, Mini, EDTA-Free 4693159001 30 tablettes, 7X, MC2 Roche). Les protéines totales extraites, ont été quantifiées par la méthode de Bradford (Bradford Reagent, B6916, 500mL, MC2 –Sigma). Après dosage, les protéines ont été conservées à -80°C avant la réalisation des Western Blot.

Pour les Western Blot, 20µg de protéines ont été généralement utilisés pour chaque condition et ont été dénaturés avant migration sur gel pendant 10min à 96°C dans un mélange, à volume équivalent entre chaque échantillon de protéines (volume maximum entre 20 et 30µL), avec du Laemmli 1X (Laemmli Sample buffer 4X, Biorad, 1610747) et eau. Une centrifugation a été réalisée ensuite pour récupérer l'ensemble de la solution de protéines chauffée.

Deux gels ont été fait ensuite. Un gel de séparation SDS-PAGE d'acrylamide/bisacrylamide à 12% dilué dans de l'eau a tout d'abord été réalisé (pour un volume total de 10mL : 4mL de Acrylamide/bisacrylamide (EUROMEDEX, 40%, EU0078-C), 2,5mL de Tris-HCl (1.5M, pH 8,8), 100µL de SDS 10%, 80µL de APS 10% et 4µL de TEMED (EUROMEDEX, 50406) et 3,3mL d'eau). Une fois la solution déposée dans des cassettes Biorad, de l'isopropanol a été ajouté immédiatement pour tasser le gel et pour permettre une polymérisation « horizontale droite » du haut du gel. La cassette contenant le gel est alors laissée à la verticale en attendant la polymérisation du gel puis l'isopropanol est ensuite enlever et la cassette séchée afin de couler le second gel « de concentration » au-dessus.

Ainsi, un gel de concentration SDS-PAGE d'acrylamide/bisacrylamide a été réalisé et dilué dans de l'eau (pour un volume total de 3,72 mL : 500µL d'acrylamide/bisacrylamide (EUROMEDEX, 40%, EU0078-C), 940µL de Tris-HCl (0,5M, pH6,8), 38 µL de SDS 10%, 38µL d'APS 10% et 4µL de TEMED (EUROMEDEX, 50406) et 2,2mL d'eau). Ce gel est coulé par-dessus le premier gel de séparation et le peigne formant les puits est inséré immédiatement après le coulage du second gel. La cassette est alors laissée à la verticale en attendant la polymérisation du gel de concentration.

Une fois la polymérisation totale de ce second gel, il est nécessaire d'enlever le scotch au bas de la cassette pour permettre la migration des échantillons à l'intérieur du gel. La cassette est ensuite insérée au sein de l'appareil SDS-PAGE comme indiqué par le fournisseur et les chambres ainsi que les

Gènes	Nom des amorces	Séquence (F : forward – R : reverse)	Références
<i>Rps17</i>	Rps17_F_qPCR Rps17_R_qPCR	ATGACTTCCACACCAACAAGC GCCAACTGTAGGCTGAGTGAC	Stephanie Maupetit-Mehouas
<i>Rpl30</i>	RPL30_tr_F RPL30_tr_R	AGTCTCTGGAGTCGATCAACT AGCCAGTGTGCATACTCTGTAG	Stephanie Maupetit-Mehouas Cynthia Denis
<i>Sox17</i>	Sox17_F_qPCR Sox17_R_qPCR	CTTTATGGTGTGGGCCAAAG GCTTCTCTGCCAAGGTCAAC	N. Allègre
<i>Gata4</i>	Gata4_F_qPCR Gata4_R_qPCR	GAGATGGGACGGGACACTAC TAGTCTGGCAGTTGGCACAG	N. Allègre
<i>Gata6 (plasmide)</i>	Gata6_F_qPCR Gata6WT_R_qPCR	AGGGGCACCTTTCTTAGGAG AGTCAAGGCCATCCACTGTC	N. Allègre
<i>Dab2</i>	Dab2_F_qPCR2 Dab2_R_qPCR2	AGTCGTCGATCTTAAAGACCTTT CTCTTCTGCTTTGTTGGCTTCT	N. Allègre
<i>Foxa2</i>	Foxa2_F_qPCR Foxa2_R_qPCR	CATCCGACTGGAGCAGCTA TGTGTTTCATGCCATTTCATCC	N. Allègre
<i>CollIV</i>	Col4a1_F_qPCR Col4a1_R_qPCR	CCATCTCTGGGACAACATC GAAGGAATAGCCGATCCACA	N. Allègre
<i>Laminine1</i>	Lama1_F_qPCR Lama1_R_qPCR	CACATCAGCGCCAATGCTAC TTGTTGGTGCATCGATTGC	N. Allègre
<i>HNF4α</i>	HNF4a_F_qPCR HNF4a_R_qPCR	GGTGCCAACCTCAATTCATC CCACACATTGTCGGCTAAAC	N. Allègre
<i>HNF1β</i>	HNF1b_F_qPCR HNF1b_R_qPCR	CTCCTCTCCACCCAACAAGA GCTGGGGAGACTTGCTGTAA	N. Allègre
<i>PDGFRα</i>	PDGFra_F_qPCR1 PDGFra_R_qPCR1	AGCTCCTGGTTCATGGAAGC ACTCAAAGCCTCCTCCAGC	N. Allègre
<i>Dkk1</i>	Dkk1_F_qPCR1 Dkk1_R_qPCR1	TCTCTATGAGGGCGGGAACA TTTCGGCAAGCCAGACAGAT	N. Allègre
<i>Noggin</i>	Noggin_F_qPCR Noggin_R_qPCR	CCATCCAAGTCTGTGCACCT ATCCATCAAGTGTCTGGGCG	N. Allègre
<i>Nanog</i>	NanogWT_F_qPCR NanogWT_R_qPCR	ATGCCTGCAGTTTTTCATCC GGCAGGTCTTCAGAGGAAGG	N. Allègre

**Tableau 6 : Amorces utilisées en q-PCR**

puits sont pré-remplies avec du tampon de migration Laemmli 1X. Les échantillons sont ensuite déposés dans chaque puits à l'aide d'une seringue de Hamilton et un marqueur de taille est aussi déposé dans une position bien définie pour orienter les dépôts sur le gel (5µL – PageRuler™ TM Prestained Protein Ladder 10 to 180 kDa 26616 ThermoFisher Scientific). La migration est effectuée à 110V jusqu'à ce que le marqueur atteigne le bas du gel.

Le transfert est alors préparé en utilisant un système de buvard (papier Whatman) à réservoir humide dans du tampon de transfert 1X. Le montage en « sandwich » est réalisé comme suit : coté noir de la cassette – éponge – papier Whatman – gel - membrane – Papier Whatman – éponge – coté blanc de la cassette. Les membranes utilisées sont des membranes PVDF, elles sont découpées à la dimension du gel et sont activées au méthanol 100% pendant 30 secondes et lavées ensuite dans du tampon de transfert 1X. Une fois le montage en « sandwich » réalisé, le transfert s'effectue, avec la cuve mise dans de la glace, pendant 1h à 90V.

Le transfert fini, la membrane PVDF est récupérée et incubée, sous agitation et protéines vers le « haut », pendant 1h au minimum avec une solution saturante TBST 1X, 5% Régilait (solution faite à partir de 100mL de TBST 10X (soit 24g de Tris HCl dont poids moléculaire : 157,6g ; 5,6g Tris base dont poids moléculaire : 121,1g ; 88g de NaCl dont poids moléculaire : 58,4g ; dilué dans 900mL d'eau distillée puis ajuster le pH à 7,6 avec du 12N HCl et ajuster jusqu'à 1L d'eau distillée), 900mL d'eau distillée et 1mL de Tween 20. Puis la membrane est incubée avec les anticorps primaires durant la nuit à 4°C sous agitation dans du TBST 1X (Ajout de Régilait suivant les recommandations des anticorps primaires) (**Tableau 2 et Figure 62**). Les anticorps primaires sont ensuite collectés pour être réutilisés ultérieurement et 3 lavages de 20 minutes sont effectués en TBST 1X avant d'incuber la membrane, durant 1h30, à température ambiante, avec les anticorps secondaires HRP dilués en TBST 1X dans un volume total minimum de 5mL (**Tableau 3**). Puis, 3 lavages sont réalisés sous agitation à température ambiante en TBST 1X et la révélation est ensuite faite avec un Kit ECL (Enhanced Chemiluminescence – Pierce™ Western Blotting Substrate, ThermoFisher Scientific, 32106).

La normalisation des niveaux protéiques a été faite soit avec la GFP si celle-ci était détectable soit grâce à l'ACTINE.

## **12) Analyse transcriptomique (ARN) par RT-qPCR**

L'ARN total a été isolé en utilisant un protocole classique d'extraction au Trizol avec traitement à la DNase I (Invitrogen).

Les échantillons d'ADN complémentaires de la RT positive ont été produit à partir des échantillons d'ARN extraits, traités à la DNase I, en utilisant une Superscript® III Reverse Transcriptase (P/N 56575, Invitrogen) en suivant les instructions du fournisseur. La RT négative est réalisée à l'aide de 1µL d'eau à la place des 1 µL Superscript® III. Les ADNc ainsi produits sont analysés par RT-qPCR à l'aide de la technique Sigma Jumpstart SYBRgreen. Les séquences des primers utilisés, ciblant les gènes cibles d'intérêt, sont référencés (**Tableau 4**). La réaction de qPCR a lieu dans un volume de 10µL final (5µL master mix 2X Roche, 1µL de primer F+R 5µM, 2µL d'ADNc dilué au 1/5e ou 1/25e) en utilisant le LightCycler®480 SYBR Green I Master (2X, Roche), utilisé dans les conditions préconisées par le fournisseur. Le programme de qPCR utilisé est le suivant : pré-incubation 5minutes à 95°C, puis 45 cycles d'amplification comportant 3 phases : 12 secondes à 95°C, 12 secondes à 62°C et 12 secondes à 72°C, et enfin un cycle de 5 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C et pour finir 5 acquisitions par seconde à 97°C.

Les RT-qPCR réalisées ici sont semi-quantitatives : nous avons rapporté l'expression de chaque transcrite et par conséquent de chaque gène par rapport à la moyenne géométrique des gènes de référence *Rps17* et *Rpl30*.



**13) Test de stabilité protéique : traitement au MG132**

Les cellules mES ont étéensemencées à 2 millions de cellules par boîtes B60 ou 200 000 cellules par puits en plaque 24 puits. Le jour suivant les cellules ont été traitées avec du MG132 10nM (Sigma) pendant 4h puis une analyse par Western Blot a été réalisée.

**14) Tri cellulaire par cytométrie en flux (FACs)**

Les cellules mES transfectées avec les différentes constructions de *Gata6* et traitées ou non avec des inhibiteurs de la voie RTK ont été détachées *via* l'action de la trypsine puis centrifugées en PBS 1X Sérum de veau fœtal 2% et isolées mécaniquement à la pipette. Les cellules sont ensuite filtrées (filtre 70µM) et récoltées en tubes FACS. L'analyse a été réalisée sur FACS ARIA DIVA7.0 au CHU d'Estaing dans l'équipe du Dr RAPATEL.

**15) Réalisation des lignées stables *Gata6* inductibles par traitement à la Doxycycline**

La stratégie expérimentale pour réaliser les lignées stables a été détaillée en partie « Résultats-Projet 1 ». Ainsi, le plasmide PGK-AGT-FRT utilisé est représenté schématiquement en Figure 85 (**Figure 85**). Dans ce plasmide a été inséré les séquences ADNc de *Gata6* WT ou muté. Le plasmide pCAGGS-Flpe-Puro sera utilisé lors de la transfection du plasmide PGK-*Gata6* pour l'insertion de *Gata6* au sein du locus *Col1a*.



---

*PUBLICATIONS ET  
COMMUNICATIONS*

---



## Publication scientifique

---

Au cours de mon doctorat, j'ai publié un article de revue « *Primitive endoderm differentiation: from specification to epithelium formation* » en première auteure détaillant l'état de l'art et les hypothèses des différents mécanismes moléculaires potentiels contrôlant les processus de spécification entre les lignages Epi et EPr au sein de la MCI et de différenciation qui en découlent.




---

### Primitive endoderm differentiation: from specification to epithelium formation

Stéphanie Hermitte and Claire Chazaud

*Phil. Trans. R. Soc. B* 2014 **369**, 20130537, published 27 October 2014

---

#### References

This article cites 86 articles, 39 of which can be accessed free  
<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/369/1657/20130537.full.html#ref-list-1>

Article cited in:  
<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/369/1657/20130537.full.html#related-urls>

#### Subject collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

- [cellular biology](#) (215 articles)
- [developmental biology](#) (168 articles)
- [genetics](#) (113 articles)

#### Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right-hand corner of the article or click [here](#)

## Review



**Cite this article:** Hermitte S, Chazaud C. 2014

Primitive endoderm differentiation: from specification to epithelium formation. *Phil. Trans. R. Soc. B* **369**: 20130537.  
<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0537>

One contribution of 14 to a Theme Issue 'From pluripotency to differentiation: laying the foundations for the body pattern in the mouse embryo'.

### Subject Areas:

developmental biology, genetics,  
cellular biology

### Keywords:

blastocyst, lineage specification, cell differentiation, epithelium, cell polarization, cell sorting

### Author for correspondence:

Claire Chazaud  
e-mail: [claire.chazaud@udamail.fr](mailto:claire.chazaud@udamail.fr)

# Primitive endoderm differentiation: from specification to epithelium formation

Stéphanie Hermitte<sup>1,2,3</sup> and Claire Chazaud<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Clermont Université, Université d'Auvergne, Laboratoire GReD, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France  
<sup>2</sup>INSERM, UMR1103, and <sup>3</sup>CNRS, UMR6293, 63001 Clermont-Ferrand, France

In amniotes, primitive endoderm (PrE) plays important roles not only for nutrient support but also as an inductive tissue required for embryo patterning. PrE is an epithelial monolayer that is visible shortly before embryo implantation and is one of the first three cell lineages produced by the embryo. We review here the molecular mechanisms that have been uncovered during the past 10 years on PrE and epiblast cell lineage specification within the inner cell mass of the blastocyst and on their subsequent steps of differentiation.

## 1. Introduction

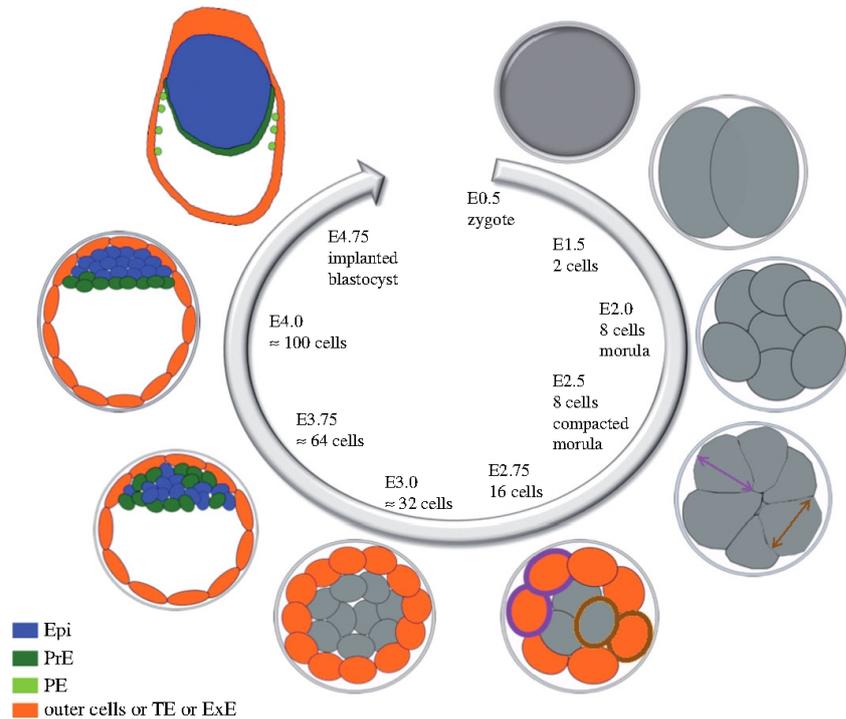
In mammals, extraembryonic tissues differentiate first to prepare a nutrient support as early as possible. During these steps of differentiation, subsets of cells keep the ability to give rise to all embryonic and adult tissues. These epiblast (Epi) pluripotent cells segregate from two differentiation events during blastocyst formation: first, during the trophoblast versus inner cell mass (ICM) differentiation and second, during Epi versus primitive endoderm (PrE) specification within the ICM. The trophoblasts will participate in the formation of the placenta, whereas PrE cell derivatives will be a major constituent of the yolk sac. Several reports have shown the importance of extraembryonic tissues not only for nutrient supply but also to induce the adjacent embryonic tissue, notably for the proper establishment of the anterior–posterior axis [1]. Moreover, it was shown recently that some cells of the visceral endoderm, a PrE derivative, could integrate the definitive endoderm, revealing a potential role in gut development [2].

Here, we review the recent discoveries regarding the molecular characterization of PrE differentiation.

## 2. The core molecular regulatory network for primitive endoderm versus epiblast cell specification

After fertilization, the cells (blastomeres) of the mouse embryo divide and reach the 8-cell stage (at embryonic day (E) 2.5), the time of compaction. During this process, adhesion increases between blastomeres that concomitantly polarize. During the following two to three rounds of division, inner, unpolarized cells are produced through asymmetric division or internalization [3–7]. Subsequently, inner and outer cells are fated to the ICM and the trophectoderm, respectively (figure 1). It has been known for a long time that the ICM gives rise to Epi and PrE cells around E4.5 [8], but the exclusive expression pattern of *Nanog* and *Gata6* in a 'salt and pepper' organization indicated for the first time that the ICM is already heterogeneous at E3.5 [9,10]. These intermingled ICM cells were further characterized by cell lineage tracing and cell grafting, which showed that most of them are engaged towards an Epi or a PrE identity from the mid-blastocyst stage [10–12]. Altogether, these experiments revealed that Epi and PrE cells specify within the ICM in an apparent random salt and pepper pattern.

The mechanism leading to the exclusive expression of *Nanog* and *Gata6* is not entirely clear, but such a pattern suggests that these transcription factors inhibit each other. This is the case at least for *Nanog* as it can directly bind to *Gata6* regulatory sequences [13] and repress its expression. However, the regulation of



**Figure 1.** Schematic of cell lineages differentiation during mouse preimplantation. After fertilization, the embryo reaches the 8-cell stage and undergoes compaction. During the next two rounds of division, cells divide either symmetrically (purple arrow and cell) or asymmetrically (brown arrow and cell) to give rise to two outer cells or to one outer cell and one inner cell, respectively. Cells can also be internalized. From E3.0 to E3.25 inner cells start to adopt Epi or PrE signatures. At E3.75, a high majority of cells have specified into Epi or PrE. At E4.0, Epi and PrE cells have sorted to form two distinct tissues and have lost their plasticity. By E4.75, PrE cells have formed an epithelium and started to produce parietal endoderm cells that migrate along the trophoctoderm. ExE, extraembryonic ectoderm (trophoctoderm derivative); PE, parietal endoderm; TE, trophoctoderm.

Nanog and Gata6 expression is more complex, because these proteins are co-expressed in all blastomeres at least from the 8-cell stage [14], and their RNAs can be detected as early as the 2-cell stage [15,16]. Thus, the early ICM progenitors co-express Nanog and Gata6 before acquiring distinct identities cell by cell. This is reminiscent of other cell specification events, as coexpression of prodifferentiation factors in progenitor cells has been described during haematopoiesis or pituitary development [17,18].

#### (a) High or low Erk activity drives lineage specification

Several experiments showed that the switch from a common to an exclusive expression of Nanog and Gata6 depends on FGF4 expression. It was first shown genetically and then with pharmacological inhibitors that blocking the Erk pathway inhibits PrE specification while promoting Epi identity, visualized by Nanog expression in all ICM cells [3,10,19]. On the reverse, FGF4 administration induces PrE cells, at the expense of the Epi cells [3]. Altogether, these experiments indicated that the ICM precursor has a binary fate choice, which is dependent on low or high Erk activity leading either to an Epi or to a PrE identity, respectively. Recently, expression and/or role of Nanog, Gata6 and active Erk were converted into differential equations, setting up a mathematical model reproducing *in vivo* cell behaviours [20]. Importantly, this series of embryo culture experiments

also demonstrated the high plasticity of ICM cells, as cell identity can be reversed by artificially applying low or high levels of active Erk. This ability to change identity upon exogenous treatments ceases around E4.0, and cell lineages are thus considered as determined [3]. Using chimera assays with donor cells of different stages (from the early blastocyst stage to E4.5), Grabarek *et al.* [12] showed that plasticity is lost in all ICM cells only after the late blastocyst stage. These results also suggest that the expression of Nanog and Gata6 in an exclusive manner is not sufficient to lock the cell identity [12], a hypothesis substantiated by the mathematical model [20]. While the levels of Nanog and Gata6 proteins in the donor cells would need to be quantified, this might indicate that other factors could be required for the loss of cell plasticity.

Genetic analyses demonstrated that FGF4 is the RTK ligand required to induce the PrE identity, as *Fgf4*<sup>-/-</sup> embryos express Nanog in all ICM cells at the late blastocyst stage [21–23], phenocopying *Grb2* mutants [10]. Strikingly, Gata6 is expressed in *Fgf4*<sup>-/-</sup> embryos until E3.25, the time of the salt and pepper set-up, but cannot be maintained afterwards [21–23]. This means that Gata6 pre-blastocyst expression is independent of the early 2-cell stage expression of FGF4 [15]. Thus, another signalling pathway is required to induce Gata6 expression. The factors required for Nanog onset of expression before the 8-cell stage also remain unknown.

### (b) *Nanog* requirements for epiblast specification

Several groups have analysed *Nanog*<sup>-/-</sup> embryos [24–27], and showed that the first role of *Nanog* is to specify Epi. Indeed, in *Nanog*<sup>-/-</sup> embryos, all ICM cells express *Gata6*. This also confirms that *Nanog* represses *Gata6* expression *in vivo*. The ICM marker *Oct4* and the trophoctoderm marker *Cdx2* are correctly expressed in these mutants, demonstrating that cell specification between ICM and trophoctoderm occurs properly. Through single-cell quantitative real-time PCR (RTqPCR), *Fgf4* was shown to be expressed specifically in Epi precursor cells of wild-type embryos [15,28]. Fluorescent *in situ* hybridization analyses showed that this specific Epi expression disappears in *Nanog* mutants, strongly suggesting that *Fgf4* expression is induced by *Nanog* [27]. This regulation is probably direct as *Nanog* binds to *Fgf4* regulatory sequences during chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments in embryonic stem (ES) cells [29]. Conversely to *Fgf4*<sup>-/-</sup> embryos, *Nanog*<sup>-/-</sup> embryos—that also lack FGF4—maintain *Gata6* expression until at least E4.5 [27]. This indicates that in *Fgf4*<sup>-/-</sup> embryos, the decay of *Gata6* expression is not directly due to the absence of FGF4, but is rather the consequence of *Nanog* high expression that inhibits that of *Gata6*.

While *Gata6* induction of expression is not impaired before the 8-cell stage in the absence of FGF4, it is inhibited when FGFR and Mek activities are blocked at an early time point (before compaction) in a *Nanog* mutant context [27]. These results suggest that another RTK ligand is active early on to induce *Gata6* expression, even if *Fgf4* is expressed at these early stages [15]. Thus, another RTK must be active to induce *Gata6* expression. Interestingly, once *Gata6* has been induced, the RTK pathway is not required anymore to maintain its expression. Indeed, in *Nanog* mutant embryos treated with FGFR and Mek inhibitors around E3.25, *Gata6* expression is not downregulated [27]. These results could be interpreted in two ways: (i) during the salt and pepper set-up in wild-type embryos, FGF4 promotes *Gata6* expression only through *Nanog* downregulation or (ii) in *Nanog* mutant embryos, ICM cells specify rapidly into PrE as *Nanog* is absent, and go beyond the stages of plasticity that normally occur around E4.0. In any case, there are two consecutive phases of *Gata6* expression, first induced through an unknown RTK activation and then maintained independently of the direct RTK/FGF4 signalling.

### (c) *Gata6* requirements for primitive endoderm specification

*In vitro*, *Gata6* ectopic expression in ES cells is sufficient to trans-differentiate them into PrE cells [30,31], whereas it is not the case via RNA injections into ICM cells during embryo cultures [5,11]. Moreover, *Gata6* mutant ES cells are unable to differentiate into PrE, even in the presence of retinoic acid that normally drives them towards a PrE identity [32,33].

After several reports on the requirement of *Gata6* only after implantation, it is now clear that *Gata6* is necessary for PrE epithelium formation *in vivo* [20,32,34–36]. Two recent reports reveal that *Gata6* is necessary to specify PrE cells and is an important component of the binary Epi/PrE cell fate decision as all ICM cells express the Epi markers *Nanog* and *Sox2* in *Gata6*<sup>-/-</sup> embryos [20,36]. Administration of FGF4 cannot rescue PrE specification [20,36], suggesting that *Gata6* is downstream of the FGF4/FGFR2 pathway. However, *Gata6* early expression does not depend on the presence of FGF4 as was shown with *Fgf4*

and *Nanog* mutant analyses [21,22,27]. One explanation could be that *Gata6*<sup>-/-</sup> ICM cells do not respond to FGF4 because, becoming Epi cells, they have lost FGFR2 expression. Indeed, *Fgfr2* is repressed in Epi cells only from E3.5 in wild-type embryos as shown by single-cell RTqPCR [15,23,28]. In *Gata6* mutants, the loss could be due either to *Nanog* repression or to the absence of *Gata6* activation. Unfortunately, the expression of FGFR2 was not examined in *Gata6* mutant ICMs.

Using complementary time-windows treatments, the two studies analysed the effect of an RTK activation on *Nanog* expression [20,36]. Administration of FGF4 to *Gata6* mutants at the 8-cell stage prevents *Nanog* expression [20]. This means that *Nanog* can be repressed by the RTK pathway independently of *Gata6*. Higher levels of *Nanog* expression are indeed released by Erk inhibition independently of the genotype [36]. Moreover, ectopic active FGFR2 expression in ES cells indicates that this repression is direct [37]. A later FGF4 treatment does not impair *Nanog* expression [20,36]. The switch into an insensitive state is very rapid as it occurs around the 8/16-cell stage [36], whereas it takes place from E3.75 in wild-type embryos [3]. The mathematical model, indeed, predicts a two-phase state of *Nanog* expression and explains that *Nanog* (or the network of pluripotency activity) levels need to become high to counteract the direct inhibitory effect FGF4/FGFR2 activation [20].

### (d) Modulation of cell fate choice and timing by gene dosage

In *Gata6* heterozygous mutant embryos, less PrE cells are specified compared with their wild-type littermates. As a consequence, there are more Epi cells within the same size ICM [20,36]. Such imbalanced proportions of Epi and PrE cells can be found in *Fgf4*<sup>+/-</sup> embryos [21]. Under a different genetic background, this effect is unmasked by deleting maternal *Fgf4* (*MFgf4*<sup>+/-</sup>) [22]. Altogether, these studies on heterozygous embryos show that the dosage of FGF4 and *Gata6* is important to balance PrE and Epi identities.

Single-cell quantification *in situ* at different stages enabled the demonstration that Epi cells are specified earlier in *Gata6*<sup>+/-</sup> embryos than that in their wild-type littermates [20,36]. This result was strengthened by an earlier expression of *Fgf4* [20], used there as an Epi marker [15,27]. Thus, the relative levels of *Nanog* and *Gata6* not only modulate Epi/PrE ratios, but also control the timing of specification. Using FGF4 treatments, it was shown that cell plasticity is also lost earlier in *Gata6*<sup>+/-</sup> embryos. Indeed, by E3.25, Epi cells are already insensitive to FGF4 as *Nanog* and PrE cell number are the same in treated and untreated *Gata6*<sup>+/-</sup> embryos recovered at E3.75 [20]. Conversely, PrE cells still require RTK activation as administration of FGFR2 and Erk inhibitors can push the cells towards an Epi identity as late as E4.0 [20]. Different results were found by Schrodde *et al.* [36], who showed that PrE cells are insensitive to Erk inhibition as early as E3.5. This result is puzzling, as about one-third of ICM cells are not specified at the 64–128 stage in *Gata6*<sup>+/-</sup> ICMs [36]. It remains to be known whether an FGFR2 activity other than Erk can explain such a difference.

Interestingly, PrE cell numbers are restored in *Gata6*<sup>+/-</sup> and *MFgf4*<sup>+/-</sup> embryos at E4.5 [20,22]. As Epi cells lose their plasticity early in *Gata6*<sup>+/-</sup> embryos [20], it is unlikely that the recovery of PrE cell number is due to a conversion of Epi cells into PrE cells. Although it was not examined, this increase in PrE cells could be due to a higher cell proliferation.

Recently, it was shown that *Nanog* is first expressed monoallelically until the late blastocyst stage and then switches to a biallelic expression [16]. The results were disputed [38,39], but a recent single-cell allelic sequencing analysis confirms the monoallelic expression [40]. As the levels of *Nanog*, *Gata6* and active Erk seem to balance cell fate in the ICM, it was surprising that Epi/PrE specification occurs properly in *Nanog* heterozygous early blastocysts [16,27]. This could be explained by an absence of difference in *Nanog* levels between wild-type and heterozygous embryos, as it is monoallelically expressed. This could imply that *Nanog* must be monoallelically expressed to maintain the proper balance with *Gata6* and the FGF signalling pathway during lineage specification.

### (e) Other factors implicated in epiblast/primitive endoderm specification

So far, no other transcription factors or signalling pathways have been found to clearly modulate Epi versus PrE specification. Despite Oct4 impact on ES cell pluripotency, *Oct4* mutant embryos produce Epi and PrE cells in correct proportions [41,42]. This suggests that Oct4 is dispensable for Epi versus PrE specification. However, these embryos do not respond to artificially strong variations of the Erk pathway like their wild-type littermates. Indeed, in *Oct4*<sup>-/-</sup> embryos, *Gata6* expression is not downregulated by FGFR/Mek inhibitor treatment, with some cells co-expressing both *Nanog* and *Gata6*. In addition, *Nanog* is still present upon FGF4 administration [41]. Thus, some of the artificially high and low Erk activities seem to be transduced through Oct4, revealing an involvement of Oct4 in cell plasticity. The physiological relevance of these interesting results is not clear as yet, and additional experiments will be needed to understand the interactions between Oct4 and the RTK pathway.

The RTK pathway does not impact ICM cell specification in human embryos, whereas salt and pepper expression of *Nanog* and *Gata6* is present [43,44]. This striking feature shows that *Nanog* and *Gata6* are the conserved factors, while a pathway other than RTK must be regulating them. Their antagonism seems to be conserved as shown by *Nanog* siRNA experiments in human ES cells. Indeed, despite their mature Epi identity compared with mouse ES cells [45], these human ES cells induce PrE and trophectoderm markers upon *Nanog* knockdown [46]. Bovine embryos are influenced by variations in RTK pathway activity but are less sensitive than mouse or rat embryos [43,44]. Thus, other signals must reinforce the FGF pathway in the bovine embryo and replace it in human ones. For example, the Wnt and Bmp pathways are good candidates as they have been reported to be involved in mouse ES cell maintenance or differentiation [47–49]. *Bmp4* is indeed specifically expressed in Epi precursors at E3.5 [15] and plays a role in extraembryonic endoderm lineage differentiation, possibly as early as PrE formation, in embryoid bodies [50].

## 3. Different hypotheses for the induction of the salt and pepper pattern

*Nanog* and *Gata6* are coexpressed in all ICM cells before the induction of the salt and pepper pattern around E3.25. Single-cell quantification *in situ* of these markers revealed that Epi cells are specified first [20] through an as yet unknown

mechanism. Remarkably, the specification into either Epi or PrE is the consequence of the down- rather than upregulation of these two factors, both at the RNA and protein level [15,20,23,36,51]. Another important feature is that the prevalence of one of the factors is not synchronous in all ICM cells, but gradually extends to reach completion around E3.75 [14,23].

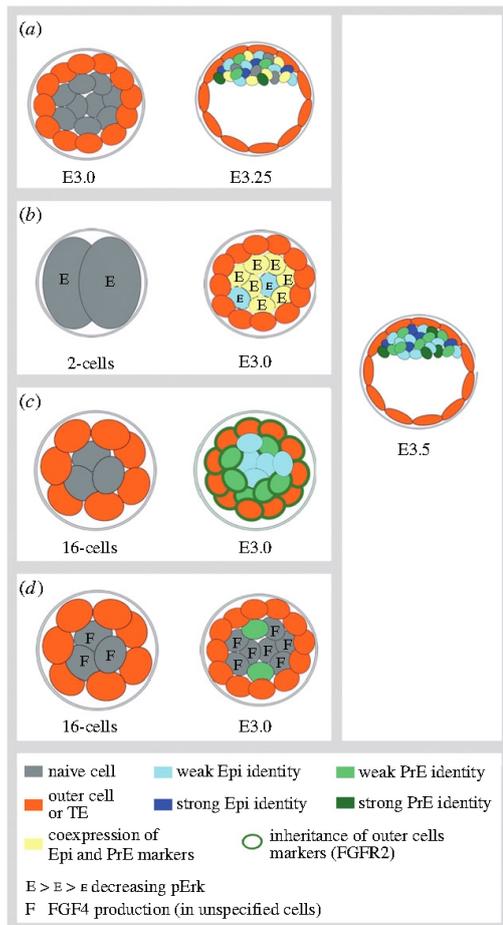
The FGF4/FGFR pathway is required to set up the salt and pepper pattern [21,22]. Surprisingly, the use of increasing exogenous doses of recombinant FGF4 cannot rescue a proper salt and pepper pattern in *Fgf4* mutants, the ICM behaving in a bimodal fashion with either only Epi or only PrE cells [21,22]. The need for a heterogeneous FGF4 distribution is a likely interpretation [21] that can be explained mathematically [20]. A few FGF4-expressing cells would induce a PrE identity in neighbouring cells while further away from the FGF4 source other cells would adopt an Epi identity. The asynchronous specification would be thus a consequence of the propagation of FGF4 and an important component of the cell lineage specification mechanism.

It is not known whether FGF4 is the induction trigger or whether it transmits an earlier signal. Indeed, *Fgf4* expression is under the control of *Nanog* and, as there is a progressive increase of *Nanog* protein expression, with cell-to-cell variations, from compaction to the early blastocyst stage [20,51], a defined threshold could induce *Fgf4* expression. The mathematical model predicts that only one *Nanog*-expressing cell would be sufficient to produce enough FGF4 to propagate the salt and pepper mechanism [20]. However, these few cells might be difficult to detect as the cell-to-cell variation of *Nanog* and *Gata6* expressions are small at the RNA level [15,23], even if they seem more obvious at the protein level [20,51]. A slight difference between these factor levels nevertheless might be sufficient to induce a burst of FGF4 expression. Indeed, FGF4 is one of the first factors to clearly appear in a salt and pepper pattern [15,23]. Alternatively, a timely cofactor could help *Nanog* in inducing FGF4. It is also possible that *Nanog* only maintains an earlier FGF4 induction.

Altogether, the results published in the recent years suggest different scenarios for the induction of the salt and pepper pattern.

### (a) Stochastic cell-to-cell expression heterogeneity

Single-cell transcriptomic analyses reveal that there is no clear RNA expression pattern in ICM cells at E3.25, as no correlation can be established between expressed genes, even for the genes that show a segregated pattern at E4.5 [15,23]. These genes are expressed at different levels, with a random distribution in the ICM population, suggesting a stochastic activity of their expression. Single-cell quantification *in situ* supports this hypothesis as no spatial correlation between specifying cells can be found [36]. During the subsequent stages, gene expression correlations can be observed depicting the beginning of an identity acquisition. At E3.5, most of the cells can be classified with Epi or PrE signatures [15,20,23,28,36]. Thus, when the cells start to specify they gradually acquire their lineage-related markers while downregulating the ones from the alternative lineage (figure 2*a*). This model proposed by Ohnishi *et al.* [23] also takes into account the action of the secreted FGF4, which reinforces the cell-to-cell segregation. These studies confirm that lineage identity is only acquired around E3.5 [14]. However, these acquired identities are the output of an earlier specification mechanism. Stochastic gene



**Figure 2.** Proposed models for the initiation of the salt and pepper pattern. (a) **Stochasticity.** Before E3.25, inner cells express some Epi and PrE markers randomly. From E3.25, cells progressively acquire either an Epi or a PrE signature, owing to cell-to-cell stochastic expression reinforced by cell interactions. By E3.75, the two lineages are distinct [23]. (b) **Nanog expression gain through pErk decrease.** Cells express high levels of active Erk at the two cells stage, owing to high levels of FGF4. The transcription of *Fgf4* diminishes subsequently. From the 8-cell stage, Nanog and *Gata6* are coexpressed in all the cells. Around E3.0–E3.25, the FGF4 protein levels are heterogeneous leading to a lower Erk activity in some cells. As a consequence, these cells promote Nanog expression, which in turn re-induces FGF4 expression at high levels. The neighbouring cells receive the FGF4 message and differentiate into PrE. The specification of the two lineages is asynchronous and leads to a progressive cell-to-cell identity acquisition [20]. (c) **Inherent differences between In1 and In2 cells.** At the 32-cell stage (E3.0), In2 cells inherit FGF2 from their mothers. As a consequence, In2 cells preferentially become PrE cells, whereas In1 cells favour an Epi identity [52]. In1 cells could acquire an Epi identity as soon as they are internalized or later, as a default state. (d) **Inside cell accumulation.** Inner cells (In1 and In2) produce FGF4. The accumulation of FGF4-expressing cells leads to high concentration of secreted FGF4 that is sufficient to induce PrE differentiation in some cells [53]. Epi identity could be acquired as an induced or default state.

activation followed by mutual reinforcement could be one explanation. Still, the early expression of *Fgf4* in a subset of cells at E3.25 [15,23] clearly designates it as the earliest

identified marker for the salt and pepper set up. How FGF4 is produced in a subset of cells is not clear yet, and it remains to be known whether stochastic activation of FGF4 alone can be the switch for Epi versus PrE specification.

### (b) Dilution of early FGF4 secretion promotes Nanog expression

Throughout preimplantation, the expression of *Fgf4* is very dynamic. While being high at the 2-cell stage, it then decreases until the set-up of the salt and pepper pattern and is high again in Epi cells only [15]. These dynamic changes in FGF4 levels could trigger the binary decision. During cell divisions, the early secretion of FGF4 is certainly diluted and diffuses, possibly creating the local heterogeneities needed to set up the salt and pepper pattern. As Epi cells are specified first, it would be a decrease—and not an increase—of FGF4 production that would be the trigger [20,54]. The lower Erk activity in some cells would promote Nanog and downregulate *Gata6* expression (figure 2b). Nanog-expressing cells would then generate the salt and pepper pattern by inducing the later FGF4 expression. This hypothesis is supported by the mathematical model, but the role of early FGF4 expression, however, will be difficult to assess as well as the active Erk decrease (predictions indicate that a 15% decrease would be sufficient) [20]. Moreover, the mathematical model refers to *Gata6*, Nanog and the FGF4/FGFR2 pathway activities only, whereas any additional factor, such as another RTK ligand or a transcription factor, promoting Nanog expression could act to switch on the salt and pepper expression pattern.

### (c) History from different rounds of asymmetric division

More than 25 years ago Chisholm & Houliston [55] observed a difference of cytokeratin expression between cells issued from the first (In1) or the second (In2) asymmetric division, and it was suggested that the round of cell internalization could influence ICM cell fate [9,55]. More recently, cell-lineage-tracing experiments through microinjection did not support this hypothesis, showing equal potential fates for In1 and In2 cells [3]. Conversely, manual cell-tracking analyses showed that a great majority of In1 cells preferentially contribute to the Epi while In2 cells rather produce PrE cells [5,52]. It was suggested that the time spent outside biases cell fate of In2 cells, as outer cells producing In2 would be less pluripotent, owing to their differentiation towards trophectoderm. This hypothesis was tested by enclosing a single 8-cell stage blastomere or an outside cell from the 16-cell stage with 8-cell stage ‘host’ blastomeres. While blastomere size or the number of enclosing cells were not considered, this experiment showed a different Epi/PrE ratios contribution between 8- and 16-cell stage blastomeres [52].

Higher levels of *Fgfr2* mRNAs were observed *in situ* in outside cells at the 16-cell stage. The authors suggested that the receptor could be maintained in In2 cells [52]. This differential expression, initially driven by outside cells, would then promote a PrE state in In2 cells (figure 2c). It was thus proposed that In1 and In2 cells are inherently different [52]. This interesting scenario would have to be sustained by more FGFR2 expression experiments at different stages to confirm and understand its dynamic pattern. Additionally,

overexpressing FGFR2 from the 2-cell stage shows that it can bias cells towards a PrE identity [52]. However, it does not indicate whether FGFR2 is required already at the 16-cell stage or only later during the propagation of the salt and pepper pattern around E3.25–E3.5, as was shown using FGFR/Mek inhibitors [3,19].

#### (d) Accumulation of inner FGF4-expressing cells leads to the initiation of the salt and pepper pattern

The number of In1 cells at the 16-cell stage can vary, according to the genetic background and to the method used to identify them [4–7,52,53,56]. Time-lapse microscopy revealed a correlation between In1 and Epi fate only if the In1/In2 ratio is low [52,56], reconciling the divergent cell tracing reports [3,5]. To examine the influence of the number of In1 cells on Epi/PrE specification, different ratios of inner/outer cells at the 16-cell stage were analysed to assess cell potential through blastomere reaggregation [53]. This analysis also concluded that there is a strong bias of In1 for Epi and In2 for PrE when the number of internalized cells at the 16-cell stage is low. Thus, from relatively similar results [52,53,56], two different models were proposed (figure 2*c,d*). One favours that the influence is driven by outside cells resulting in intrinsically molecularly different In1 and In2 cells (figure 2*c*) [5,52]. The other model privileges the number of internalized cells as the biasing factor with no impact of their origin from the first or second round of asymmetric divisions (figure 2*d*). As a differential expression of *Fgf4*, although not significant, was found between In1 and In2 cells, the authors suggested that cell specification depends on the accumulation of this ligand. During their internalization, In1 or In2 cells would have an equal potential and express low levels of FGF4. The accumulation of these *Fgf4*-expressing cells would lead to greater levels of extracellular FGF4, which, at a defined level would induce PrE differentiation (figure 2*d*) [53]. A low number of In1 cells would secrete low amounts of FGF4, unable to induce any PrE specification, thus pushing them towards an Epi identity. In this case, In1 cells would be biased towards an Epi identity. In the case that the number of In1 cells is high, the pool of available FGF4 would be sufficient to induce a PrE identity within In1 cells, erasing any correlation between inner cell generations and cell fate. Therefore, in this model (figure 2*d*), the bias would be generated by inside cells.

Thus, each of these models will require additional experiments to be confirmed. The proposed mechanisms are not exclusive, and a combination of these models might be the final solution. It will be important to clearly determine the dynamic expression patterns of FGF4 and FGFR2 and their aetiology.

## 4. Differentiation of the specified lineages

### (a) Epiblast differentiation

Once specified, Epi and PrE lineages rapidly differentiate. Little is known about Epi lineage maturation. The changes might be minor as the cells must be kept in a pluripotent state. A downregulation of Nanog is observed from E4.5 [57], which is dependent on the presence of FGF4 [21]. Thus, like in ES cells [58], the FGF signalling might be preparing Epi cells for their differentiation into the three germ layers. In *Gata6*<sup>-/-</sup> embryos, Nanog expression diminishes at the same time as in wild-type

littermates, meaning that this decay does not depend on the PrE [20]. Thus, despite a precocious specification, these mutant Epi cells are reset at a normal timing.

Recent reports have shown that *Oct4* and *STAT3* are necessary for the maintenance of both Epi and PrE lineages as early as E4.5 [41,42,59]. The defects in the Epi are probably owing to the reactivation of *Cdx2* expression [60]. As *Oct4* is a direct target of the *STAT3* pathway [59], the phenotype of the corresponding mutants might be similar.

Some markers, such as *Fgf5* [61] or the *Nodal* enhancer ASE [62], are upregulated during Epi maturation. Interestingly, the downregulation of *Nanog* is heterogeneous in the Epi cells at E4.5 and corresponds to the appearance of the ASE-GFP transgene. The two markers are thus expressed in a complementary and exclusive manner, suggesting a release of inhibition by *Nanog* on the ASE [62]. As *Nodal* is required to keep the Epi from neural differentiation [63,64], the results suggest that it might relay *Nanog* in maintaining pluripotency [62], probably with different features.

### (b) Primitive endoderm differentiation

PrE cells differentiate fast, as they need to be functional as soon as possible to sustain the nutritional needs of the embryo. The analyses of *Nanog* mutant embryos revealed that Epi cells have a critical role in PrE differentiation. Indeed, while they express *Gata6*, *Nanog*<sup>-/-</sup> embryos have very few or any cells expressing *Sox17*, *Gata4* or *Pdgfra* [25–27]. The lack of *Sox17* or *Gata4* expressing cells is rescued when wild-type Epi cells are present, either through ES cells chimaera complementation [26] or through mosaic inactivation of *Nanog* [27]. Because *Fgf4* is transcribed specifically in *Nanog*-expressing cells and is absent in E3.5 *Nanog*<sup>-/-</sup> embryos, it suggested that FGF4 is potentially the non-cell-autonomous factor required for PrE maturation. Strikingly, the administration of recombinant FGF4 to *Nanog*<sup>-/-</sup> embryos rescues the expression of *Sox17*, *Gata4* and *Pdgfra* expression, confirming the hypothesis [27]. Altogether, experiments with *Nanog* mutants show that *Gata6* alone cannot induce the expression of these maturation genes. They require an activation by FGF4 that is secreted from Epi cells under the control of *Nanog*. As well, FGF4 cannot activate *Sox17* and *Gata4* in the absence of *Gata6* [20,36] meaning that a cooperation between *Gata6* and FGF4 is needed.

Similar experiments were carried out with *Oct4* zygotic mutant embryos. These embryos specify PrE cells but cannot maintain them, the number of *Gata6* expressing cells diminishing drastically [41]. FGF4 expression is missing in *Oct4*-deleted embryos at E3.5 [42]. In these embryos, where *Oct4* is excised from the 8-cell stage, administration of recombinant FGF4 can rescue *Sox17* expression, but not later aspects of PrE development. This means that either *Oct4* induces another non-cell-autonomous factor from the Epi or that *Oct4* is required cell-autonomously in the PrE. To this end, chimaera complementation experiments were carried out with wild-type ES cells. In embryos where *Oct4* is deleted from the 8-cell stage, wild-type ES cells can rescue a PrE phenotype when injected early (at the 8-cell stage) as opposed to late (at the blastocyst stage). This shows that in this case *Oct4* is not required within PrE cells. In addition, it suggests that the required non-cell-autonomous factor(s) needs to accumulate or to act early on to be fully efficient. Another chimaera essay with wild-type ES cells aggregated to 8-cell stage zygotic mutant embryos failed to rescue

Sox17 expression. While the role of Cdx2 re-expression in the ICM needs to be assessed, this result means that *Oct4* is required cell-autonomously in the PrE [41]. The difference between the two chimaera assays may reside in the timing of *Oct4* deletion and that in 8-cell-stage deleted embryos the cell-autonomous factor might have acted beforehand. A difference could also be due to different genetic backgrounds. It is noteworthy that Oct4 changes target DNA binding sites due to different partners, from Sox2 to Sox17, upon PrE differentiation and this reflects a cell-autonomous requirement within the PrE [65]. Altogether, the three studies are complementary and suggest that Oct4 activates first an unknown cell-autonomous factor before the 8-cell stage and then a non-cell-autonomous factor, which both allow the later differentiation of PrE-specified cells.

After maturation by FGF4, PrE cells sort from Epi cells to join the surface of the ICM, in contact with the blastocoel cavity. Before or during their migration, PrE cells acquire additional expression markers. Several of these were found at E3.5 days during the first single-cell RNA analysis of the blastocyst: *Sox17*, *Gata4*, *Pdgfra*, *Cubn*, *Lama1*, *Foxq1*, *Serpinh1*, *Col4a2* [28]. Expression of many of these and other genes was confirmed *in situ* at different stages [23,66–68]. A recent single-cell RNA analysis led to a ranking of PrE-expressed genes according to their timing of activation, their preponderance and their coexpression among PrE cells [23]. Collectively, the data present a hierarchy in the sequence of gene activation. A first group comprises genes/proteins expressed shortly after PrE specifies, before the cells have sorted: *Gata6*, *Sox17*, *Serpinh1*, *Laminin1*, followed by *Gata4*, *Lrp2*, *Pdgfra*, *Col4a* [14,23,66–68]. Some proteins such as *Sox7*, *Lrp2* or *Dab2* initiate their expression or change subcellular localization when individual cells reach the surface of the ICM [66,68].

*Dab2* excepted, all these PrE differentiation genes are not absolutely required to proceed to the next steps of differentiation towards visceral or parietal endoderm. ChIP analyses reveal complex interactions between these genes [67], suggesting mutual reinforcement of their expression and possible redundant activities.

At the time of cell sorting, a high proportion of ICM cells, about 20%, undergo apoptosis [69]. The reason is unknown as it is impossible to identify dying cells on fixed embryos. There are several hypotheses that are not exclusive. Some cells could not manage to resume either an Epi or a PrE identity and would die as a consequence. This is supported by the mathematical model that also predicts undetermined cells during ICM cell specification [20]. Interestingly, in *Nanog* mutant embryos in which all ICM cells have chosen to become PrE, there is no cell death at E3.75, also reinforcing this hypothesis. Alternatively, some specified cells might die because they do not manage to reach their final position, which is inside for an Epi cell or at the surface for a PrE cell. Apoptosis would thus eliminate misplaced cells to achieve two homogeneous tissues. However, some rare PrE cells can be found deep in the ICM as late as E4.75 in wild-type embryos (C. Chazaud 2010, unpublished data) or in sorting impaired embryos [70]. It is not excluded that cells from any compartment, Epi and PrE, could die. Absence of *Pdgfra* increases PrE cell death [71], but this might be unrelated to the observed wild-type cell death. Indeed, a Z-VAD caspase inhibitor treatment cannot prevent cell death of wild-type embryos, whereas it can rescue the number of *Pdgfra*<sup>-/-</sup> PrE to wild-type levels [71], suggesting different mechanisms.

### (c) Cell sorting mechanisms and epithelium formation

The cell sorting process became evident when cell lineage tracing and cell grafts revealed that most ICM cells at E3.5 do not change their identity [10]. The use of the *Pdgfra*-GFP reporter enabled filming and tracking of PrE cells at the late blastocyst stage and revealed that the segregation into two layers is completed around the 100-cell stage *ex vivo* [14]. The beginning of these directional movements is difficult to define as the frequent cell divisions also cause cell displacement [11]. Although it is possible that PrE cells seek the ICM surface as soon as they have specified, thus in an asynchronous manner. This would lead to an increasing bias in finding PrE cells at the surface, which can already be detected around E3.5 [23]. The mechanism(s) involved in these cell movements are still not clear, but mathematical modelization suggests that both cell adhesion and directional cues are required [72]. Experiments recapitulating the Steinberg affinity hypothesis [73] were carried out in embryoid bodies lacking E- or N-cadherin. The authors found that the difference of adhesiveness can result in the segregation of Epi and PrE cells. But, surprisingly, removing cadherins did not prevent cell sorting when the cells are primarily treated with retinoic acid, used as a primer for PrE differentiation, suggesting that other mechanisms are involved [74,75]. Passive rearrangements after cell division participate in the sorting [11]. In addition, experiments with cytochalasin D show the involvement of actin-dependent movements [11]. Active cell movements imply polarization of the PrE cells, but so far no polarized proteins have been found during cell migration through the ICM. The first polarization cues that are detected are *Lrp2* and *Dab2*, which are localized on the future apical side of the epithelium only once the cells have reached the surface. Interestingly, cell polarization occurs in individual cells, before all the cells have attained the surface [66]. Analyses in embryoid bodies show that this polarization, once at the surface, seems to be progressive [75], suggesting that the cells are not polarized beforehand, at least with these markers. While being involved in many early polarization events and directional cell migration [76], the atypical protein kinase C (aPKC) protein is enriched apically in the PrE epithelium only around E4.5 [77], thus after *Lrp2* and *Dab2* polarized expression. Impairment of aPKC function through RNAi or with a pharmacological inhibitor during four-dimensional imaging reveals that cell sorting occurs correctly in these aPKC deficient embryos, but maintenance of the PrE epithelium is affected [77]. The endocytic adaptor protein *Dab2*, which interacts with LDL receptor complexes such as *Lrp2*, is required for PrE cell sorting [70,78]. This is surprising as the protein is only apparent once the cells are at the ICM surface [66]. This could be due to undetectable expression at earlier stages or, as in aPKC-deficient embryos, owing to a failure to maintain the cells at the surface. Interestingly, the inactivation of *Oct4* in embryoid bodies leads to a cell-sorting defect as *Dab2* or  $\alpha$ -fetoprotein expressing cells remain inside the clump [79]. This phenotype remain to be checked in embryo live imaging and could provide novel cues for the cell sorting model.

Formation and maintenance of the PrE epithelium remains largely unknown with very few experiments reporting potential mechanisms. Embryoid bodies [80] resulting from ES cell aggregation have provided a lot of information, notably on the importance for the laminin/integrin pathway [81]. As mentioned above, a deficient aPKC signalling induces defects in epithelium formation. One of the consequences of this

inhibition is Gata4 localization in the cytoplasm instead of its usual expression in the nucleus [77]. Gata4 is probably not the only target of aPKC as *Gata4*<sup>-/-</sup> embryos survive that stage and die of later postimplantation defects [82,83], despite a lack of PrE differentiation in mutant ES cells [84]. This Gata4-mislocalized expression is also observed in integrin- $\beta$ 1 null embryoid bodies [85]. In these embryoid bodies, which recapitulate the embryonic phenotype [78], specified and sorted PrE cells detach because of the lack of a proper basement membrane. Thus, potential interactions between aPKC and integrin pathways could lead to the set-up or the maintenance of epithelial polarity, as was shown in other systems [86,87]. Sox17 is also implicated in the maintenance of the epithelium as Sox17-deficient embryos have PrE cells that are scattered on the mural trophoblast cells. Whether this defect is linked to the aPKC/integrin pathway or is a distinct phenotype remains to be established.

## References

- Rossant J, Tam PP. 2009 Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* **136**, 701–713. (doi:10.1242/dev.017178)
- Kwon GS, Viotti M, Hadjantonakis AK. 2008 The endoderm of the mouse embryo arises by dynamic widespread intercalation of embryonic and extraembryonic lineages. *Dev. Cell* **15**, 509–520. (doi:10.1016/j.devcel.2008.07.017)
- Yamanaka Y, Lanner F, Rossant J. 2010 FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development* **137**, 715–724. (doi:10.1242/dev.043471)
- McDole K, Xiong Y, Iglesias PA, Zheng Y. 2011 Lineage mapping the pre-implantation mouse embryo by two-photon microscopy, new insights into the segregation of cell fates. *Dev. Biol.* **355**, 239–249. (doi:10.1016/j.ydbio.2011.04.024)
- Morris SA, Teo RT, Li H, Robson P, Glover DM, Zernicka-Goetz M. 2010 Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 6364–6369. (doi:10.1073/pnas.0915063107)
- Watanabe T, Biggins JS, Tannan NB, Srinivas S. 2014 Limited predictive value of blastomere angle of division in trophectoderm and inner cell mass specification. *Development* **141**, 2279–2288. (doi:10.1242/dev.103267)
- Anani S, Bhat S, Honma-Yamanaka N, Krawchuk D, Yamanaka Y. 2014 Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. *Development* **141**, 2813–2824. (doi:10.1242/dev.107276)
- Rossant J. 1975 Investigation of the determinative state of the mouse inner cell mass. II. The fate of isolated inner cell masses transferred to the oviduct. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **33**, 991–1001.
- Rossant J, Chazaud C, Yamanaka Y. 2003 Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **358**, 1341–1348; discussion 1349. (doi:10.1098/rstb.2003.1329)
- Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T, Rossant J. 2006 Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev. Cell* **10**, 615–624. (doi:10.1016/j.devcel.2006.02.020)
- Meilhac SM, Adams RJ, Morris SA, Danckaert A, Le Garrec JF, Zernicka-Goetz M. 2009 Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* **331**, 210–221. (doi:10.1016/j.ydbio.2009.04.036)
- Grabarek JB, Zyzynska K, Saiz N, Piliszek A, Frankenberg S, Nichols J, Hadjantonakis AK, Plusa B. 2012 Differential plasticity of epiblast and primitive endoderm precursors within the ICM of the early mouse embryo. *Development* **139**, 129–139. (doi:10.1242/dev.067702)
- Singh AM, Hamazaki T, Hankowski KE, Terada N. 2007 A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells* **25**, 2534–2542. (doi:10.1634/stemcells.2007-0126)
- Plusa B, Piliszek A, Frankenberg S, Artus J, Hadjantonakis AK. 2008 Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* **135**, 3081–3091. (doi:10.1242/dev.021519)
- Guo G, Huss M, Tong GQ, Wang C, Li Sun L, Clarke ND, Robson P. 2010 Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev. Cell* **18**, 675–685. (doi:10.1016/j.devcel.2010.02.012)
- Miyazaki Y, Torres-Padilla ME. 2012 Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog. *Nature* **483**, 470–473. (doi:10.1038/nature10807)
- Laslo P, Spooner CJ, Warmflash A, Lancki DW, Lee HJ, Sciammas R, Gantner BN, Dinner AR, Singh H. 2006 Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* **126**, 755–766. (doi:10.1016/j.cell.2006.06.052)
- Scully KM, Rosenfeld MG. 2002 Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* **295**, 2231–2235. (doi:10.1126/science.1062736)
- Nichols J, Silva J, Roode M, Smith A. 2009 Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development* **136**, 3215–3222. (doi:10.1242/dev.038893)
- Bessonard S, De Mot L, Gonze D, Barriol M, Dennis C, Goldbeter A, Dupont G, Chazaud C. In press. Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. *Development*. (doi:10.1242/dev.109678)
- Kang M, Piliszek A, Artus J, Hadjantonakis AK. 2013 FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Development* **140**, 267–279. (doi:10.1242/dev.084996)
- Krawchuk D, Honma-Yamanaka N, Anani S, Yamanaka Y. 2013 FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* **384**, 65–71. (doi:10.1016/j.ydbio.2013.09.023)
- Ohnishi Y *et al.* 2014 Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages. *Nat. Cell Biol.* **16**, 27–37. (doi:10.1038/ncb2881)
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. 2003 The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631–642. (doi:10.1016/S0092-8674(03)00393-3)
- Silva J *et al.* 2009 Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* **138**, 722–737. (doi:10.1016/j.cell.2009.07.039)
- Messerschmidt DM, Kemler R. 2010 Nanog is required for primitive endoderm formation through a non-cell autonomous mechanism. *Dev. Biol.* **344**, 129–137. (doi:10.1016/j.ydbio.2010.04.020)

27. Frankenberg S, Gerbe F, Bessonnard S, Belville C, Pouchin P, Bardot O, Chazaud C. 2011 Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Dev Cell* **21**, 1005–1013. (doi:10.1016/j.devcel.2011.10.019)
28. Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Ono Y, Uno KD, Yamada RG, Ueda HR, Saitou M. 2006 An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res.* **34**, e42. (doi:10.1093/nar/gkl050)
29. Shi G, Gao F, Jin Y. 2011 The regulatory role of histone deacetylase inhibitors in Fgf4 expression is dependent on the differentiation state of pluripotent stem cells. *J. Cell Physiol.* **226**, 3190–3196. (doi:10.1002/jcp.22679)
30. Fujikura J, Yamato E, Yonemura S, Hosoda K, Masui S, Nakao K, Miyazaki Ji J, Niwa H. 2002 Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev.* **16**, 784–789. (doi:10.1101/gad.968802)
31. Shimosato D, Shiki M, Niwa H. 2007 Extra-embryonic endoderm cells derived from ES cells induced by GATA factors acquire the character of XEN cells. *BMC Dev. Biol.* **7**, 80. (doi:10.1186/1471-213X-7-80)
32. Morrissey EE, Tang Z, Sigris K, Lu MM, Jiang F, Ip HS, Parmacek MS. 1998 GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* **12**, 3579–3590. (doi:10.1101/gad.12.22.3579)
33. Capo-Chichi CD, Rula ME, Smedberg JL, Vanderveer L, Parmacek MS, Morrissey EE, Godwin AK, Xu XX. 2005 Perception of differentiation cues by GATA factors in primitive endoderm lineage determination of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **286**, 574–586. (doi:10.1016/j.ydbio.2005.07.037)
34. Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, Beddington R, Grosveld F. 1999 The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* **126**, 723–732.
35. Cai KQ, Capo-Chichi CD, Rula ME, Yang DH, Xu XX. 2008 Dynamic GATA6 expression in primitive endoderm formation and maturation in early mouse embryogenesis. *Dev. Dyn.* **237**, 2820–2829. (doi:10.1002/dvdy.21703)
36. Schrodde N, Saiz N, Di Talia S, Hadjantonakis AK. 2014 GATA6 levels modulate primitive endoderm cell fate choice and timing in the mouse blastocyst. *Dev. Cell* **29**, 454–467. (doi:10.1016/j.devcel.2014.04.011)
37. Santostefano KE, Hamazaki T, Pardo CE, Kladde MP, Terada N. 2012 Fibroblast growth factor receptor 2 homodimerization rapidly reduces transcription of the pluripotency gene Nanog without dissociation of activating transcription factors. *J. Biol. Chem.* **287**, 30 507–30 517. (doi:10.1074/jbc.M112.388181)
38. Filipczyk A, Gkatzis K, Fu J, Hoppe PS, Lickert H, Anastassiadis K, Schroeder T. 2013 Biallelic expression of Nanog protein in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **13**, 12–13. (doi:10.1016/j.stem.2013.04.025)
39. Faddah DA, Wang H, Cheng AW, Katz Y, Buganim Y, Jaenisch R. 2013 Single-cell analysis reveals that expression of Nanog is biallelic and equally variable as that of other pluripotency factors in mouse ESCs. *Cell Stem Cell* **13**, 23–29. (doi:10.1016/j.stem.2013.04.019)
40. Deng Q, Ramskold D, Reinius B, Sandberg R. 2014 Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science* **343**, 193–196. (doi:10.1126/science.1245316)
41. Frum T, Halbisen MA, Wang C, Amiri H, Robson P, Ralston A. 2013 Oct4 cell-autonomously promotes primitive endoderm development in the mouse blastocyst. *Dev. Cell* **25**, 610–622. (doi:10.1016/j.devcel.2013.05.004)
42. Le Bin GC *et al.* 2014 Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst. *Development* **141**, 1001–1010. (doi:10.1242/dev.096875)
43. Kuijk EW, van Tol LT, Van de Velde H, Wubolts R, Welling M, Geijsen N, Roelen BA. 2012 The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development* **139**, 871–882. (doi:10.1242/dev.071688)
44. Roode M, Blair K, Snell P, Elder K, Marchant S, Smith A, Nichols J. 2012 Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling. *Dev. Biol.* **361**, 358–363. (doi:10.1016/j.ydbio.2011.10.030)
45. Xu RH *et al.* 2008 NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell* **3**, 196–206. (doi:10.1016/j.stem.2008.07.001)
46. Hyslop L *et al.* 2005 Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* **23**, 1035–1043. (doi:10.1634/stemcells.2005-0080)
47. Finley MF, Devata S, Huettner JE. 1999 BMP-4 inhibits neural differentiation of murine embryonic stem cells. *J. Neurobiol.* **40**, 271–287. (doi:10.1002/(SICI)1097-4695(19990905)40:3<271::AID-NEU1>3.0.CO;2-C)
48. Levine AJ, Brivanlou AH. 2006 GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. *Development* **133**, 209–216. (doi:10.1242/dev.02192)
49. Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. 2008 The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–523. (doi:10.1038/nature06968)
50. Coucouvanis E, Martin GR. 1999 BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development* **126**, 535–546.
51. Dietrich JE, Hிராஜி T. 2007 Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* **134**, 4219–4231. (doi:10.1242/dev.003798)
52. Morris SA, Graham SJ, Jedrusik A, Zemicka-Goetz M. 2013 The differential response to FGF signalling in cells internalized at different times influences lineage segregation in preimplantation mouse embryos. *Open Biol.* **3**, 130104. (doi:10.1098/rsob.130104)
53. Krupa M, Mazur E, Szczepanska K, Filimonow K, Maleszewski M, Suwinska A. 2014 Allocation of inner cells to epiblast vs primitive endoderm in the mouse embryo is biased but not determined by the round of asymmetric divisions (8→16- and 16→32-cells). *Dev. Biol.* **385**, 136–148. (doi:10.1016/j.ydbio.2013.09.008)
54. Martinez Arias A, Nichols J, Schroter C. 2013 A molecular basis for developmental plasticity in early mammalian embryos. *Development* **140**, 3499–3510. (doi:10.1242/dev.091959)
55. Chisholm JC, Houliston E. 1987 Cytokeratin filament assembly in the preimplantation mouse embryo. *Development* **101**, 565–582.
56. Morris SA. 2011 Cell fate in the early mouse embryo: sorting out the influence of developmental history on lineage choice. *Reprod. Biomed. Online* **22**, 521–524. (doi:10.1016/j.rbmo.2011.02.009)
57. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. 2003 Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643–655. (doi:10.1016/S0092-8674(03)00392-1)
58. Kunath T *et al.* 2005 Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development* **132**, 1649–1661. (doi:10.1242/dev.01715)
59. Do DV *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. (doi:10.1101/gad.221176.113)
60. Ralston A *et al.* 2010 Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development* **137**, 395–403. (doi:10.1242/dev.038828)
61. Goldin SN, Papaioannou VE. 2003 Paracrine action of FGF4 during periimplantation development maintains trophoblast and primitive endoderm. *Genesis* **36**, 40–47. (doi:10.1002/gene.10192)
62. Granier C *et al.* 2011 Nodal cis-regulatory elements reveal epiblast and primitive endoderm heterogeneity in the peri-implantation mouse embryo. *Dev. Biol.* **349**, 350–362. (doi:10.1016/j.ydbio.2010.10.036)
63. Camus A, Perea-Gomez A, Moreau A, Collignon J. 2006 Absence of Nodal signaling promotes precocious neural differentiation in the mouse embryo. *Dev. Biol.* **295**, 743–755. (doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.047)
64. Mesnard D, Guzman-Ayala M, Constam DB. 2006 Nodal specifies embryonic visceral endoderm and sustains pluripotent cells in the epiblast before overt axial patterning. *Development* **133**, 2497–2505.
65. Aksoy I, Jauch R, Eras V, Bin AC, Chen J, Divakar U, Ng CK, Kolatkar PR, Stanton LW. 2013 Sox transcription factors require selective interactions with Oct4 and specific transactivation functions to mediate reprogramming. *Stem Cells* **31**, 2632–2646. (doi:10.1002/stem.1522)

66. Gerbe F, Cox B, Rossant J, Chazaud C. 2008 Dynamic expression of Lrp2 pathway members reveals progressive epithelial differentiation of primitive endoderm in mouse blastocyst. *Dev. Biol.* **313**, 594–602. (doi:10.1016/j.ydbio.2007.10.048)
67. Niakan KK *et al.* 2010 Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *Genes Dev.* **24**, 312–326. (doi:10.1101/gad.1833510)
68. Artus J, Piliszek A, Hadjantonakis A-K. 2011 The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Dev. Biol.* **350**, 393–404. (doi:10.1016/j.ydbio.2010.12.007)
69. Copp AJ. 1978 Interaction between inner cell mass and trophoblast of the mouse blastocyst. I. A study of cellular proliferation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **48**, 109–125.
70. Yang DH, Smith ER, Roland IH, Sheng Z, He J, Martin WD, Hamilton TC, Lambeth JD, Xu XX. 2002 Disabled-2 is essential for endodermal cell positioning and structure formation during mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* **251**, 27–44. (doi:10.1006/dbio.2002.0810)
71. Artus J, Kang M, Cohen-Tannoudji M, Hadjantonakis AK. 2013 PDGF signaling is required for primitive endoderm cell survival in the inner cell mass of the mouse blastocyst. *Stem Cells* **31**, 1932–1941. (doi:10.1002/stem.1442)
72. Krupinski P, Chickamane V, Peterson C. 2011 Simulating the mammalian blastocyst—molecular and mechanical interactions pattern the embryo. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1001128. (doi:10.1371/journal.pcbi.1001128)
73. Foty RA, Pflieger CM, Forgacs G, Steinberg MS. 1996 Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. *Development* **122**, 1611–1620.
74. Moore R, Cai KQ, Escudero DO, Xu XX. 2009 Cell adhesive affinity does not dictate primitive endoderm segregation and positioning during murine embryoid body formation. *Genesis* **47**, 579–589. (doi:10.1002/dvg.20536)
75. Moore R, Tao W, Meng Y, Smith ER, Xu XX. 2014 Cell adhesion and sorting in embryoid bodies derived from N- or E-cadherin deficient murine embryonic stem cells. *Biol. Open* **3**, 121–128. (doi:10.1242/bio.20146254)
76. Xiao H, Liu M. 2013 Atypical protein kinase C in cell motility. *Cell Mol. Life Sci.* **70**, 3057–3066. (doi:10.1007/s00018-012-1192-1)
77. Saiz N, Grabarek JB, Sabherwal N, Papalopulu N, Plusa B. 2013 Atypical protein kinase C couples cell sorting with primitive endoderm maturation in the mouse blastocyst. *Development* **140**, 4311–4322. (doi:10.1242/dev.093922)
78. Moore R, Cai KQ, Tao W, Smith ER, Xu XX. 2013 Differential requirement for Dab2 in the development of embryonic and extra-embryonic tissues. *BMC Dev. Biol.* **13**, 39. (doi:10.1186/1471-213X-13-39)
79. Sajini AA, Greder LV, Dutton JR, Slack JM. 2012 Loss of Oct4 expression during the development of murine embryoid bodies. *Dev. Biol.* **371**, 170–179. (doi:10.1016/j.ydbio.2012.08.008)
80. Martin GR, Wiley LM, Damjanov I. 1977 The development of cystic embryoid bodies in vitro from clonal teratocarcinoma stem cells. *Dev. Biol.* **61**, 230–244. (doi:10.1016/0012-1606(77)90294-9)
81. Li S, Edgar D, Fassler R, Wadsworth W, Yurchenco PD. 2003 The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev. Cell* **4**, 613–624. (doi:10.1016/S1534-5807(03)00128-X)
82. Kuo CT, Morrissy EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C, Leiden JM. 1997 GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* **11**, 1048–1060. (doi:10.1101/gad.11.8.1048)
83. Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. 1997 Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* **11**, 1061–1072. (doi:10.1101/gad.11.8.1061)
84. Soudais C, Bielinska M, Heikinheimo M, MacArthur CA, Narita N, Saffitz JE, Simon MC, Leiden JM, Wilson DB. 1995 Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation *in vitro*. *Development* **121**, 3877–3888.
85. Liu J, He X, Corbett SA, Lowry SF, Graham AM, Fassler R, Li S. 2009 Integrins are required for the differentiation of visceral endoderm. *J. Cell Sci.* **122**, 233–242. (doi:10.1242/jcs.037663)
86. Sonawane M, Martin-Maischein H, Schwarz H, Nusslein-Volhard C. 2009 Lgl2 and E-cadherin act antagonistically to regulate hemidesmosome formation during epidermal development in zebrafish. *Development* **136**, 1231–1240. (doi:10.1242/dev.032508)
87. Hirose T, Karasawa M, Sugitani Y, Fujisawa M, Akimoto K, Ohno S, Noda T. 2006 PAR3 is essential for cyst-mediated epicardial development by establishing apical cortical domains. *Development* **133**, 1389–1398. (doi:10.1242/dev.02294)



## Autres communications scientifiques

---

### Communications orales :

- *Novembre 2015 :*  
Workshop STEM BRYO à Sitges (*Espagne*)  
« **Differentiation of extraembryonic endoderm during mouse development** »



### Communications écrites :

- Posters :
  - 10 au 12 février 2014 : Congrès SFBD-EFOR à Paris  
« Cell plasticity and homeostasis » : **Role of Gata6 during cell lineage differentiation in the mouse blastocyst.**
  - 11 au 14 Mars 2015 : Congrès SFBD- GfE à Nuremberg : **Role of Gata6 during cell lineage differentiation in the mouse blastocyst : Is Gata6 directly phosphorylated by the RTK pathway ?**
  - Journées de l'Ecole Doctorale 2015 : **Role of Gata6 during cell lineage differentiation in the mouse blastocyst : Is Gata6 directly phosphorylated by the RTK pathway ?**
- Articles de vulgarisation :
  - Site Internet Auvergnesciences : « **Le devenir de l'endoderme extra embryonnaire au cours du développement embryonnaire murin : de l'embryon aux cellules souches pluripotentes.** »
  - Site Internet Auvergnesciences : « **L'embryon de souris : un modèle in vitro illustrant l'implication de certains marqueurs clés de l'embryogenèse dans l'évolution et le développement des cancers.** »





---

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

---



- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* *16*, 3797–3804.
- Abranches, E., Guedes, A.M.V., Moravec, M., Maamar, H., Svoboda, P., Raj, A., and Henrique, D. (2014). Stochastic NANOG fluctuations allow mouse embryonic stem cells to explore pluripotency. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 2770–2779.
- Adachi, Y., Shibai, Y., Mitsushita, J., Shang, W.H., Hirose, K., and Kamata, T. (2008). Oncogenic Ras upregulates NADPH oxidase 1 gene expression through MEK-ERK-dependent phosphorylation of GATA-6. *Oncogene* *27*, 4921–4932.
- Adler, P.N. (2012). The frizzled/stan Pathway and Planar Cell Polarity in the Drosophila Wing. *Curr. Top. Dev. Biol.* *101*, 1–31.
- Adler, P.N., Taylor, J., and Charlton, J. (2000). The domineering non-autonomy of frizzled and van Gogh clones in the Drosophila wing is a consequence of a disruption in local signaling. *Mech. Dev.* *96*, 197–207.
- Ahmad-Annur, A., Ciani, L., Simeonidis, I., Herreros, J., Fredj, N.B., Rosso, S.B., Hall, A., Brickley, S., and Salinas, P.C. (2006). Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. *J. Cell Biol.* *174*, 127–139.
- Ai, M., Holmen, S.L., Van Hul, W., Williams, B.O., and Warman, M.L. (2005). Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 4946–4955.
- Ajduk, A., Biswas Shivhare, S., and Zernicka-Goetz, M. (2014). The basal position of nuclei is one pre-requisite for asymmetric cell divisions in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* *392*, 133–140.
- Aksamitiene, E., Kholodenko, B.N., Kolch, W., Hoek, J.B., and Kiyatkin, A. (2010). PI3K/Akt-sensitive MEK-independent compensatory circuit of ERK activation in ER-positive PI3K-mutant T47D breast cancer cells. *Cell. Signal.* *22*, 1369–1378.
- Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., and Kholodenko, B.N. (2012). Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 139–146.
- Aksoy, I., Jauch, R., Chen, J., Dyla, M., Divakar, U., Bogu, G.K., Teo, R., Leng Ng, C.K., Herath, W., Lili, S., et al. (2013). Oct4 switches partnering from Sox2 to Sox17 to reinterpret the enhancer code and specify endoderm. *EMBO J.* *32*, 938–953.
- Al-Mutairi, M.S., Cadalbert, L.C., McGachy, H.A., Shweash, M., Schroeder, J., Kurnik, M., Sloss, C.M., Bryant, C.E., Alexander, J., and Plevin, R. (2010). MAP kinase phosphatase-2 plays a critical role in response to infection by *Leishmania mexicana*. *PLoS Pathog.* *6*, e1001192.
- Alonso, A., Breuer, B., Steuer, B., and Fischer, J. (1991). The F9-EC cell line as a model for the analysis of differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* *35*, 389–397.
- Amonlirdviman, K., Khare, N.A., Tree, D.R.P., Chen, W.-S., Axelrod, J.D., and Tomlin, C.J. (2005). Mathematical modeling of planar cell polarity to understand domineering nonautonomy. *Science* *307*, 423–426.

Anani, S., Bhat, S., Honma-Yamanaka, N., Krawchuk, D., and Yamanaka, Y. (2014). Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. *Development* *141*, 2813–2824.

Ang, S.-L., and Constam, D.B. (2004). A gene network establishing polarity in the early mouse embryo. *Semin. Cell Dev. Biol.* *15*, 555–561.

Anton, R., Kestler, H.A., and Kühl, M. (2007). Beta-catenin signaling contributes to stemness and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells. *FEBS Lett.* *581*, 5247–5254.

Aravind, L., and Koonin, E.V. (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 469–472.

Arceci, R.J., King, A.A., Simon, M.C., Orkin, S.H., and Wilson, D.B. (1993). Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 2235–2246.

Arese, M., Chen, Y., Florkiewicz, R.Z., Gualandris, A., Shen, B., and Rifkin, D.B. (1999). Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. *Mol. Biol. Cell* *10*, 1429–1444.

Aronson, B.E., Stapleton, K.A., and Krasinski, S.D. (2014). Role of GATA factors in development, differentiation, and homeostasis of the small intestinal epithelium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *306*, G474–490.

Artus, J., Panthier, J.-J., and Hadjantonakis, A.-K. (2010). A role for PDGF signaling in expansion of the extra-embryonic endoderm lineage of the mouse blastocyst. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 3361–3372.

Artus, J., Piliszek, A., and Hadjantonakis, A.-K. (2011). The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Dev. Biol.* *350*, 393–404.

Artus, J., Douvaras, P., Piliszek, A., Isern, J., Baron, M.H., and Hadjantonakis, A.-K. (2012). BMP4 signaling directs primitive endoderm-derived XEN cells to an extraembryonic visceral endoderm identity. *Dev. Biol.* *361*, 245–262.

Artus, J., Kang, M., Cohen-Tannoudji, M., and Hadjantonakis, A.-K. (2013). PDGF signaling is required for primitive endoderm cell survival in the inner cell mass of the mouse blastocyst. *Stem Cells Dayt. Ohio* *31*, 1932–1941.

Assémat, E., Vinot, S., Gofflot, F., Linsel-Nitschke, P., Illien, F., Châtelet, F., Verroust, P., Louvet-Vallée, S., Rinninger, F., and Kozyraki, R. (2005). Expression and role of cubilin in the internalization of nutrients during the peri-implantation development of the rodent embryo. *Biol. Reprod.* *72*, 1079–1086.

Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* *17*, 126–140.

Ayanbule, F., Belaguli, N.S., and Berger, D.H. (2011). GATA factors in gastrointestinal malignancy. *World J. Surg.* *35*, 1757–1765.

- Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T.C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T., and Adjaye, J. (2007). Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 500–510.
- Bae, J.H., and Schlessinger, J. (2010). Asymmetric tyrosine kinase arrangements in activation or autophosphorylation of receptor tyrosine kinases. *Mol. Cells* 29, 443–448.
- Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A., and Aaronson, S.A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* 3, 683–686.
- Bah, A., and Forman-Kay, J.D. (2016). Modulation of Intrinsically Disordered Protein Function by Post-translational Modifications. *J. Biol. Chem.* 291, 6696–6705.
- Balemans, W., Devogelaer, J.-P., Cleiren, E., Piters, E., Caussin, E., and Van Hul, W. (2007). Novel LRP5 missense mutation in a patient with a high bone mass phenotype results in decreased DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 22, 708–716.
- Bandyopadhyay, S., Chiang, C., Srivastava, J., Gersten, M., White, S., Bell, R., Kurschner, C., Martin, C.H., Smoot, M., Sahasrabudhe, S., et al. (2010). A human MAP kinase interactome. *Nat. Methods* 7, 801–805.
- del Barco Barrantes, I. (2003). Dkk1 and noggin cooperate in mammalian head induction. *Genes Dev.* 17, 2239–2244.
- Barcroft, L.C., Moseley, A.E., Lingrel, J.B., and Watson, A.J. (2004). Deletion of the Na/K-ATPase alpha1-subunit gene (*Atp1a1*) does not prevent cavitation of the preimplantation mouse embryo. *Mech. Dev.* 121, 417–426.
- Barrett, S.D., Bridges, A.J., Dudley, D.T., Saltiel, A.R., Fergus, J.H., Flamme, C.M., Delaney, A.M., Kaufman, M., LePage, S., Leopold, W.R., et al. (2008). The discovery of the benzhydroxamate MEK inhibitors CI-1040 and PD 0325901. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 6501–6504.
- Bates, D.L., Chen, Y., Kim, G., Guo, L., and Chen, L. (2008). Crystal structures of multiple GATA zinc fingers bound to DNA reveal new insights into DNA recognition and self-association by GATA. *J. Mol. Biol.* 381, 1292–1306.
- Behrendtsen, O., Alexander, C.M., and Werb, Z. (1995). Cooperative interactions between extracellular matrix, integrins and parathyroid hormone-related peptide regulate parietal endoderm differentiation in mouse embryos. *Dev. Camb. Engl.* 121, 4137–4148.
- Bekešová, S., Komis, G., Křenek, P., Vyplelová, P., Ovečka, M., Luptovčíak, I., Illés, P., Kuchařová, A., and Šamaj, J. (2015). Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-Tag™ in various plants. *Front. Plant Sci.* 6, 336.
- Bélanger, L.-F., Roy, S., Tremblay, M., Brott, B., Steff, A.-M., Mourad, W., Hugo, P., Erikson, R., and Charron, J. (2003). Mek2 Is Dispensable for Mouse Growth and Development. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4778–4787.
- Belo, J.A., Bachiller, D., Agius, E., Kemp, C., Borges, A.C., Marques, S., Piccolo, S., and De Robertis, E.M. (2000). Cerberus-like is a secreted BMP and nodal antagonist not essential for mouse development. *Genes. N. Y. N* 2000 26, 265–270.

ten Berge, D., Kurek, D., Blauwkamp, T., Koole, W., Maas, A., Eroglu, E., Siu, R.K., and Nusse, R. (2011). Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1070–1075.

Bernards, A., and Settleman, J. (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* *14*, 377–385.

Bessonard, S., Mot, L.D., Gonze, D., Barriol, M., Dennis, C., Goldbeter, A., Dupont, G., and Chazaud, C. (2014). Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. *Development* *141*, 3637–3648.

Beuling, E., Bosse, T., van de Kerk, D.J., Piaseckyj, C.M., Fujiwara, Y., Katz, S.G., Orkin, S.H., Grand, R.J., and Krasinski, S.D. (2008). GATA4 mediates gene repression in the mature mouse small intestine through interactions with Friend of GATA (FOG) cofactors. *Dev. Biol.* *322*, 179–189.

Beuling, E., Baffour-Awuah, N.Y.A., Stapleton, K.A., Aronson, B.E., Noah, T.K., Shroyer, N.F., Duncan, S.A., Fleet, J.C., and Krasinski, S.D. (2011). GATA factors regulate proliferation, differentiation, and gene expression in small intestine of mature mice. *Gastroenterology* *140*, 1219-1229.e1-2.

Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., and Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* *382*, 225–230.

Bibel, M., Richter, J., Schrenk, K., Tucker, K.L., Staiger, V., Korte, M., Goetz, M., and Barde, Y.-A. (2004). Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat. Neurosci.* *7*, 1003–1009.

Bielinska, M., and Wilson, D.B. (1997). Induction of yolk sac endoderm in GATA-4-deficient embryoid bodies by retinoic acid. *Mech. Dev.* *65*, 43–54.

Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* *411*, 355–365.

Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F.D., Baran, N., and Kedinger, C. (1997). Leukemia Inhibitory Factor–dependent Transcriptional Activation in Embryonic Stem Cells. *J. Cell Biol.* *138*, 1207–1217.

Boroviak, T., Loos, R., Lombard, P., Okahara, J., Behr, R., Sasaki, E., Nichols, J., Smith, A., and Bertone, P. (2015). Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Dev. Cell* *35*, 366–382.

Bourhis, E., Tam, C., Franke, Y., Bazan, J.F., Ernst, J., Hwang, J., Costa, M., Cochran, A.G., and Hannoush, R.N. (2010). Reconstitution of a frizzled8.Wnt3a.LRP6 signaling complex reveals multiple Wnt and Dkk1 binding sites on LRP6. *J. Biol. Chem.* *285*, 9172–9179.

Boutros, M., and Mlodzik, M. (1999). Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech. Dev.* *83*, 27–37.

Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y., and Ogryzko, V. (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* *396*, 594–598.

Brewer, A., Gove, C., Davies, A., McNulty, C., Barrow, D., Koutsourakis, M., Farzaneh, F., Pizzey, J., Bomford, A., and Patient, R. (1999). The human and mouse GATA-6 genes utilize two promoters and two initiation codons. *J. Biol. Chem.* *274*, 38004–38016.

- Brinster, R.L. (1974). The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J. Exp. Med.* *140*, 1049–1056.
- Brott, B.K., and Sokol, S.Y. (2002). Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 6100–6110.
- Brown, J.L., Snir, M., Noushmehr, H., Kirby, M., Hong, S.-K., Elkahlon, A.G., and Feldman, B. (2008). Transcriptional profiling of endogenous germ layer precursor cells identifies *dusp4* as an essential gene in zebrafish endoderm specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 12337–12342.
- Brown, K., Legros, S., Artus, J., Doss, M.X., Khanin, R., Hadjantonakis, A.-K., and Foley, A. (2010b). A comparative analysis of extra-embryonic endoderm cell lines. *PLoS One* *5*, e12016.
- Brown, K., Doss, M.X., Legros, S., Artus, J., Hadjantonakis, A.-K., and Foley, A.C. (2010a). eXtraembryonic ENdoderm (XEN) Stem Cells Produce Factors that Activate Heart Formation. *PLOS ONE* *5*, e13446.
- Brunet, L.J., McMahon, J.A., McMahon, A.P., and Harland, R.M. (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* *280*, 1455–1457.
- Buecker, C., Srinivasan, R., Wu, Z., Calo, E., Acampora, D., Faial, T., Simeone, A., Tan, M., Swigut, T., and Wysocka, J. (2014). Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to primed pluripotency. *Cell Stem Cell* *14*, 838–853.
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., and Smith, A. (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* *210*, 30–43.
- Burgar, H.R., Burns, H.D., Elsdon, J.L., Lalioti, M.D., and Heath, J.K. (2002). Association of the Signaling Adaptor FRS2 with Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (Fgfr1) Is Mediated by Alternative Splicing of the Juxtamembrane Domain. *J. Biol. Chem.* *277*, 4018–4023.
- Cai, K.Q., Capo-Chichi, C.D., Rula, M.E., Yang, D.-H., and Xu, X.-X. (2008). Dynamic GATA6 expression in primitive endoderm formation and maturation in early mouse embryogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *237*, 2820–2829.
- Caneparo, L., Huang, Y.-L., Staudt, N., Tada, M., Ahrendt, R., Kazanskaya, O., Niehrs, C., and Houart, C. (2007a). Dickkopf-1 regulates gastrulation movements by coordinated modulation of Wnt/beta catenin and Wnt/PCP activities, through interaction with the Dally-like homolog Knypek. *Genes Dev.* *21*, 465–480.
- Caneparo, L., Huang, Y.-L., Staudt, N., Tada, M., Ahrendt, R., Kazanskaya, O., Niehrs, C., and Houart, C. (2007b). Dickkopf-1 regulates gastrulation movements by coordinated modulation of Wnt/betacatenin and Wnt/PCP activities, through interaction with the Dally-like homolog Knypek. *Genes Dev.* *21*, 465–480.
- Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* *296*, 1655–1657.
- Capo-Chichi, C.D., Rula, M.E., Smedberg, J.L., Vanderveer, L., Parmacek, M.S., Morrissey, E.E., Godwin, A.K., and Xu, X.-X. (2005). Perception of differentiation cues by GATA factors in primitive endoderm lineage determination of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* *286*, 574–586.

- Capo-Chichi, C.D., Smedberg, J.L., Rula, M., Nicolas, E., Yeung, A.T., Adamo, R.F., Frolov, A., Godwin, A.K., and Xu, X.-X. (2010). Alteration of Differentiation Potentials by Modulating GATA Transcription Factors in Murine Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2010, 602068.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643–655.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450, 1230–1234.
- Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37–40.
- Charron, F., and Nemer, M. (1999). GATA transcription factors and cardiac development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 85–91.
- Charron, F., Tsimiklis, G., Arcand, M., Robitaille, L., Liang, Q., Molkenkin, J.D., Meloche, S., and Nemer, M. (2001). Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev.* 15, 2702–2719.
- Chazaud, C., and Rossant, J. (2006). Disruption of early proximodistal patterning and AVE formation in *Apc* mutants. *Development* 133, 3379–3387.
- Chazaud, C., and Yamanaka, Y. (2016). Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Dev. Camb. Engl.* 143, 1063–1074.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev. Cell* 10, 615–624.
- Chen, C.M., and Struhl, G. (1999). Wingless transduction by the Frizzled and Frizzled2 proteins of *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* 126, 5441–5452.
- Chen, D., Zhao, M., and Mundy, G.R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors Chur Switz.* 22, 233–241.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., et al. (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133, 1106–1117.
- Cheng, A.M., Saxton, T.M., Sakai, R., Kulkarni, S., Mbamalu, G., Vogel, W., Tortorice, C.G., Cardiff, R.D., Cross, J.C., Muller, W.J., et al. (1998). Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell* 95, 793–803.
- Cheng, H.-C., Qi, R.Z., Paudel, H., and Zhu, H.-J. (2011). Regulation and Function of Protein Kinases and Phosphatases. *Enzyme Res.* 2011.
- Cheung, M., Sharma, A., Madhunapantula, S.V., and Robertson, G.P. (2008). Akt3 and mutant V600E B-Raf cooperate to promote early melanoma development. *Cancer Res.* 68, 3429–3439.

- Chew, J.-L., Loh, Y.-H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W.-L., Yeap, L.-S., Li, P., Ang, Y.-S., Lim, B., Robson, P., et al. (2005). Reciprocal transcriptional regulation of *Pou5f1* and *Sox2* via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 6031–6046.
- Chitforoushzadeh, Z., Ye, Z., Sheng, Z., LaRue, S., Fry, R.C., Lauffenburger, D.A., and Janes, K.A. (2016). TNF-insulin crosstalk at the transcription factor GATA6 is revealed by a model that links signaling and transcriptomic data tensors. *Sci. Signal.* *9*, ra59.
- Chlon, T.M., and Crispino, J.D. (2012). Combinatorial regulation of tissue specification by GATA and FOG factors. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 3905–3916.
- Cho, L.T.Y., Wamaitha, S.E., Tsai, I.J., Artus, J., Sherwood, R.I., Pedersen, R.A., Hadjantonakis, A.-K., and Niakan, K.K. (2012). Conversion from mouse embryonic to extra-embryonic endoderm stem cells reveals distinct differentiation capacities of pluripotent stem cell states. *Development* *139*, 2866–2877.
- Choi, D., Lee, H.-J., Jee, S., Jin, S., Koo, S.K., Paik, S.S., Jung, S.C., Hwang, S.-Y., Lee, K.S., and Oh, B. (2005). In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells: enrichment of endodermal cells in the embryoid body. *Stem Cells Dayt. Ohio* *23*, 817–827.
- Chuykin, I., Lapidus, I., Popova, E., Vilianovich, L., Mosienko, V., Alenina, N., Binas, B., Chai, G., Bader, M., and Krivokharchenko, A. (2010). Characterization of trophoblast and extraembryonic endoderm cell lineages derived from rat preimplantation embryos. *PLoS One* *5*, e9794.
- Chuykin, I., Schulz, H., Guan, K., and Bader, M. (2013). Activation of the PTHRP/adenylate cyclase pathway promotes differentiation of rat XEN cells into parietal endoderm, whereas Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes differentiation into visceral endoderm. *J. Cell Sci.* *126*, 128–138.
- Ciruna, B., Jenny, A., Lee, D., Mlodzik, M., and Schier, A.F. (2006). Planar cell polarity signalling couples cell division and morphogenesis during neurulation. *Nature* *439*, 220–224.
- Clevers, H. (2006). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* *127*, 469–480.
- Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* *149*, 1192–1205.
- Cockburn, K., and Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J. Clin. Invest.* *120*, 995–1003.
- Cole, M.F., Johnstone, S.E., Newman, J.J., Kagey, M.H., and Young, R.A. (2008). Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev.* *22*, 746–755.
- Collavin, L., Gostissa, M., Avolio, F., Secco, P., Ronchi, A., Santoro, C., and Del Sal, G. (2004). Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8870–8875.
- Collu, G.M., and Mlodzik, M. (2015). Planar Polarity: Converting a Morphogen Gradient into Cellular Polarity. *Curr. Biol. CB* *25*, R372–R374.
- Coucouvanis, E., and Martin, G.R. (1999). BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 535–546.
- Coulombe, P., and Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1376–1387.

- Cruciat, C.-M., and Niehrs, C. (2013). Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Cuevas, E.P., Escribano, O., Chiloeches, A., Ramirez Rubio, S., Román, I.D., Fernández-Moreno, M.D., and Guijarro, L.G. (2007). Role of insulin receptor substrate-4 in IGF-I-stimulated HEPG2 proliferation. *J. Hepatol.* 46, 1089–1098.
- Dailey, L., Yuan, H., and Basilico, C. (1994). Interaction between a novel F9-specific factor and octamer-binding proteins is required for cell-type-restricted activity of the fibroblast growth factor 4 enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7758–7769.
- Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A., and Basilico, C. (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 233–247.
- Dann, C.E., Hsieh, J.C., Rattner, A., Sharma, D., Nathans, J., and Leahy, D.J. (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* 412, 86–90.
- Dard, N., Le, T., Maro, B., and Louvet-Vallée, S. (2009). Inactivation of aPKC $\lambda$  reveals a context dependent allocation of cell lineages in preimplantation mouse embryos. *PLoS One* 4, e7117.
- Davidson, G., Mao, B., del Barco Barrantes, I., and Niehrs, C. (2002). Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning. *Dev. Camb. Engl.* 129, 5587–5596.
- Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stanek, P., Glinka, A., and Niehrs, C. (2005). Casein kinase 1  $\gamma$  couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438, 867–872.
- De, A. (2011). Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 43, 745–756.
- De Mot, L., Gonze, D., Bessonard, S., Chazaud, C., Goldbeter, A., and Dupont, G. (2016). Cell Fate Specification Based on Tristability in the Inner Cell Mass of Mouse Blastocysts. *Biophys. J.* 110, 710–722.
- De Vries, W.N., Evsikov, A.V., Haac, B.E., Fancher, K.S., Holbrook, A.E., Kemler, R., Solter, D., and Knowles, B.B. (2004). Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development. *Dev. Camb. Engl.* 131, 4435–4445.
- Deane, J.A., and Fruman, D.A. (2004). Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 563–598.
- Debeb, B.G., Galat, V., Epple-Farmer, J., Iannaccone, S., Woodward, W.A., Bader, M., Iannaccone, P., and Binas, B. (2009). Isolation of Oct4-expressing extraembryonic endoderm precursor cell lines. *PLoS One* 4, e7216.
- Dhillon, A.S., and Kolch, W. (2002). Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 404, 3–9.
- Dietrich, J.-E., and Hiiragi, T. (2007). Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Dev. Camb. Engl.* 134, 4219–4231.

- 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.
- Doble, B.W., Patel, S., Wood, G.A., Kockeritz, L.K., and Woodgett, J.R. (2007). Functional redundancy of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev. Cell* 12, 957–971.
- Dorfman, K., Carrasco, D., Gruda, M., Ryan, C., Lira, S.A., and Bravo, R. (1996). Disruption of the *erp/mkp-1* gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. *Oncogene* 13, 925–931.
- Dulak, A.M., Schumacher, S., van Lieshout, J., Imamura, Y., Fox, C., Shim, B., Ramos, A., Saksena, G., Baca, S., Baselga, J., et al. (2012). Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer Res.* 72, 4383–4393.
- Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R.J., and Nemer, M. (1997). The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* 16, 5687–5696.
- Eckert, J.J., McCallum, A., Mears, A., Rumsby, M.G., Cameron, I.T., and Fleming, T.P. (2004). PKC signalling regulates tight junction membrane assembly in the pre-implantation mouse embryo. *Reprod. Camb. Engl.* 127, 653–667.
- Eisbacher, M., Holmes, M.L., Newton, A., Hogg, P.J., Khachigian, L.M., Crossley, M., and Chong, B.H. (2003). Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3427–3441.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7, 606–619.
- Etheridge, S.L., Ray, S., Li, S., Hamblet, N.S., Lijam, N., Tsang, M., Greer, J., Kardos, N., Wang, J., Sussman, D.J., et al. (2008). Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. *PLoS Genet.* 4, e1000259.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Faddah, D.A., Wang, H., Cheng, A.W., Katz, Y., Buganim, Y., and Jaenisch, R. (2013). Single-cell analysis reveals that expression of *nanog* is biallelic and equally variable as that of other pluripotency factors in mouse ESCs. *Cell Stem Cell* 13, 23–29.
- Fang, X., Stachowiak, E.K., Dunham-Ems, S.M., Klejbor, I., and Stachowiak, M.K. (2005). Control of CREB-binding protein signaling by nuclear fibroblast growth factor receptor-1: a novel mechanism of gene regulation. *J. Biol. Chem.* 280, 28451–28462.
- Fanto, M., and McNeill, H. (2004). Planar polarity from flies to vertebrates. *J. Cell Sci.* 117, 527–533.
- Faunes, F., Hayward, P., Descalzo, S.M., Chatterjee, S.S., Balayo, T., Trott, J., Christoforou, A., Ferrer-Vaquer, A., Hadjantonakis, A.-K., Dasgupta, R., et al. (2013). A membrane-associated  $\beta$ -catenin/Oct4 complex correlates with ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Dev. Camb. Engl.* 140, 1171–1183.

- Fedi, P., Bafico, A., Nieto Soria, A., Burgess, W.H., Miki, T., Bottaro, D.P., Kraus, M.H., and Aaronson, S.A. (1999). Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 19465–19472.
- Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V.E., DeChiara, T.M., and Goldfarb, M. (1995). Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* 267, 246–249.
- Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., and Philipsen, S. (2005). GATA1 Function, a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1215–1227.
- Ferreira, R., Wai, A., Shimizu, R., Gillemans, N., Rottier, R., von Lindern, M., Ohneda, K., Grosveld, F., Yamamoto, M., and Philipsen, S. (2007). Dynamic regulation of Gata factor levels is more important than their identity. *Blood* 109, 5481–5490.
- Ferrer-Vaquer, A., Piliszek, A., Tian, G., Aho, R.J., Dufort, D., and Hadjantonakis, A.-K. (2010). A sensitive and bright single-cell resolution live imaging reporter of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the mouse. *BMC Dev. Biol.* 10, 121.
- Fidalgo, M., Faiola, F., Pereira, C.-F., Ding, J., Saunders, A., Gingold, J., Schaniel, C., Lemischka, I.R., Silva, J.C.R., and Wang, J. (2012). Zfp281 mediates Nanog autorepression through recruitment of the NuRD complex and inhibits somatic cell reprogramming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 16202–16207.
- Filipczyk, A., Gkatzis, K., Fu, J., Hoppe, P.S., Lickert, H., Anastassiadis, K., and Schroeder, T. (2013). Biallelic expression of nanog protein in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 13, 12–13.
- Fleming, T.P., Sheth, B., and Fesenko, I. (2001). Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 6, D1000-1007.
- Fox, A.H., Kowalski, K., King, G.F., Mackay, J.P., and Crossley, M. (1998). Key residues characteristic of GATA N-fingers are recognized by FOG. *J. Biol. Chem.* 273, 33595–33603.
- Frankenberg, S., Gerbe, F., Bessonard, S., Belville, C., Pouchin, P., Bardot, O., and Chazaud, C. (2011a). Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and RTK Signaling. *Dev. Cell* 21, 1005–1013.
- Frankenberg, S., Gerbe, F., Bessonard, S., Belville, C., Pouchin, P., Bardot, O., and Chazaud, C. (2011b). Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and RTK Signaling. *Dev. Cell* 21, 1005–1013.
- Freyer, L., Schröter, C., Saiz, N., Schrode, N., Nowotschin, S., Martinez-Arias, A., and Hadjantonakis, A.-K. (2015). A loss-of-function and H2B-Venus transcriptional reporter allele for Gata6 in mice. *BMC Dev. Biol.* 15, 38.
- Frum, T., Halbisen, M.A., Wang, C., Amiri, H., Robson, P., and Ralston, A. (2013). Oct4 Cell-Autonomously Promotes Primitive Endoderm Development in the Mouse Blastocyst. *Dev. Cell* 25, 610–622.
- Fu, B., Luo, M., Lakkur, S., Lucito, R., and Iacobuzio-Donahue, C.A. (2008). Frequent genomic copy number gain and overexpression of GATA-6 in pancreatic carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* 7, 1593–1601.

- Fujikura, J. (2002). Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev.* *16*, 784–789.
- Furdui, C.M., Lew, E.D., Schlessinger, J., and Anderson, K.S. (2006). Autophosphorylation of FGFR1 kinase is mediated by a sequential and precisely ordered reaction. *Mol. Cell* *21*, 711–717.
- Fürthauer, M., Reifers, F., Brand, M., Thisse, B., and Thisse, C. (2001). *sprouty4* acts in vivo as a feedback-induced antagonist of FGF signaling in zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 2175–2186.
- Furusawa, J., Moro, K., Motomura, Y., Okamoto, K., Zhu, J., Takayanagi, H., Kubo, M., and Koyasu, S. (2013). Critical role of p38 and GATA3 in natural helper cell function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 1818–1826.
- Galat, V., Binas, B., Iannaccone, S., Postovit, L.-M., Debeb, B.G., and Iannaccone, P. (2009). Developmental potential of rat extraembryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* *18*, 1309–1318.
- Gallagher, H., Oleinikov, A.V., Fenske, C., and Newman, D.J. (2004). The adaptor disabled-2 binds to the third psi xNPxY sequence on the cytoplasmic tail of megalin. *Biochimie* *86*, 179–182.
- Gao, Z., Cox, J.L., Gilmore, J.M., Ormsbee, B.D., Mallanna, S.K., Washburn, M.P., and Rizzino, A. (2012). Determination of protein interactome of transcription factor Sox2 in embryonic stem cells engineered for inducible expression of four reprogramming factors. *J. Biol. Chem.* *287*, 11384–11397.
- Gerbe, F., Cox, B., Rossant, J., and Chazaud, C. (2008). Dynamic expression of Lrp2 pathway members reveals progressive epithelial differentiation of primitive endoderm in mouse blastocyst. *Dev. Biol.* *313*, 594–602.
- Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J.F., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., Jeannotte, L., et al. (1999). Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr. Biol. CB* *9*, 369–372.
- 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.
- Goldin, S.N., and Papaioannou, V.E. (2003). Paracrine action of FGF4 during periimplantation development maintains trophoblast and primitive endoderm. *Genes. N. Y. N* *2000* *36*, 40–47.
- Gong, Y., Mo, C., and Fraser, S.E. (2004). Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature* *430*, 689–693.
- Goodrich, L.V., and Strutt, D. (2011). Principles of planar polarity in animal development. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 1877–1892.
- Gordon, M.D., and Nusse, R. (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* *281*, 22429–22433.
- Grabarek, J.B., Zzyńska, K., Saiz, N., Piliszek, A., Frankenberg, S., Nichols, J., Hadjantonakis, A.-K., and Plusa, B. (2012). Differential plasticity of epiblast and primitive endoderm precursors within the ICM of the early mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 129–139.
- Graham, S.J.L., Wicher, K.B., Jedrusik, A., Guo, G., Herath, W., Robson, P., and Zernicka-Goetz, M. (2014). BMP signalling regulates the pre-implantation development of extra-embryonic cell lineages in the mouse embryo. *Nat. Commun.* *5*, 5667.

Granier, C., Gurchenkov, V., Perea-Gomez, A., Camus, A., Ott, S., Papanayotou, C., Iranzo, J., Moreau, A., Reid, J., Koentges, G., et al. (2011). Nodal cis-regulatory elements reveal epiblast and primitive endoderm heterogeneity in the peri-implantation mouse embryo. *Dev. Biol.* *349*, 350–362.

Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W., and Choe, S. (2003). The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol. Cell* *11*, 605–617.

Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W.W., Izpisua Belmonte, J.C., and Choe, S. (2002). Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* *420*, 636–642.

Grover, A., and Adamson, E.D. (1986a). Conditions Affecting the Differentiation of F9 Teratocarcinoma Cells: Potentiation of Response by Cyclic AMP. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* *22*, 280–284.

Grover, A., and Adamson, E.D. (1986b). Evidence for the existence of an early common biochemical pathway in the differentiation of F9 cells into visceral or parietal endoderm: modulation by cyclic AMP. *Dev. Biol.* *114*, 492–503.

Grover, A., Oshima, R.G., and Adamson, E.D. (1983). Epithelial layer formation in differentiating aggregates of F9 embryonal carcinoma cells. *J. Cell Biol.* *96*, 1690–1696.

Guan, K.L., Figueroa, C., Brtva, T.R., Zhu, T., Taylor, J., Barber, T.D., and Vojtek, A.B. (2000). Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J. Biol. Chem.* *275*, 27354–27359.

Guder, C., Pinho, S., Nacak, T.G., Schmidt, H.A., Hobmayer, B., Niehrs, C., and Holstein, T.W. (2006). An ancient Wnt-Dickkopf antagonism in Hydra. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 901–911.

Guharoy, M., Bhowmick, P., and Tompa, P. (2016). Design Principles Involving Protein Disorder Facilitate Specific Substrate Selection and Degradation by the Ubiquitin-Proteasome System. *J. Biol. Chem.* *291*, 6723–6731.

Guo, G., Huss, M., Tong, G.Q., Wang, C., Li Sun, L., Clarke, N.D., and Robson, P. (2010). Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev. Cell* *18*, 675–685.

Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., and Kemler, R. (1995). Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Dev. Camb. Engl.* *121*, 3529–3537.

Hamblet, N.S., Lijam, N., Ruiz-Lozano, P., Wang, J., Yang, Y., Luo, Z., Mei, L., Chien, K.R., Sussman, D.J., and Wynshaw-Boris, A. (2002). Dishevelled 2 is essential for cardiac outflow tract development, somite segmentation and neural tube closure. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 5827–5838.

Harwood, B.N., Cross, S.K., Radford, E.E., Haac, B.E., and De Vries, W.N. (2008). Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes, and cleavage stage embryos. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *237*, 1099–1111.

Haveri, H., Westerholm-Ormio, M., Lindfors, K., Mäki, M., Savilahti, E., Andersson, L.C., and Heikinheimo, M. (2008). Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa. *BMC Gastroenterol.* *8*, 9.

He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* *281*, 1509–1512.

- He, X., Semenov, M., Tamai, K., and Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 1663–1677.
- Healy, A.M., Rayburn, H.B., Rosenberg, R.D., and Weiler, H. (1995). Absence of the blood-clotting regulator thrombomodulin causes embryonic lethality in mice before development of a functional cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 850–854.
- Heldin, C.H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* *80*, 213–223.
- Hermitte, S., and Chazaud, C. (2014). Primitive endoderm differentiation: from specification to epithelium formation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *369*.
- Hernandez-Hernandez, A., Ray, P., Litos, G., Ciro, M., Ottolenghi, S., Beug, H., and Boyes, J. (2006). Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *EMBO J.* *25*, 3264–3274.
- Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K.-I., Suzuki, A., Alarcon, V.B., Akimoto, K., Hirai, T., Hara, T., Adachi, M., Chida, K., et al. (2013). Polarity-dependent distribution of angiomin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr. Biol. CB* *23*, 1181–1194.
- Hoeflich, K.P., O'Brien, C., Boyd, Z., Cavet, G., Guerrero, S., Jung, K., Januario, T., Savage, H., Punnoose, E., Truong, T., et al. (2009). In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 4649–4664.
- Hogan, B.L., and Tilly, R. (1981). Cell interactions and endoderm differentiation in cultured mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *62*, 379–394.
- Home, P., Ray, S., Dutta, D., Bronshteyn, I., Larson, M., and Paul, S. (2009). GATA3 Is Selectively Expressed in the Trophectoderm of Peri-implantation Embryo and Directly Regulates Cdx2 Gene Expression. *J. Biol. Chem.* *284*, 28729–28737.
- Huang, C.-L., Cheng, J.-C., Stern, A., Hsieh, J.-T., Liao, C.-H., and Tseng, C.-P. (2006). Disabled-2 is a novel alphaIIb-integrin-binding protein that negatively regulates platelet-fibrinogen interactions and platelet aggregation. *J. Cell Sci.* *119*, 4420–4430.
- Hubbard, S.R. (2002). Autoinhibitory mechanisms in receptor tyrosine kinases. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *7*, d330-340.
- Hubbard, S.R., and Till, J.H. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* *69*, 373–398.
- Hubbard, S.R., Mohammadi, M., and Schlessinger, J. (1998). Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* *273*, 11987–11990.
- Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2000). Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J. Cell Biol.* *148*, 567–578.
- Hung, H.L., Lau, J., Kim, A.Y., Weiss, M.J., and Blobel, G.A. (1999). CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3496–3505.

- Ikeya, M., Lee, S.M., Johnson, J.E., McMahon, A.P., and Takada, S. (1997). Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* 389, 966–970.
- James, D., Levine, A.J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Dev. Camb. Engl.* 132, 1273–1282.
- Jaye, M., Schlessinger, J., and Dionne, C.A. (1992). Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1135, 185–199.
- Jedrusik, A., Parfitt, D.-E., Guo, G., Skamagki, M., Grabarek, J.B., Johnson, M.H., Robson, P., and Zernicka-Goetz, M. (2008). Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes Dev.* 22, 2692–2706.
- Jedrusik, A., Bruce, A.W., Tan, M.H., Leong, D.E., Skamagki, M., Yao, M., and Zernicka-Goetz, M. (2010). Maternally and zygotically provided Cdx2 have novel and critical roles for early development of the mouse embryo. *Dev. Biol.* 344, 66–78.
- Jedrusik, A., Cox, A., Wicher, K.B., Glover, D.M., and Zernicka-Goetz, M. (2015). Maternal-zygotic knockout reveals a critical role of Cdx2 in the morula to blastocyst transition. *Dev. Biol.* 398, 147–152.
- Jessen, J.R., Topczewski, J., Bingham, S., Sepich, D.S., Marlow, F., Chandrasekhar, A., and Solnica-Krezel, L. (2002). Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements. *Nat. Cell Biol.* 4, 610–615.
- Jimenez, C., Hernandez, C., Pimentel, B., and Carrera, A.C. (2002). The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *J. Biol. Chem.* 277, 41556–41562.
- Jin, Y.-R., and Yoon, J.K. (2012). The R-spondin family of proteins: emerging regulators of WNT signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 2278–2287.
- Johnson, D.E., and Williams, L.T. (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* 60, 1–41.
- Johnson, M.H., and McConnell, J.M.L. (2004). Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 583–597.
- Johnson, M.H., and Ziomek, C.A. (1981). The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24, 71–80.
- Johnson, D.E., Lu, J., Chen, H., Werner, S., and Williams, L.T. (1991). The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4627–4634.
- Julian, L.M., McDonald, A.C., and Stanford, W.L. (2017). Direct reprogramming with SOX factors: masters of cell fate. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 46, 24–36.
- Junttila, M.R., Li, S.-P., and Westermarck, J. (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 954–965.

- Kalmar, T., Lim, C., Hayward, P., Muñoz-Descalzo, S., Nichols, J., Garcia-Ojalvo, J., and Martinez Arias, A. (2009). Regulated fluctuations in nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. *PLoS Biol.* 7, e1000149.
- Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J.M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., Sanai, Y., Yonekawa, H., Yazaki, K., Tam, P.P.L., et al. (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Dev. Camb. Engl.* 129, 2367–2379.
- Kaneko, K.J., and DePamphilis, M.L. (2000). Soggy, a spermatocyte-specific gene, lies 3.8 kb upstream of and antipodal to TEAD-2, a transcription factor expressed at the beginning of mouse development. *Nucleic Acids Res.* 28, 3982–3990.
- Kang, M., Piliszek, A., Artus, J., and Hadjantonakis, A.-K. (2013). FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* 140, 267–279.
- Kang, M., Garg, V., and Hadjantonakis, A.-K. (2017). Lineage Establishment and Progression within the Inner Cell Mass of the Mouse Blastocyst Requires FGFR1 and FGFR2. *Dev. Cell* 41, 496–510.e5.
- Keller, R. (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* 298, 1950–1954.
- Kelly, J.C., Lungchukiet, P., and Macleod, R.J. (2011). Extracellular Calcium-Sensing Receptor Inhibition of Intestinal Epithelial TNF Signaling Requires CaSR-Mediated Wnt5a/Ror2 Interaction. *Front. Physiol.* 2, 17.
- Kemler, R. (2004). Stabilization of  $\beta$ -catenin in the mouse zygote leads to premature epithelial-mesenchymal transition in the epiblast. *Development* 131, 5817–5824.
- Kemp, C., Willems, E., Abdo, S., Lambiv, L., and Leyns, L. (2005). Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 233, 1064–1075.
- Kemp, C.R., Willems, E., Wawrzak, D., Hendrickx, M., Agbor Agbor, T., and Leyns, L. (2007). Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical Wnt signaling. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236, 2011–2019.
- Kieffer, E., Kuntz, S., and Viville, S. (2010). [An overview of pluripotent stem cell lines]. *Med. Sci. MS* 26, 848–854.
- Kikuchi, A. (1999). Modulation of Wnt signaling by Axin and Axil. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10, 255–265.
- Kikuchi, A. (2011). *International Review of Cell and Molecular Biology* - Google Livres.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Ujihara, H., and Koike, T. (2009). Mobility shift detection of phosphorylation on large proteins using a Phos-tag SDS-PAGE gel strengthened with agarose. *Proteomics* 9, 4098–4101.
- Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., and Koike, T. (2009). Phos-tag beads as an immunoblotting enhancer for selective detection of phosphoproteins in cell lysates. *Anal. Biochem.* 389, 83–85.

- Kioussi, C., Briata, P., Baek, S.H., Rose, D.W., Hamblet, N.S., Herman, T., Ohgi, K.A., Lin, C., Gleiberman, A., Wang, J., et al. (2002). Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* *111*, 673–685.
- Kiyatkin, A., Aksamitiene, E., Markevich, N.I., Borisov, N.M., Hoek, J.B., and Kholodenko, B.N. (2006). Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops. *J. Biol. Chem.* *281*, 19925–19938.
- Klagsbrun, M. (1990). The affinity of fibroblast growth factors (FGFs) for heparin; FGF-heparan sulfate interactions in cells and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* *2*, 857–863.
- Ko, L.J., and Engel, J.D. (1993). DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 4011–4022.
- Kobashigawa, Y., Amano, S., Yokogawa, M., Kumeta, H., Morioka, H., Inouye, M., Schlessinger, J., and Inagaki, F. (2015). Structural analysis of the mechanism of phosphorylation of a critical autoregulatory tyrosine residue in FGFR1 kinase domain. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *20*, 860–870.
- Kodaki, T., Woscholski, R., Hallberg, B., Rodriguez-Viciana, P., Downward, J., and Parker, P.J. (1994). The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr. Biol. CB* *4*, 798–806.
- Kodo, K., Nishizawa, T., Furutani, M., Arai, S., Yamamura, E., Joo, K., Takahashi, T., Matsuoka, R., and Yamagishi, H. (2009). GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 13933–13938.
- Koga, S., Yamaguchi, N., Abe, T., Minegishi, M., Tsuchiya, S., Yamamoto, M., and Minegishi, N. (2007). Cell-cycle-dependent oscillation of GATA2 expression in hematopoietic cells. *Blood* *109*, 4200–4208.
- Kohn, M.J., Kaneko, K.J., and DePamphilis, M.L. (2005). DkkL1 (Soggy), a Dickkopf family member, localizes to the acrosome during mammalian spermatogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* *71*, 516–522.
- Korol, O., Gupta, R.W., and Mercola, M. (2008). A novel activity of the Dickkopf-1 amino terminal domain promotes axial and heart development independently of canonical Wnt inhibition. *Dev. Biol.* *324*, 131–138.
- Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R., and Grosveld, F. (1999). The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 723–732.
- Krawchuk, D., Honma-Yamanaka, N., Anani, S., and Yamanaka, Y. (2013). FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* *384*, 65–71.
- Kruithof-de Julio, M., Alvarez, M.J., Galli, A., Chu, J., Price, S.M., Califano, A., and Shen, M.M. (2011). Regulation of extra-embryonic endoderm stem cell differentiation by Nodal and Cripto signaling. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 3885–3895.
- Krupa, M., Mazur, E., Szczepańska, K., Filimonow, K., Maleszewski, M., and Suwińska, A. (2014). Allocation of inner cells to epiblast vs primitive endoderm in the mouse embryo is biased but not determined by the round of asymmetric divisions (8→16- and 16→32-cells). *Dev. Biol.* *385*, 136–148.

- Krupnik, V.E., Sharp, J.D., Jiang, C., Robison, K., Chickering, T.W., Amaravadi, L., Brown, D.E., Guyot, D., Mays, G., Leiby, K., et al. (1999). Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238, 301–313.
- Kubo, A., Shinozaki, K., Shannon, J.M., Kouskoff, V., Kennedy, M., Woo, S., Fehling, H.J., and Keller, G. (2004). Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Dev. Camb. Engl.* 131, 1651–1662.
- Kunath, T., Arnaud, D., Uy, G.D., Okamoto, I., Chureau, C., Yamanaka, Y., Heard, E., Gardner, R.L., Avner, P., and Rossant, J. (2005). Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Dev. Camb. Engl.* 132, 1649–1661.
- Kunath, T., Saba-El-Leil, M.K., Almousailleakh, M., Wray, J., Meloche, S., and Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Dev. Camb. Engl.* 134, 2895–2902.
- Kurimoto, K. (2006). An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res.* 34, e42–e42.
- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005). Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2475–2485.
- Kwei, K.A., Bashyam, M.D., Kao, J., Ratheesh, R., Reddy, E.C., Kim, Y.H., Montgomery, K., Giacomini, C.P., Choi, Y.-L., Chatterjee, S., et al. (2008). Genomic Profiling Identifies GATA6 as a Candidate Oncogene Amplified in Pancreatobiliary Cancer. *PLoS Genet.* 4.
- La Rosa, I., Camargo, L.S.A., Pereira, M.M., Fernandez-Martin, R., Paz, D.A., and Salamone, D.F. (2011). Effects of bone morphogenic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, Noggin, on in vitro maturation and culture of bovine preimplantation embryos. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 9, 18.
- Lamonica, J.M., Vakoc, C.R., and Blobel, G.A. (2006). Acetylation of GATA-1 is required for chromatin occupancy. *Blood* 108, 3736–3738.
- LaMonica, K., Bass, M., and Grabel, L. (2009). The planar cell polarity pathway directs parietal endoderm migration. *Dev. Biol.* 330, 44–53.
- Lanner, F., and Rossant, J. (2010). The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Dev. Camb. Engl.* 137, 3351–3360.
- Laverriere, A.C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R.E., Burch, J.B., and Evans, T. (1994). GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* 269, 23177–23184.
- Lavial, F., Bessonard, S., Ohnishi, Y., Tsumura, A., Chandrashekrana, A., Fenwick, M.A., Tomaz, R.A., Hosokawa, H., Nakayama, T., Chambers, I., et al. (2012). Bmi1 facilitates primitive endoderm formation by stabilizing Gata6 during early mouse development. *Genes Dev.* 26, 1445–1458.
- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A.J., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V.E., Korving, J.P.W.F.M., and Hogan, B.L.M. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 13, 424–436.

Le Bin, G.C., Muñoz-Descalzo, S., Kurowski, A., Leitch, H., Lou, X., Mansfield, W., Etienne-Dumeau, C., Grabole, N., Mulas, C., Niwa, H., et al. (2014). Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 1001–1010.

Lee, A.Y., He, B., You, L., Xu, Z., Mazieres, J., Reguart, N., Mikami, I., Batra, S., and Jablons, D.M. (2004). Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of beta-catenin in human mesothelioma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *323*, 1246–1250.

Lee, J.-Y., Park, S., Kim, K.-S., Ko, J.-J., Lee, S., Kim, K.P., and Park, K.-S. (2016). Novel Function of Sprouty4 as a Regulator of Stemness and Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Dev. Reprod.* *20*, 171–177.

Lee, S., Wottrich, S., and Bonavida, B. (2017). Crosstalks between Raf-kinase inhibitor protein and cancer stem cell transcription factors (Oct4, KLF4, Sox2, Nanog). *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *39*, 1010428317692253.

Lehr, S., Kotzka, J., Avci, H., Sickmann, A., Meyer, H.E., Herkner, A., and Muller-Wieland, D. (2004). Identification of major ERK-related phosphorylation sites in Gab1. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 12133–12140.

Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* *141*, 1117–1134.

Liang, Q., De Windt, L.J., Witt, S.A., Kimball, T.R., Markham, B.E., and Molkenin, J.D. (2001). The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* *276*, 30245–30253.

Lijam, N., Paylor, R., McDonald, M.P., Crawley, J.N., Deng, C.X., Herrup, K., Stevens, K.E., Maccaferri, G., McBain, C.J., Sussman, D.J., et al. (1997). Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking Dvl1. *Cell* *90*, 895–905.

Lim, C.Y., Tam, W.-L., Zhang, J., Ang, H.S., Jia, H., Lipovich, L., Ng, H.-H., Wei, C.-L., Sung, W.K., Robson, P., et al. (2008). Sall4 regulates distinct transcription circuitries in different blastocyst-derived stem cell lineages. *Cell Stem Cell* *3*, 543–554.

Lin, S.-C.J., Wani, M.A., Whitsett, J.A., and Wells, J.M. (2010). Klf5 regulates lineage formation in the pre-implantation mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 3953–3963.

Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 781–810.

Loh, K.M., and Lim, B. (2015). Stem cells: Equilibrium established. *Nature* *521*, 299–300.

Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., et al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* *38*, 431–440.

Lou, J., Tu, Y., Li, S., and Manske, P.R. (2000). Involvement of ERK in BMP-2 induced osteoblastic differentiation of mesenchymal progenitor cell line C3H10T1/2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *268*, 757–762.

Lowry, J.A., and Atchley, W.R. (2000). Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J. Mol. Evol.* *50*, 103–115.

- Lyashenko, N., Winter, M., Migliorini, D., Biechele, T., Moon, R.T., and Hartmann, C. (2011). Differential requirement for the dual functions of  $\beta$ -catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 753–761.
- MacArthur, B.D., Sevilla, A., Lenz, M., Müller, F.-J., Schuldt, B.M., Schuppert, A.A., Ridden, S.J., Stumpf, P.S., Fidalgo, M., Ma'ayan, A., et al. (2012). Nanog-dependent feedback loops regulate murine embryonic stem cell heterogeneity. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1139–1147.
- Maître, J.-L., Niwayama, R., Turlier, H., Nédélec, F., and Hiiragi, T. (2015). Pulsatile cell-autonomous contractility drives compaction in the mouse embryo. *Nat. Cell Biol.* *17*, 849–855.
- Maître, J.-L., Turlier, H., Illukkumbura, R., Eismann, B., Niwayama, R., Nédélec, F., and Hiiragi, T. (2016). Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature* *536*, 344–348.
- Maneechotesuwan, K., Xin, Y., Ito, K., Jazrawi, E., Lee, K.-Y., Usmani, O.S., Barnes, P.J., and Adcock, I.M. (2007). Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 2491–2498.
- Mansukhani, A., Ambrosetti, D., Holmes, G., Cornivelli, L., and Basilico, C. (2005). Sox2 induction by FGF and FGFR2 activating mutations inhibits Wnt signaling and osteoblast differentiation. *J. Cell Biol.* *168*, 1065–1076.
- Mao, B., and Niehrs, C. (2003). Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* *302*, 179–183.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stanek, P., Walter, C., et al. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* *417*, 664–667.
- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., et al. (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell* *7*, 801–809.
- Martello, G., and Smith, A. (2014). The nature of embryonic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *30*, 647–675.
- Martin, G.R. (1980). Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* *209*, 768–776.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 7634–7638.
- Martín, D., Piulachs, M.-D., and Raikhel, A.S. (2001). A Novel GATA Factor Transcriptionally Represses Yolk Protein Precursor Genes in the Mosquito *Aedes aegypti* via Interaction with the CtBP Corepressor. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 164–174.
- Masuda, S., Namba, K., Mutai, H., Usui, S., Miyanaga, Y., Kaneko, H., and Matsunaga, T. (2014). A mutation in the heparin-binding site of noggin as a novel mechanism of proximal symphalangism and conductive hearing loss. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *447*, 496–502.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., et al. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 625–635.

- Mathura, J.R., Jafari, N., Chang, J.T., Hackett, S.F., Wahlin, K.J., Della, N.G., Okamoto, N., Zack, D.J., and Campochiaro, P.A. (2000). Bone morphogenetic proteins-2 and -4: negative growth regulators in adult retinal pigmented epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 592–600.
- Matsuo, I., and Kimura-Yoshida, C. (2013). Extracellular modulation of Fibroblast Growth Factor signaling through heparan sulfate proteoglycans in mammalian development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *23*, 399–407.
- McCrea, P.D., Turck, C.W., and Gumbiner, B. (1991). A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* *254*, 1359–1361.
- McDonald, A.C.H., Biechele, S., Rossant, J., and Stanford, W.L. (2014). Sox17-mediated XEN cell conversion identifies dynamic networks controlling cell-fate decisions in embryo-derived stem cells. *Cell Rep.* *9*, 780–793.
- McMahon, J.A., Takada, S., Zimmerman, L.B., Fan, C.M., Harland, R.M., and McMahon, A.P. (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev.* *12*, 1438–1452.
- McNeill, H. (2009). Planar cell polarity and the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *20*, 2104–2111.
- McNeill, H. (2010). Planar Cell Polarity: Keeping Hairs Straight Is Not So Simple. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*.
- Meilhac, S.M., Adams, R.J., Morris, S.A., Danckaert, A., Le Garrec, J.-F., and Zernicka-Goetz, M. (2009). Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* *331*, 210–221.
- Mendoza, M.C., Er, E.E., and Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 320–328.
- Menghini, R., Marchetti, V., Cardellini, M., Hribal, M.L., Mauriello, A., Lauro, D., Sbraccia, P., Lauro, R., and Federici, M. (2005). Phosphorylation of GATA2 by Akt increases adipose tissue differentiation and reduces adipose tissue-related inflammation: a novel pathway linking obesity to atherosclerosis. *Circulation* *111*, 1946–1953.
- Merika, M., and Orkin, S.H. (1993). DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 3999–4010.
- Mesnard, D., Guzman-Ayala, M., and Constam, D.B. (2006). Nodal specifies embryonic visceral endoderm and sustains pluripotent cells in the epiblast before overt axial patterning. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 2497–2505.
- Messer, A.E., Gallon, C.E., McKenna, W.J., Dos Remedios, C.G., and Marston, S.B. (2009). The use of phosphate-affinity SDS-PAGE to measure the cardiac troponin I phosphorylation site distribution in human heart muscle. *Proteomics Clin. Appl.* *3*, 1371–1382.
- Messerschmidt, D.M., and Kemler, R. (2010). Nanog is required for primitive endoderm formation through a non-cell autonomous mechanism. *Dev. Biol.* *344*, 129–137.
- Minowada, G., Jarvis, L.A., Chi, C.L., Neubüser, A., Sun, X., Hacohen, N., Krasnow, M.A., and Martin, G.R. (1999). Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 4465–4475.

- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* *113*, 631–642.
- Miyanari, Y., and Torres-Padilla, M.-E. (2012). Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog. *Nature* *483*, 470–473.
- Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2017). Regulation of TGF- $\beta$  Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *9*.
- Mlodzik, M. (2016). The Dishevelled Protein Family: Still Rather a Mystery After Over 20 Years of Molecular Studies. *Curr. Top. Dev. Biol.* *117*, 75–91.
- Mohammed, M.K., Shao, C., Wang, J., Wei, Q., Wang, X., Collier, Z., Tang, S., Liu, H., Zhang, F., Huang, J., et al. (2016). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance. *Genes Dis.* *3*, 11–40.
- Molkentin, J.D. (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* *275*, 38949–38952.
- Molotkov, A., Mazot, P., Brewer, J.R., Cinalli, R.M., and Soriano, P. (2017). Distinct Requirements for FGFR1 and FGFR2 in Primitive Endoderm Development and Exit from Pluripotency. *Dev. Cell* *41*, 511–526.e4.
- Monaghan, A.P., Kioschis, P., Wu, W., Zuniga, A., Bock, D., Poustka, A., Delius, H., and Niehrs, C. (1999). Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mech. Dev.* *87*, 45–56.
- Moore, R., Cai, K.Q., Escudero, D.O., and Xu, X.-X. (2009). Cell adhesive affinity does not dictate primitive endoderm segregation and positioning during murine embryoid body formation. *Genes. N. Y. N* *2000* *47*, 579–589.
- Morin, S., Charron, F., Robitaille, L., and Nemer, M. (2000). GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J.* *19*, 2046–2055.
- Morris, S.A., Teo, R.T.Y., Li, H., Robson, P., Glover, D.M., and Zernicka-Goetz, M. (2010). Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 6364–6369.
- Morris, S.A., Graham, S.J.L., Jedrusik, A., and Zernicka-Goetz, M. (2013). The differential response to Fgf signalling in cells internalized at different times influences lineage segregation in preimplantation mouse embryos. *Open Biol.* *3*, 130104.
- Morrisey, E.E., Ip, H.S., Lu, M.M., and Parmacek, M.S. (1996). GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev. Biol.* *177*, 309–322.
- Morrisey, E.E., Ip, H.S., Tang, Z., and Parmacek, M.S. (1997). GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily. *J. Biol. Chem.* *272*, 8515–8524.
- Morrisey, E.E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M.M., Jiang, F., Ip, H.S., and Parmacek, M.S. (1998). GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* *12*, 3579–3590.

Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D.W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S.P., et al. (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev. Cell* *1*, 423–434.

Murohashi, M., Nakamura, T., Tanaka, S., Ichise, T., Yoshida, N., Yamamoto, T., Shibuya, M., Schlessinger, J., and Gotoh, N. (2010). An FGF4-FRS2alpha-Cdx2 axis in trophoblast stem cells induces Bmp4 to regulate proper growth of early mouse embryos. *Stem Cells Dayt. Ohio* *28*, 113–121.

Mylona, A., Theillet, F.-X., Foster, C., Cheng, T.M., Miralles, F., Bates, P.A., Selenko, P., and Treisman, R. (2016). Opposing effects of Elk-1 multisite phosphorylation shape its response to ERK activation. *Science* *354*, 233–237.

Na, J., Lykke-Andersen, K., Torres Padilla, M.E., and Zernicka-Goetz, M. (2007). Dishevelled proteins regulate cell adhesion in mouse blastocyst and serve to monitor changes in Wnt signaling. *Dev. Biol.* *302*, 40–49.

Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1989). Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul.* *1*, 37–44.

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J.C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 8424–8428.

Nakamura, T., Aoki, S., Kitajima, K., Takahashi, T., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2001). Molecular cloning and characterization of Kremen, a novel kringle-containing transmembrane protein. *Biochim. Biophys. Acta* *1518*, 63–72.

Narita, N., Bielinska, M., and Wilson, D.B. (1997). Wild-type endoderm abrogates the ventral developmental defects associated with GATA-4 deficiency in the mouse. *Dev. Biol.* *189*, 270–274.

Navarro, P., Festuccia, N., Colby, D., Gagliardi, A., Mullin, N.P., Zhang, W., Karwacki-Neisius, V., Osorno, R., Kelly, D., Robertson, M., et al. (2012). OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. *EMBO J.* *31*, 4547–4562.

Niakan, K.K., Ji, H., Maehr, R., Vokes, S.A., Rodolfa, K.T., Sherwood, R.I., Yamaki, M., Dimos, J.T., Chen, A.E., Melton, D.A., et al. (2010). Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *Genes Dev.* *24*, 312–326.

Niakan, K.K., Schrode, N., Cho, L.T.Y., and Hadjantonakis, A.-K. (2013). Derivation of extraembryonic endoderm stem (XEN) cells from mouse embryos and embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* *8*, 1028–1041.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* *95*, 379–391.

Nichols, J., Silva, J., Roode, M., and Smith, A. (2009). Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 3215–3222.

Niehrs, C. (1999). Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends Genet.* *TIG 15*, 314–319.

- Niehrs, C. (2006). Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25, 7469–7481.
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 767–779.
- Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R.O., Ogonuki, N., et al. (2009). The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev. Cell* 16, 398–410.
- Niswander, L., and Martin, G.R. (1992). Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* 114, 755–768.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24, 372–376.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123, 917–929.
- Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G. (2004). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol. Cell* 15, 661–675.
- Nusse, R., and Varmus, H.E. (1992). Wnt genes. *Cell* 69, 1073–1087.
- Ohnishi, Y., Huber, W., Tsumura, A., Kang, M., Xenopoulos, P., Kurimoto, K., Oleś, A.K., Araúzo-Bravo, M.J., Saitou, M., Hadjantonakis, A.-K., et al. (2014). Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages. *Nat. Cell Biol.* 16, 27–37.
- Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H., and Ishikawa, F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 280, 5307–5317.
- Oleinikov, A.V., Zhao, J., and Makker, S.P. (2000). Cytosolic adaptor protein Dab2 is an intracellular ligand of endocytic receptor gp600/megalin. *Biochem. J.* 347 Pt 3, 613–621.
- Ornitz, D.M. (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 22, 108–112.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2, REVIEWS3005.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4, 215–266.
- Ornitz, D.M., Yayon, A., Flanagan, J.G., Svahn, C.M., Levi, E., and Leder, P. (1992). Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol. Cell. Biol.* 12, 240–247.
- Ozawa, M., Baribault, H., and Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 8, 1711–1717.

- Paca, A., Séguin, C.A., Clements, M., Ryczko, M., Rossant, J., Rodriguez, T.A., and Kunath, T. (2012). BMP signaling induces visceral endoderm differentiation of XEN cells and parietal endoderm. *Dev. Biol.* *361*, 90–102.
- Pagès, G., Guérin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., and Pouysségur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* *286*, 1374–1377.
- Paine-Saunders, S., Viviano, B.L., Economides, A.N., and Saunders, S. (2002). Heparan sulfate proteoglycans retain Noggin at the cell surface: a potential mechanism for shaping bone morphogenetic protein gradients. *J. Biol. Chem.* *277*, 2089–2096.
- Palmieri, S.L., Peter, W., Hess, H., and Schöler, H.R. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.* *166*, 259–267.
- Pan, G.J., Chang, Z.Y., Schöler, H.R., and Pei, D. (2002). Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* *12*, 321–329.
- Pan, W., Choi, S.-C., Wang, H., Qin, Y., Volpicelli-Daley, L., Swan, L., Lucast, L., Khoo, C., Zhang, X., Li, L., et al. (2008). Wnt3a-mediated formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates LRP6 phosphorylation. *Science* *321*, 1350–1353.
- Patient, R.K., and McGhee, J.D. (2002). The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr. Opin. Genet. Dev.* *12*, 416–422.
- Pawson, T., and Scott, J.D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* *278*, 2075–2080.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* *22*, 153–183.
- Peng, Y., and Axelrod, J.D. (2012). Asymmetric protein localization in planar cell polarity: mechanisms, puzzles, and challenges. *Curr. Top. Dev. Biol.* *101*, 33–53.
- Percival, C.J., Marangoni, P., Tapaltsyán, V., Klein, O., and Hallgrímsson, B. (2017). The Interaction of Genetic Background and Mutational Effects in Regulation of Mouse Craniofacial Shape. *G3 Bethesda Md* *7*, 1439–1450.
- Pereira, L., Yi, F., and Merrill, B.J. (2006). Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 7479–7491.
- Pesce, M., and Schöler, H.R. (2000). Oct-4: control of totipotency and germline determination. *Mol. Reprod. Dev.* *55*, 452–457.
- Pesce, M., and Schöler, H.R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells Dayt. Ohio* *19*, 271–278.
- Pfister, S., Steiner, K.A., and Tam, P.P.L. (2007). Gene expression pattern and progression of embryogenesis in the immediate post-implantation period of mouse development. *Gene Expr. Patterns GEP* *7*, 558–573.

- Pierce, G.B., Stevens, L.C., and Nakane, P.K. (1967). Ultrastructural analysis of the early development of teratocarcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **39**, 755–773.
- Pilot-Storck, F., Chopin, E., Rual, J.-F., Baudot, A., Dobrokhotov, P., Robinson-Rechavi, M., Brun, C., Cusick, M.E., Hill, D.E., Schaeffer, L., et al. (2010). Interactome mapping of the phosphatidylinositol 3-kinase-mammalian target of rapamycin pathway identifies deformed epidermal autoregulatory factor-1 as a new glycogen synthase kinase-3 interactor. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **9**, 1578–1593.
- Plachta, N., Bollenbach, T., Pease, S., Fraser, S.E., and Pantazis, P. (2011). Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo. *Nat. Cell Biol.* **13**, 117–123.
- Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., and Mohammadi, M. (1999). Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* **98**, 641–650.
- Plotnikov, A.N., Hubbard, S.R., Schlessinger, J., and Mohammadi, M. (2000). Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell* **101**, 413–424.
- Plusa, B., Hadjantonakis, A.-K., Gray, D., Piotrowska-Nitsche, K., Jedrusik, A., Papaioannou, V.E., Glover, D.M., and Zernicka-Goetz, M. (2005). The first cleavage of the mouse zygote predicts the blastocyst axis. *Nature* **434**, 391–395.
- Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., and Hadjantonakis, A.-K. (2008). Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Dev. Camb. Engl.* **135**, 3081–3091.
- Qu, X.-B., Pan, J., Zhang, C., and Huang, S.-Y. (2008). Sox17 facilitates the differentiation of mouse embryonic stem cells into primitive and definitive endoderm in vitro. *Dev. Growth Differ.* **50**, 585–593.
- Ralston, A., and Rossant, J. (2005). Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. *Clin. Genet.* **68**, 106–112.
- Ralston, A., and Rossant, J. (2008). Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **313**, 614–629.
- Ralston, A., Cox, B.J., Nishioka, N., Sasaki, H., Chea, E., Rugg-Gunn, P., Guo, G., Robson, P., Draper, J.S., and Rossant, J. (2010). Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development* **137**, 395–403.
- Rappolee, D.A., Basilico, C., Patel, Y., and Werb, Z. (1994). Expression and function of FGF-4 in peri-implantation development in mouse embryos. *Dev. Camb. Engl.* **120**, 2259–2269.
- Repasky, G.A., Chenette, E.J., and Der, C.J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol.* **14**, 639–647.
- Reyes, J.C., Muro-Pastor, M.I., and Florencio, F.J. (2004). The GATA family of transcription factors in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* **134**, 1718–1732.
- Reyes de Mochel, N.S., Luong, M., Chiang, M., Javier, A.L., Luu, E., Toshihiko, F., MacGregor, G.R., Cinquin, O., and Cho, K.W.Y. (2015a). BMP signaling is required for cell cleavage in preimplantation-mouse embryos. *Dev. Biol.* **397**, 45–55.

Reyes de Mochel, N.S., Luong, M., Chiang, M., Javier, A.L., Luu, E., Toshihiko, F., MacGregor, G.R., Cinquin, O., and Cho, K.W.Y. (2015b). BMP signaling is required for cell cleavage in preimplantation-mouse embryos. *Dev. Biol.* *397*, 45–55.

Riley, J.K., Carayannopoulos, M.O., Wyman, A.H., Chi, M., Ratajczak, C.K., and Moley, K.H. (2005). The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* *284*, 377–386.

Rivera-Pérez, J.A., Mager, J., and Magnuson, T. (2003). Dynamic morphogenetic events characterize the mouse visceral endoderm. *Dev. Biol.* *261*, 470–487.

Rizzino, A., and Wuebben, E.L. (2016). Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1859*, 780–791.

Rodda, D.J., Chew, J.-L., Lim, L.-H., Loh, Y.-H., Wang, B., Ng, H.-H., and Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* *280*, 24731–24737.

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D., and Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* *370*, 527–532.

Rossant, J. (2007). Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst. *Reprod. Fertil. Dev.* *19*, 111–118.

Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Müller, O., Chamberlain, S.H., Masiarz, F.R., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* *262*, 1731–1734.

Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* *272*, 1023–1026.

Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., and Polakis, P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* *275*, 1790–1792.

Rula, M.E., Cai, K.Q., Moore, R., Yang, D.-H., Staub, C.M., Capo-Chichi, C.D., Jablonski, S.A., Howe, P.H., Smith, E.R., and Xu, X.-X. (2007). Cell autonomous sorting and surface positioning in the formation of primitive endoderm in embryoid bodies. *Genes. N. Y. N* *2000* *45*, 327–338.

Saba-El-Leil, M.K., Vella, F.D.J., Vernay, B., Voisin, L., Chen, L., Labrecque, N., Ang, S.-L., and Meloche, S. (2003). An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep.* *4*, 964–968.

Saiz, N., Grabarek, J.B., Sabherwal, N., Papalopulu, N., and Plusa, B. (2013). Atypical protein kinase C couples cell sorting with primitive endoderm maturation in the mouse blastocyst. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 4311–4322.

Saiz, N., Williams, K.M., Seshan, V.E., and Hadjantonakis, A.-K. (2016). Asynchronous fate decisions by single cells collectively ensure consistent lineage composition in the mouse blastocyst. *Nat. Commun.* *7*, 13463.

Sajini, A.A., Greder, L.V., Dutton, J.R., and Slack, J.M.W. (2012). Loss of Oct4 expression during the development of murine embryoid bodies. *Dev. Biol.* *371*, 170–179.

- Samarage, C.R., White, M.D., Álvarez, Y.D., Fierro-González, J.C., Henon, Y., Jesudason, E.C., Bissiere, S., Fouras, A., and Plachta, N. (2015). Cortical Tension Allocates the First Inner Cells of the Mammalian Embryo. *Dev. Cell* **34**, 435–447.
- Sato, N., Sanjuan, I.M., Heke, M., Uchida, M., Naef, F., and Brivanlou, A.H. (2003). Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev. Biol.* **260**, 404–413.
- Sato, T., Irie, K., Ooshio, T., Ikeda, W., and Takai, Y. (2004). Involvement of heterophilic trans-interaction of Necl-5/Tage4/PVR/CD155 with nectin-3 in formation of nectin- and cadherin-based adherens junctions. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **9**, 791–799.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211–225.
- Schlessinger, J., Plotnikov, A.N., Ibrahimi, O.A., Eliseenkova, A.V., Yeh, B.K., Yayon, A., Linhardt, R.J., and Mohammadi, M. (2000). Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. Cell* **6**, 743–750.
- Schrode, N., Saiz, N., Di Talia, S., and Hadjantonakis, A.-K. (2014). GATA6 levels modulate primitive endoderm cell fate choice and timing in the mouse blastocyst. *Dev. Cell* **29**, 454–467.
- Schröter, C., Rué, P., Mackenzie, J.P., and Martinez Arias, A. (2015). FGF/MAPK signaling sets the switching threshold of a bistable circuit controlling cell fate decisions in embryonic stem cells. *Dev. Camb. Engl.* **142**, 4205–4216.
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D.A., and Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11307–11312.
- Schwaerzer, G.K., Hiepen, C., Schrewe, H., Nickel, J., Ploeger, F., Sebald, W., Mueller, T., and Knaus, P. (2012). New insights into the molecular mechanism of multiple synostoses syndrome (SYNS): mutation within the GDF5 knuckle epitope causes noggin-resistance. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **27**, 429–442.
- Semënov, M.V., Tamai, K., Brott, B.K., Kühl, M., Sokol, S., and He, X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol. CB* **11**, 951–961.
- Semënov, M.V., Zhang, X., and He, X. (2008). DKK1 Antagonizes Wnt Signaling without Promotion of LRP6 Internalization and Degradation. *J. Biol. Chem.* **283**, 21427–21432.
- Shaw, R.J., and Cantley, L.C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424–430.
- Sherman, M.I., and Miller, R.A. (1978). F9 embryonal carcinoma cells can differentiate into endoderm-like cells. *Dev. Biol.* **63**, 27–34.
- Shi, G., Gao, F., and Jin, Y. (2011). The regulatory role of histone deacetylase inhibitors in Fgf4 expression is dependent on the differentiation state of pluripotent stem cells. *J. Cell. Physiol.* **226**, 3190–3196.
- Shimoda, M., Kanai-Azuma, M., Hara, K., Miyazaki, S., Kanai, Y., Monden, M., and Miyazaki, J. (2007). Sox17 plays a substantial role in late-stage differentiation of the extraembryonic endoderm in vitro. *J. Cell Sci.* **120**, 3859–3869.

- Shimokawa, K., Kimura-Yoshida, C., Nagai, N., Mukai, K., Matsubara, K., Watanabe, H., Matsuda, Y., Mochida, K., and Matsuo, I. (2011). Cell surface heparan sulfate chains regulate local reception of FGF signaling in the mouse embryo. *Dev. Cell* *21*, 257–272.
- Shimosato, D., Shiki, M., and Niwa, H. (2007). Extra-embryonic endoderm cells derived from ES cells induced by GATA Factors acquire the character of XEN cells. *BMC Dev. Biol.* *7*, 80.
- Shinnakasu, R., Yamashita, M., Shinoda, K., Endo, Y., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Ikemizu, S., and Nakayama, T. (2006). Critical YxKxHxxxRP motif in the C-terminal region of GATA3 for its DNA binding and function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 5801–5810.
- Shinnakasu, R., Yamashita, M., Kuwahara, M., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., and Nakayama, T. (2008). Gfi1-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation. *J. Biol. Chem.* *283*, 28216–28225.
- Singh, J., and Mlodzik, M. (2012). Planar cell polarity signaling: coordination of cellular orientation across tissues. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *1*, 479–499.
- Singh, A.M., Hamazaki, T., Hankowski, K.E., and Terada, N. (2007). A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 2534–2542.
- Singh, A.M., Bechard, M., Smith, K., and Dalton, S. (2012). Reconciling the different roles of Gsk3 $\beta$  in “naïve” and “primed” pluripotent stem cells. *Cell Cycle* *11*, 2991–2996.
- Sleeman, M., Fraser, J., McDonald, M., Yuan, S., White, D., Grandison, P., Kumble, K., Watson, J.D., and Murison, J.G. (2001). Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene* *271*, 171–182.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* *336*, 688–690.
- Smith, E.R., Capo-chichi, C.D., He, J., Smedberg, J.L., Yang, D.H., Prowse, A.H., Godwin, A.K., Hamilton, T.C., and Xu, X.X. (2001a). Disabled-2 mediates c-Fos suppression and the cell growth regulatory activity of retinoic acid in embryonic carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 47303–47310.
- Smith, E.R., Smedberg, J.L., Rula, M.E., Hamilton, T.C., and Xu, X.X. (2001b). Disassociation of MAPK activation and c-Fos expression in F9 embryonic carcinoma cells following retinoic acid-induced endoderm differentiation. *J. Biol. Chem.* *276*, 32094–32100.
- Solnica-Krezel, L. (2005). Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation. *Curr. Biol. CB* *15*, R213-228.
- Solter, D., Damjanov, I., and Skreb, N. (1970). Ultrastructure of mouse egg-cylinder. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* *132*, 291–298.
- Song, K., Krause, C., Shi, S., Patterson, M., Suto, R., Grgurevic, L., Vukicevic, S., van Dinther, M., Falb, D., Ten Dijke, P., et al. (2010). Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to noggin inhibition allows for engineered BMPs with superior agonist activity. *J. Biol. Chem.* *285*, 12169–12180.
- Soprano, D.R., Teets, B.W., and Soprano, K.J. (2007). Role of retinoic acid in the differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Vitam. Horm.* *75*, 69–95.

- Soudais, C., Bielinska, M., Heikinheimo, M., MacArthur, C.A., Narita, N., Saffitz, J.E., Simon, M.C., Leiden, J.M., and Wilson, D.B. (1995). Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. *Dev. Camb. Engl.* *121*, 3877–3888.
- Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M.A., Dikic, I., Ladbury, J.E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J., and Lax, I. (1994). Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* *79*, 1015–1024.
- Srinivas, S., Rodriguez, T., Clements, M., Smith, J.C., and Beddington, R.S.P. (2004). Active cell migration drives the unilateral movements of the anterior visceral endoderm. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 1157–1164.
- Stachowiak, M.K., Maher, P.A., and Stachowiak, E.K. (2007). Integrative nuclear signaling in cell development--a role for FGF receptor-1. *DNA Cell Biol.* *26*, 811–826.
- Stauber, D.J., DiGabriele, A.D., and Hendrickson, W.A. (2000). Structural interactions of fibroblast growth factor receptor with its ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 49–54.
- Stavridis, M.P., Lunn, J.S., Collins, B.J., and Storey, K.G. (2007). A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 2889–2894.
- Stefanovic, S., and Christoffels, V.M. (2015). GATA-dependent transcriptional and epigenetic control of cardiac lineage specification and differentiation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *72*, 3871–3881.
- Stephenson, R.O., Yamanaka, Y., and Rossant, J. (2010). Disorganized epithelial polarity and excess trophoblast cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 3383–3391.
- Stevens, L.C. (1966). Development of resistance to teratocarcinogenesis by primordial germ cells in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* *37*, 859–867.
- Stevens, L.C. (1970). Experimental production of testicular teratomas in mice of strains 129, A/He, and their F1 hybrids. *J. Natl. Cancer Inst.* *44*, 923–929.
- Stevens, L.C., and Little, C.C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *40*, 1080–1087.
- Stower, M.J., and Srinivas, S. (2014). Heading forwards: anterior visceral endoderm migration in patterning the mouse embryo. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *369*.
- Strickland, S., and Mahdavi, V. (1978). The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* *15*, 393–403.
- Strickland, S., Smith, K.K., and Marotti, K.R. (1980). Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells: generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl cAMP. *Cell* *21*, 347–355.
- Strumpf, D., Mao, C.-A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., and Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 2093–2102.

Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., and Dove, W.F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 256, 668–670.

Su, L.K., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262, 1734–1737.

Sulahian, R., Casey, F., Shen, J., Qian, Z.R., Shin, H., Ogino, S., Weir, B.A., Vazquez, F., Liu, X.S., Hahn, W.C., et al. (2014). An integrative analysis reveals functional targets of GATA6 transcriptional regulation in gastric cancer. *Oncogene* 33, 5637–5648.

Suzuki, Y., Montagne, K., Nishihara, A., Watabe, T., and Miyazono, K. (2008). BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and angiopoietin-1/Tie2 signalling. *J. Biochem. (Tokyo)* 143, 199–206.

Svensson, E.C., Tufts, R.L., Polk, C.E., and Leiden, J.M. (1999). Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 956–961.

Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res.* 26, 399–422.

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.

Takaoka, K., Yamamoto, M., Shiratori, H., Meno, C., Rossant, J., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2006). The mouse embryo autonomously acquires anterior-posterior polarity at implantation. *Dev. Cell* 10, 451–459.

Takeda, M., Obayashi, K., Kobayashi, A., and Maeda, M. (2004). A unique role of an amino terminal 16-residue region of long-type GATA-6. *J. Biochem. (Tokyo)* 135, 639–650.

Takeda, T., Kurachi, H., Yamamoto, T., Homma, H., Adachi, K., Morishige, K., Miyake, A., and Murata, Y. (1997). Alternative signaling mechanism of leukemia inhibitory factor responsiveness in a differentiating embryonal carcinoma cell. *Endocrinology* 138, 2689–2696.

Takeichi, M., Hatta, K., Nose, A., Nagafuchi, A., and Matsunaga, M. (1989). Cadherin-mediated specific cell adhesion and animal morphogenesis. *Ciba Found. Symp.* 144, 243–249; discussion 250–254, 290–295.

Tam, W.-L., Lim, C.Y., Han, J., Zhang, J., Ang, Y.-S., Ng, H.-H., Yang, H., and Lim, B. (2008). T-cell factor 3 regulates embryonic stem cell pluripotency and self-renewal by the transcriptional control of multiple lineage pathways. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 2019–2031.

Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., and He, X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530–535.

Tang, F., Barbacioru, C., Nordman, E., Li, B., Xu, N., Bashkirov, V.I., Lao, K., and Surani, M.A. (2010). RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nat. Protoc.* 5, 516–535.

Taniguchi, K., Ayada, T., Ichiyama, K., Kohno, R.-I., Yonemitsu, Y., Minami, Y., Kikuchi, A., Maehara, Y., and Yoshimura, A. (2007). Sprouty2 and Sprouty4 are essential for embryonic morphogenesis and regulation of FGF signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 896–902.

- Tebbutt, N.C., Giraud, A.S., Inglese, M., Jenkins, B., Waring, P., Clay, F.J., Malki, S., Alderman, B.M., Grail, D., Hollande, F., et al. (2002). Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat. Med.* **8**, 1089–1097.
- Thisse, B., and Thisse, C. (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev. Biol.* **287**, 390–402.
- Thomas, F.C., Sheth, B., Eckert, J.J., Bazzoni, G., Dejana, E., and Fleming, T.P. (2004). Contribution of JAM-1 to epithelial differentiation and tight-junction biogenesis in the mouse preimplantation embryo. *J. Cell Sci.* **117**, 5599–5608.
- Thomson, M., Liu, S.J., Zou, L.-N., Smith, Z., Meissner, A., and Ramanathan, S. (2011). Pluripotency Factors in Embryonic Stem Cells Regulate Differentiation into Germ Layers. *Cell* **145**, 875–889.
- van Tilbeurgh, H., Bezzine, S., Cambillau, C., Verger, R., and Carrière, F. (1999). Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**, 173–184.
- Topczewski, J., Sepich, D.S., Myers, D.C., Walker, C., Amores, A., Lele, Z., Hammerschmidt, M., Postlethwait, J., and Solnica-Krezel, L. (2001). The zebrafish glypican knypek controls cell polarity during gastrulation movements of convergent extension. *Dev. Cell* **1**, 251–264.
- Torres-Padilla, M.-E., Richardson, L., Kolasinska, P., Meilhac, S.M., Luetke-Eversloh, M.V., and Zernicka-Goetz, M. (2007). The anterior visceral endoderm of the mouse embryo is established from both preimplantation precursor cells and by de novo gene expression after implantation. *Dev. Biol.* **309**, 97–112.
- Tremblay, J.J., and Viger, R.S. (2003). Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **85**, 291–298.
- Tremblay, J.J., Hamel, F., and Viger, R.S. (2002). Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity. *Endocrinology* **143**, 3935–3945.
- Trichas, G., Begbie, J., and Srinivas, S. (2008). Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC Biol.* **6**, 40.
- Twigg, S.R., Burns, H.D., Oldridge, M., Heath, J.K., and Wilkie, A.O. (1998). Conserved use of a non-canonical 5' splice site (/GA) in alternative splicing by fibroblast growth factor receptors 1, 2 and 3. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 685–691.
- Tylzanowski, P., Mebis, L., and Luyten, F.P. (2006). The Noggin null mouse phenotype is strain dependent and haploinsufficiency leads to skeletal defects. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **235**, 1599–1607.
- Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203–212.
- Urist, M.R., and Strates, B.S. (2009). The Classic: Bone Morphogenetic Protein. *Clin. Orthop.* **467**, 3051–3062.
- Velcich, A., Delli-Bovi, P., Mansukhani, A., Ziff, E.B., and Basilico, C. (1989). Expression of the K-fgf protooncogene is repressed during differentiation of F9 cells. *Oncogene Res.* **5**, 31–37.

- Velkey, J.M., and O'Shea, K.S. (2003). Oct4 RNA interference induces trophectoderm differentiation in mouse embryonic stem cells. *Genes. N. Y. N* 2000 37, 18–24.
- Vinot, S., Le, T., Ohno, S., Pawson, T., Maro, B., and Louvet-Vallée, S. (2005). Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Dev. Biol.* 282, 307–319.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489–501.
- Walck-Shannon, E., and Hardin, J. (2014). Cell Intercalation from top to bottom. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 34–48.
- Wallingford, J.B. (2006). Planar cell polarity, ciliogenesis and neural tube defects. *Hum. Mol. Genet.* 15 *Spec No 2*, R227-234.
- Wallingford, J.B., and Habas, R. (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Dev. Camb. Engl.* 132, 4421–4436.
- Wallingford, J.B., and Mitchell, B. (2011). Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. *Genes Dev.* 25, 201–213.
- Wallingford, J.B., Fraser, S.E., and Harland, R.M. (2002). Convergent Extension. *Dev. Cell* 2, 695–706.
- Wamaitha, S.E., del Valle, I., Cho, L.T., Wei, Y., Fogarty, N.M., Blakeley, P., Sherwood, R.I., Ji, H., and Niakan, K.K. (2015). Gata6 potently initiates reprogramming of pluripotent and differentiated cells to extraembryonic endoderm stem cells. *Genes Dev.* 29, 1239–1255.
- Wandzioch, E., Edling, C.E., Palmer, R.H., Carlsson, L., and Hallberg, B. (2004). Activation of the MAP kinase pathway by c-Kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines. *Blood* 104, 51–57.
- Wang, H., Gambosova, K., Cooper, Z.A., Holloway, M.P., Kassai, A., Izquierdo, D., Cleveland, K., Boney, C.M., and Altura, R.A. (2010). EGF regulates survivin stability through the Raf-1/ERK pathway in insulin-secreting pancreatic  $\beta$ -cells. *BMC Mol. Biol.* 11, 66.
- Wang, J., Paradis, P., Aries, A., Komati, H., Lefebvre, C., Wang, H., and Nemer, M. (2005). Convergence of protein kinase C and JAK-STAT signaling on transcription factor GATA-4. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9829–9844.
- Wang, J., Hamblet, N.S., Mark, S., Dickinson, M.E., Brinkman, B.C., Segil, N., Fraser, S.E., Chen, P., Wallingford, J.B., and Wynshaw-Boris, A. (2006). Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Dev. Camb. Engl.* 133, 1767–1778.
- Wang, J.K., Gao, G., and Goldfarb, M. (1994). Fibroblast growth factor receptors have different signaling and mitogenic potentials. *Mol. Cell. Biol.* 14, 181–188.
- Wang, K., Zhang, Y., Li, X., Chen, L., Wang, H., Wu, J., Zheng, J., and Wu, D. (2008). Characterization of the Kremen-binding Site on Dkk1 and Elucidation of the Role of Kremen in Dkk-mediated Wnt Antagonism. *J. Biol. Chem.* 283, 23371–23375.

- Wang, Q.T., Piotrowska, K., Ciemerych, M.A., Milenkovic, L., Scott, M.P., Davis, R.W., and Zernicka-Goetz, M. (2004). A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Cell* *6*, 133–144.
- Wang, S., Yin, J., Chen, D., Nie, F., Song, X., Fei, C., Miao, H., Jing, C., Ma, W., Wang, L., et al. (2013). Small-molecule modulation of Wnt signaling via modulating the Axin-LRP5/6 interaction. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 579–585.
- Webster, M.K., and Donoghue, D.J. (1996). Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J.* *15*, 520–527.
- Wicklow, E., Blij, S., Frum, T., Hirate, Y., Lang, R.A., Sasaki, H., and Ralston, A. (2014). HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst. *PLoS Genet.* *10*, e1004618.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* *336*, 684–687.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., and Hogan, B.L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* *9*, 2105–2116.
- Wu, D., and Pan, W. (2010). GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 161–168.
- Wu, J., and Mlodzik, M. (2008). The frizzled extracellular domain is a ligand for Van Gogh/Stbm during nonautonomous planar cell polarity signaling. *Dev. Cell* *15*, 462–469.
- Wu, G., Gentile, L., Fuchikami, T., Sutter, J., Psathaki, K., Esteves, T.C., Araúzo-Bravo, M.J., Ortmeier, C., Verberk, G., Abe, K., et al. (2010). Initiation of trophectoderm lineage specification in mouse embryos is independent of Cdx2. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 4159–4169.
- Wu, G., Huang, X., Hua, Y., and Mu, D. (2011). Roles of planar cell polarity pathways in the development of neural [correction of neutral] tube defects. *J. Biomed. Sci.* *18*, 66.
- Wymann, M.P., Björklöf, K., Calvez, R., Finan, P., Thomast, M., Trifilieff, A., Barbier, M., Altruda, F., Hirsch, E., and Laffargue, M. (2003). Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 275–280.
- Xenopoulos, P., Kang, M., and Hadjantonakis, A.-K. (2012). Cell Lineage Allocation Within the Inner Cell Mass of the Mouse Blastocyst. In *Mouse Development*, J.Z. Kubiak, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 185–202.
- Xenopoulos, P., Kang, M., Puliafito, A., Di Talia, S., and Hadjantonakis, A.-K. (2015). Heterogeneities in Nanog Expression Drive Stable Commitment to Pluripotency in the Mouse Blastocyst. *Cell Rep.*
- Xiao, G., Gopalakrishnan, R., Jiang, D., Reith, E., Benson, M.D., and Franceschi, R.T. (2002). Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *17*, 101–110.

Xie, Y., Jin, Y., Merenick, B.L., Ding, M., Fetalvero, K.M., Wagner, R.J., Mai, A., Gleim, S., Tucker, D.F., Birnbaum, M.J., et al. (2015). Phosphorylation of GATA-6 is required for vascular smooth muscle cell differentiation after mTORC1 inhibition. *Sci. Signal.* *8*, ra44.

Xin, M., Davis, C.A., Molkentin, J.D., Lien, C.-L., Duncan, S.A., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2006). A threshold of GATA4 and GATA6 expression is required for cardiovascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 11189–11194.

Yamamoto, M., Beppu, H., Takaoka, K., Meno, C., Li, E., Miyazono, K., and Hamada, H. (2009). Antagonism between Smad1 and Smad2 signaling determines the site of distal visceral endoderm formation in the mouse embryo. *J. Cell Biol.* *184*, 323–334.

Yamanaka, Y., Ralston, A., Stephenson, R.O., and Rossant, J. (2006). Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *235*, 2301–2314.

Yamanaka, Y., Lanner, F., and Rossant, J. (2010). FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 715–724.

Yamashita, M., Shinnakasu, R., Asou, H., Kimura, M., Hasegawa, A., Hashimoto, K., Hatano, N., Ogata, M., and Nakayama, T. (2005). Ras-ERK MAPK cascade regulates GATA3 stability and Th2 differentiation through ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* *280*, 29409–29419.

Yang, H.Y., and Evans, T. (1992). Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 4562–4570.

Yang, D.-H., Smith, E.R., Roland, I.H., Sheng, Z., He, J., Martin, W.D., Hamilton, T.C., Lambeth, J.D., and Xu, X.-X. (2002). Disabled-2 is essential for endodermal cell positioning and structure formation during mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* *251*, 27–44.

Yang, D.-H., Cai, K.Q., Roland, I.H., Smith, E.R., and Xu, X.-X. (2007). Disabled-2 is an epithelial surface positioning gene. *J. Biol. Chem.* *282*, 13114–13122.

Yang, X., Gong, Y., Tang, Y., Li, H., He, Q., Gower, L., Liaw, L., and Friesel, R.E. (2013). Spry1 and Spry4 differentially regulate human aortic smooth muscle cell phenotype via Akt/FoxO/myocardin signaling. *PLoS One* *8*, e58746.

Yart, A., Laffargue, M., Mayeux, P., Chretien, S., Peres, C., Tonks, N., Roche, S., Payrastre, B., Chap, H., and Raynal, P. (2001). A critical role for phosphoinositide 3-kinase upstream of Gab1 and SHP2 in the activation of ras and mitogen-activated protein kinases by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* *276*, 8856–8864.

Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., and Ornitz, D.M. (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* *64*, 841–848.

Yi, F., Pereira, L., Hoffman, J.A., Shy, B.R., Yuen, C.M., Liu, D.R., and Merrill, B.J. (2011). Opposing effects of Tcf3 and Tcf1 control Wnt stimulation of embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* *13*, 762–770.

Ying, L., Mills, J.A., French, D.L., and Gadue, P. (2015). OCT4 Coordinates with WNT Signaling to Pre-pattern Chromatin at the SOX17 Locus during Human ES Cell Differentiation into Definitive Endoderm. *Stem Cell Rep.* *5*, 490–498.

- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* *115*, 281–292.
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* *453*, 519–523.
- Yu, C.F., Roshan, B., Liu, Z.X., and Cantley, L.G. (2001). ERK regulates the hepatocyte growth factor-mediated interaction of Gab1 and the phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* *276*, 32552–32558.
- Yu, C.F., Liu, Z.-X., and Cantley, L.G. (2002). ERK negatively regulates the epidermal growth factor-mediated interaction of Gab1 and the phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* *277*, 19382–19388.
- Yu, K., Xu, J., Liu, Z., Sosic, D., Shao, J., Olson, E.N., Towler, D.A., and Ornitz, D.M. (2003). Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 3063–3074.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., and Dailey, L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* *9*, 2635–2645.
- Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., et al. (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 367–375.
- Zheng, C.F., and Guan, K.L. (1993). Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J. Biol. Chem.* *268*, 11435–11439.
- Zhong, W., Wang, Q.T., Sun, T., Wang, F., Liu, J., Leach, R., Johnson, A., Puscheck, E.E., and Rappolee, D.A. (2006). FGF ligand family mRNA expression profile for mouse preimplantation embryos, early gestation human placenta, and mouse trophoblast stem cells. *Mol. Reprod. Dev.* *73*, 540–550.
- Zhuang, Y., Faria, T.N., Chambon, P., and Gudas, L.J. (2003). Identification and characterization of retinoic acid receptor beta2 target genes in F9 teratocarcinoma cells. *Mol. Cancer Res. MCR* *1*, 619–630.
- Zimmermann, S., and Moelling, K. (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* *286*, 1741–1744.
- Ziomek, C.A., and Johnson, M.H. (1980). Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell* *21*, 935–942.





---

*Caractérisation de la différenciation de l'endoderme primitif :  
Coopération entre la voie de signalisation RTK-FGF et le facteur de transcription  
GATA6*

---

*Résumé*

A E3.5 jours de développement (E3.5), l'embryon murin se compose d'une monocouche de cellules externes correspondant au Trophectoderme (TE) et d'une masse cellulaire interne (MCI), hétérogène, constituée de deux sous populations de cellules précurseurs : les cellules épiblastiques (Epi) et les cellules d'endoderme primitif (EPr). NANOG, marqueur épiblastique et GATA6, marqueur de l'EPr, sont co-exprimés à E3.5 dans la MCI puis adoptent une expression exclusive au sein de leur lignage respectif. La différenciation du lignage EPr nécessite l'expression de GATA6 et l'activation de la voie Récepteur Tyrosine Kinase (RTK) pour l'induction de gènes cibles de GATA6 tels que SOX17 et GATA4.

Au cours de ma thèse, j'ai, dans un premier temps, étudié la relation GATA6/voie RTK-FGF lors de l'induction de l'expression des gènes de différenciation de l'EPr. J'ai utilisé des cellules souches embryonnaires murines ES sauvages ou mutantes pour *Gata6* (ES *Gata6*<sup>-/-</sup>), dans lesquelles j'ai surexprimé différentes formes mutantes de *Gata6* inactivées sur les différents résidus identifiés comme potentiellement phosphorylables par la voie RTK-FGF. Ainsi, j'ai analysé l'expression protéique des gènes SOX17 et GATA4 ainsi que des expressions ARN de ces cibles et d'autres gènes caractéristiques exprimés dans l'EPr dans les différentes conditions de surexpression des formes de *Gata6* en absence ou présence d'inhibiteurs de la voie RTK-FGF. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence que la transmission du signal s'effectue au travers de récepteur au FGF et qu'il existe une compensation entre les branches MEK-ERK et PI3K ciblant le résidu Sérine 37 de GATA6. Enfin, les résidus S34 et T509 sont nécessaires et les résidus S34, S37 et T509 semblent coopérer, au travers d'un mécanisme pour le moment non détaillé, pour l'induction des gènes cibles exprimés au sein de l'EPr.

Dans un second temps, j'ai débuté la caractérisation phénotypique du rôle des facteurs Dickkopf1 (DKK1), un inhibiteur de la voie WNT/beta caténine, et *Noggin*, un inhibiteur de la voie des Bone Morphogenic Protein (BMP) lors de la différenciation de l'EPr en endoderme pariétal (EP) et viscéral (EV). A l'aide de modèles de souris KO pour DKK1 et NOGGIN, croisées en fond C57Bl6 pur, j'ai pu observer que l'expression d'OCT4 était maintenue au sein des embryons homozygotes mutants pour *Dkk1* et double homozygotes mutants pour *Dkk1* et *Noggin*. Cependant, le mécanisme potentiel de compensation ou de coopération de ces deux marqueurs n'est pour le moment pas détaillé précisément et mérite l'analyse d'un plus grand nombre d'embryons mutants.

*Abstract*

At E3.5 days of development (E3.5), mouse embryo consists of a monolayer of external cells corresponding to Trophectoderme (TE) and of an intern cell mass (ICM), heterogeneous, constituted by two subpopulations of precursory cells: epiblastic cells (Epi) and primitive endoderm cells (EPr). NANOG, an Epi marker and GATA6, a PrE marker, are co-expressed at E3,5 in the MCI and then adopt an exclusive expression within their respective lineage. EPr differentiation requires both expression of GATA6 and RTK pathway in order to induce late markers SOX17 and GATA4 expression.

First, I studied the relation GATA6/RTK during this process to understand the mechanism of induction of these target genes during final EPr differentiation. I used embryonic stem cells ES WT or *Gata6* mutants (ES *Gata6*<sup>-/-</sup>), in which I transfected various *Gata6* mutant constructions on different residues characterized as potentially phosphorylable by the RTK pathway. So, I analyzed protein expression of SOX17 and GATA4 target genes as well as RNA expression of characteristic genes expressed in the EPr in different inhibition conditions of RTK pathway. So, I was able to highlight that the transmission of the signal is made through the FGF receptor (FGFR1) and that there is compensation between MEK-ERK and PI3K pathways highlighted by later *Gata6* overexpression of certain mutant forms. Finally, residue S34, S37 and T509 seems to cooperate, through a mechanism not detailed for the moment, for the induction of the EPr target genes.

Then, I was interested to phenotypically characterize the role of *Dickkopf1* (DKK1), an inhibitor of the WNT/beta-catenin pathway, and *Noggin*, an inhibitor of the Bone Morphogenic Protein (BMP) pathway during the EPr differentiation in parietal endoderm (EP) and visceral (EV). Using models of mouse KO for *Dkk1* and *Noggin*, met in pure background C57Bl6, I was able to observe that OCT4 expression was maintained within the *Dkk1*<sup>-/-</sup>, and *Dkk1*<sup>-/-</sup> *Noggin*<sup>-/-</sup> embryos. However, the potential compensation or cooperation mechanism of these two markers is not understanding well for the moment and deserves the analysis of a largest mutant embryos number.