

Orsay

N° d'ordre :

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

Présentée

Pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES

DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

par

Olivier Lespinet

Sujet :

**La famille des gènes *Snail*.
Caractérisation de deux nouveaux membres chez le mollusque *Patella vulgata*.
Hypothèse sur leur fonction ancestrale chez les *Bilateria*.**

Soutenue le lundi 15 janvier 2001, devant la Commission d'examen

M.	Jo van den Biggelaar	Rapporteur
M.	Michel Volovitch	Rapporteur
M ^{me}	Bernadette Limbourg-Bouchon	Examineur
M ^{me}	Angela Nieto	Examineur
M.	André Adoutte	Examineur
M.	Michel Cassan	Examineur

Il n'y a pas de vie sans risque...
La vie sans risque,
c'est une sorte de mort permanente,
c'est une vie d'esclave.

Léo Lagrange, 1940

J'aimerais tout d'abord remercier les membres du jury pour leur enthousiasme, leur patience et leur disponibilité.

J'aimerais également remercier ici toutes les personnes qui ont contribué de quelque façon que ce soit au bon déroulement de ma thèse. Je remercie tout particulièrement André Adoutte et Michel Cassan pour leurs conseils, leurs encouragements et leur soutien tout au long de ces années.

Je ne voudrais pas non plus oublier ceux qui ont partagé avec moi les moments d'exaltation et parfois de doute qui se sont succédés durant ces quatre années. Que ce soit à Gif-sur-Yvette: Benjamin, Cyril, Guillaume, Jean-François, Martine, Michel, Nicolas et Renaud, à Roscoff: Marie ou bien encore à Utrecht: André, Anke, Eric, Hans, Lex, Pascal et Wim.

Je tiens également à remercier ceux qui au cours de ces années ont toujours essayé de satisfaire ma curiosité, m'ont fait partager leur passion et m'ont soutenu dans toutes mes initiatives: Jo van den Biggelaar, Claus Nielsen, Marguerite Picard et Michel Termier.

Je voudrais également remercier ceux qui m'ont accueillis chez eux et m'ont fait la preuve de leur amitié durant mes années orcéennes et giffaises: Fatima, Marie-Hélène, Véronique, Henri et la joyeuse troupe de la rue du Général Duchesne et plus récemment, Michel, Marie-Claire, Ambroise et Marie. Sans oublier Anne, pour notre amitié, nos rêves de révolution, son pastis et sa spécialité au miel et au melon !

J'aimerais enfin terminer par remercier Micheline, Gilbert et Hélène pour tout ce qu'ils ont su me donner, ainsi que tous ceux du grand-ouest (Bordelais, Nantais, Niortais, Oulmais, Rethais, *etc.*) qui dans les bons comme dans les mauvais coups de vent ont toujours su rester unis et solidaires.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1- The new animal phylogeny: Reliability and Implications	3
<u>Partie A- Définitions et concepts</u>	
Chapitre 2- Description et comparaison de la formation des feuillets embryonnaires chez les métazoaires	8
1. Cadre général du développement des métazoaires	9
1.1. <u>La fécondation: créer un nouvel organisme</u>	10
1.2. <u>Le clivage: organiser la multicellularité</u>	10
1.3. <u>La gastrulation: établir les feuillets embryonnaires</u>	13
1.4. <u>L'organogénèse: réaliser le plan d'organisation</u>	15
2. Développement précoce de quelques métazoaires	15
2.1. <u>Les ecdysozoaires</u>	15
2.1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> (Arthropode)	15
2.1.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> (Nématode)	17
2.2. <u>Les lophotrochozoaires</u>	19
2.2.1. <i>Patella vulgata</i> (Mollusque)	19
2.3. <u>Les deuterostomiens</u>	23
2.3.1. <i>Paracentrotus lividus</i> (Echinoderme)	23
2.3.2. <i>Halocynthia roretzi</i> (Urochordé)	26
2.3.3. <i>Branchistoma floridae</i> (Céphalochordé)	27
2.3.4. <i>Danio rerio</i> (Vertébré)	29
2.3.5. <i>Xenopus laevis</i> (Vertébré)	31
2.3.6. <i>Gallus gallus</i> (Vertébré)	34
2.3.7. <i>Mus musculus</i> (Vertébré)	37
3. Remarques et conclusions	41
3.1. <u>L'unité dans la diversité</u>	41
3.2. <u>De l'existence et de l'homologie des feuillets embryonnaires</u>	42
3.3. <u>Conclusions</u>	44
Chapitre 3- Comprendre les mécanismes génétiques gouvernant la formation du mésoderme	45
1. La formation du mésoderme: quelques généralités	46
2. Contrôle génétique de la formation du mésoderme chez <i>Drosophila melanogaster</i>	46

2.1. <u>Etablissement de l'axe Dorso-ventral chez <i>D. melanogaster</i></u>	46
2.2. <u>La détermination du mésoderme</u>	49
2.3. <u>La différenciation précoce du mésoderme</u>	51
3. Contrôle génétique de la formation du mésoderme chez les vertébrés	52
3.1. <u>La formation du mésoderme chez <i>Xenopus laevis</i></u>	52
3.2. <u>Le contrôle du mésoderme chez les autres vertébrés</u>	56
4. Comparaison Ecdysozoaires / Deutérostomiens	58
5. Conclusions	60

Partie B- Approche expérimentale

Chapitre 4- Caractérisation de gènes homologues de <i>Snail</i> chez <i>Patella vulgata</i>	61
1. Choix d'un organisme modèle représentant les lophotrochozoaires	62
2. Un organisme modèle: <i>Patella vulgata</i>	63
3. Gros plan sur le gène <i>Snail</i>	64
4. Recherche de gènes homologues de <i>Snail</i>	68
4.1. <u>L'approche par PCR</u>	68
4.2. <u>L'alignement des séquences disponibles en 1996</u>	69
4.3. <u>Conception d'oligonucléotides spécifiques de <i>Snail</i></u>	72
4.4. <u>Amplification d'un fragment <i>Snail</i> chez <i>Patella vulgata</i></u>	74
5. Crible de banques d'ADN complémentaires	74
6. Recherche de gènes paralogues par Southern Blot	77
6.1. <u>Analyse par Southern Blot: conditions expérimentales</u>	77
6.2. <u>Analyse par Southern Blot: résultats</u>	77
7. Crible d'une banque d'ADN génomique	78
8. La famille des gènes <i>Snail</i> : un premier bilan	81
8.1. <u>Chez <i>Patella vulgata</i></u>	81
8.2. <u>Chez les Métazoaires</u>	83
8.2.1. <u>Niveau de similitude</u>	84
8.2.2. <u>Phylogénie de la famille des gènes <i>Snail</i></u>	85
8.3. <u>Conclusions</u>	88
9. Détermination des profils d'expression des gènes pv- <i>Slak</i>	89
9.1. <u>Mise au point du protocole d'Hybridation in situ chez <i>Patella vulgata</i></u>	89
9.2. <u>Profil d'expression de pv-<i>Slak1</i></u>	89
9.3. <u>Profil d'expression de pv-<i>Slak2</i></u>	90
9.4. <u>L'approche par anti-corps</u>	91
9.5. <u>Conclusions</u>	91

Conclusions	93
Bibliographie	96
Annexe	

Introduction

L'organisation relative des différentes parties d'un organisme suffisait au début du 19^{ième} siècle à Cuvier pour organiser le règne animal en quatre embranchements majeurs: vertébrés, articulés (insectes, crustacés, annélides), mollusques et radiata (coelentérés, échinodermes) (Cuvier, 1817). Cependant, pour son contemporain Geoffroy St Hilaire, plus que leur organisation c'est la fonction comparée des organes et la recherche d'homologies fonctionnelles entre les embranchements qui devait nous permettre d'organiser les métazoaires (Geoffroy Saint-Hilaire, 1822). Il fût ainsi l'un des premiers à introduire la notion d'évolution dans la classification des animaux.

Pour Darwin, puis Haeckel, l'embryologie constituait une source de caractères permettant d'assigner chaque taxon à un phylum particulier. C'est la célèbre théorie de la récapitulation où "l'ontogenèse récapitule la phylogenèse". Devant la méconnaissance des processus ontogéniques et suite à l'appel de Wilhelm Roux (Roux, 1894), pour une véritable approche expérimentale de ces phénomènes, les spéculations évolutives allaient progressivement être abandonnées par les embryologistes. C'est la compréhension des mécanismes gouvernants le développement des embryons qui allait alors guider leur travail à partir de la fin du 19^{ième} siècle (Nübler-Jung and Arendt, 1994; Raff, 1996).

Il faudra attendre la seconde moitié du 20^{ième} siècle, l'élucidation des grands principes de la génétique et l'isolement des premiers mutants du développement (Lewis, 1978) pour que les biologistes s'intéressent de nouveau au rôle des processus ontogéniques comme moteur de l'évolution des métazoaires. C'est en particulier la mise en évidence de la surprenante conservation des gènes qui contrôlent ces mécanismes chez des organismes aussi dissemblables que les vertébrés et les arthropodes qui allait apporter un souffle nouveau à l'embryologie comparée des métazoaires.

L'étude de l'évolution des réseaux de gènes gouvernant le développement des animaux allait ainsi très rapidement constituer un nouveau champ de la biologie. Il s'agit en effet désormais d'établir une étroite correspondance entre les modifications du contrôle génétique des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués lors de l'établissement du plan d'organisation des métazoaires et l'évolution de ces plans d'organisations entre différentes espèces ou différents phylums. Mon sujet de thèse s'inscrit dans le cadre de cette nouvelle discipline familièrement appelée "*Evo-Devo*".

Si les progrès considérables de la biologie du développement reposent essentiellement sur une approche expérimentale et l'utilisation d'organismes modèles, la phylogénie des métazoaires reste en revanche inaccessible à l'expérimentation. Elle se limite par conséquent à la recherche de caractères

homologues (morphologiques ou moléculaires), à leur exploitation pour reconstruire les parentés, ainsi qu'à l'étude de leur pondération et de leur polarisation.

Bien qu'ils ne soient pas encore acceptés par tous, les résultats récents obtenus par l'analyse des caractères moléculaires (ARN 18S, gènes Hox, *etc.*) (Halanych et al., 1995; Aguinaldo et al., 1997; de Rosa et al., 1999) ont cependant permis de proposer une phylogénie des métazoaires qui réfute la vision classique d'une évolution lente et très graduelle des animaux, allant des phylums à plan d'organisation simple vers ceux à plan d'organisation plus complexe. Cette nouvelle phylogénie réfute en particulier l'existence de phylums intermédiaires (acoelomates et pseudocoelomates) situés entre ceux à plans d'organisation simples (cnidaires et cténophores) et ceux à plans d'organisation plus complexes (coelomates). Elle propose au contraire une subdivision des métazoaires en trois grandes groupes (deutérostomiens, ecdysozoaires et lophotrochozoaires) et souligne le caractère élaboré du plan d'organisation de l'ancêtre des animaux à symétrie bilatérale (*urbilateria*).

Ce nouveau scénario (Chapitre 1) nous a conduit à utiliser le groupe sous-étudié des lophotrochozoaires pour valider l'hypothèse "haeckelienne" d'une origine unique du mésoderme chez l'ancêtre des métazoaires à symétrie bilatérale. En effet, en dépit d'un mode de formation très différent (Chapitre 2), un certain nombre de gènes semblent conservés lors de la spécification du mésoderme chez les ecdysozoaires et les deutérostomiens (Chapitre 3). La recherche de gènes homologues à ceux-ci chez un lophotrochozaire devait nous permettre de confirmer leur fonction mésodermique ancestrale. La recherche et la caractérisation des gènes de la famille *Snail* chez le mollusque *Patella vulgata* (Chapitre 4) nous à cependant conduit à revoir notre hypothèse sans doute trop naïve du rôle de la fonction "spécificateur du mésoderme" du gène *Snail* et d'éclairer ce problème sous un jour nouveau.

**The new animal phylogeny:
Reliability and Implications**

L'apport des données moléculaires et leur analyse critique nous conduit à une vision nouvelle de la phylogénie des métazoaires.

Mon travail de thèse s'inspirant directement de cette nouvelle phylogénie, il m'a semblé utile de lui consacrer le chapitre introductif.

The new animal phylogeny: Reliability and implications

André Adoutte*, Guillaume Balavoine, Nicolas Lartillot, Olivier Lespinet, Benjamin Prud'homme, and Renaud de Rosa

Centre de Génétique Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Bâtiment 26, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

DNA sequence analysis dictates new interpretation of phylogenetic trees. Taxa that were once thought to represent successive grades of complexity at the base of the metazoan tree are being displaced to much higher positions inside the tree. This leaves no evolutionary “intermediates” and forces us to rethink the genesis of bilaterian complexity.

A deep reorganization of the metazoan phylogenetic tree is presently taking place as a result of the input of molecular data. Far from being an exercise confined to a small circle of aficionados, the changing views on the pattern of animal interrelationships has profound consequences for understanding the underlying processes of animal diversification. As has repeatedly been stressed, we shall never be able to reason on the evolution of development and the way it has shaped animal diversity unless we have a reliable history of the path taken by this diversification. Here, we highlight the salient recent results based on genetic data, especially the displacement of taxa long thought to represent successive grades of complexity at the base of the metazoan tree, to much higher positions inside the tree. This leaves us with no evolutionary “intermediates” and forces us to rethink the genesis of bilaterian complexity. The reappraisal of animal evolution rests on several congruent approaches ranging from primary gene sequence analysis to qualitative molecular signatures within appropriate genes. Each of them, however, has its methodological difficulties; we shall, therefore, also try to briefly pinpoint the issues of contention and discuss the strength of the present view.

Preliminary Comments on the Reliability of Phylogenetic Trees. To an outsider, the field of phylogenetic reconstruction may appear to be full of controversies and uncertainties. There have been acrimonious debates over the best methodology to use for reconstruction (phenetics vs. cladistics) and over the relative merits of morphological vs. molecular data. Worst of all, contradictory trees have kept pouring in, often with insufficient critical assessment. Obviously, we cannot review the whole field here, but we wish to emphasize three points to justify our reasoned optimism and confidence in the recent molecular phylogenies.

(i) Tree Reconstruction Has Improved. Not only has the amount of molecular data increased exponentially, but we have become much more aware of the various difficulties and artifacts of phylogeny reconstruction (1, 2).

Among the artifacts plaguing molecular phylogenies, mutational saturation and unequal rates of evolution between homologous sequences are the most pervasive. Their combined effects are disastrous (3). This is the well studied long-branch attraction artifact. Its effects are all of the more pervasive than sequences are more saturated (i.e., they have accumulated multiple substitutions at certain nucleotide positions). Fortunately, there are now ways of identifying saturation as well as long branching taxa (3), which allow one to discard the most problematic data. In addition, a set of methods is emerging that aims at extracting the most meaningful information from sequences rather than pooling all substitutions (3).

Additionally, in recent years, next to primary genetic sequences, we have witnessed the emergence of a new type of genetic evidence, more qualitative in nature. These consist in genomic rearrangements, such as those in the mitochondrial genome (4) and transposition events of SINES and LINEs in nuclear genomes (5). They are almost totally immune from homoplasy and therefore constitute very powerful “signatures” for kinship when they are found in the same arrangement in two taxa. Their main drawback is that, contrary to primary sequence, which can always be obtained, one has to rely on chance for these qualitative events to have occurred among the taxa under study!

It should be stressed that, although the set of difficulties just listed pertain to the quality of single datasets, phylogeneticists are often confronted with what seems to be difficulties related to the evolutionary process itself and that therefore can plague all datasets relative to a given problem. Of these, the most serious is “adaptive radiation.” Such a rapid split-

ting of lineages appears to have occurred repeatedly during evolution, and it renders reconstruction of the order of splits very difficult even with large amounts of sequence data. This emphasizes the notion of limit of resolution of a given data set. A molecule, such as rRNA, is not a “good” or “bad” phylogenetic indicator in itself. Its efficiency is to be evaluated against a particular historical set up. First, any gene may be unsuitable for very ancient events, if too variable, or for very recent events, if too conservative. A tradeoff must be found between the level of variability of the sequences used and the time interval one wishes to analyze. Second, even a gene that appears to be suitable for a given time interval may fail to resolve closely spaced speciation events within this interval. In these cases, contrary to intuition, simply increasing the amount of sequence will not allow to confidently resolve the order of emergence of taxa, as shown for ribosomal RNA (6, 7). In these cases, complementary information from either morphological or qualitative genomic modifications that have occurred in between these closely spaced nodes might prove to be the most useful.

(ii) Molecular Kinship Cannot Be Caused by Chance. Although the idea is perhaps not intuitive, establishing kinship in a phylogeny does not have the same status as denying it. The underlying principle is simple: When kinship, based on numerous nucleotide or amino acid similarities, is observed in a molecular phylogeny at terminal nodes of a tree, then the probability that such a conjunction occurs by chance is small and can only be interpreted as being caused by recent shared ancestry. In contrast, species can be pulled away from each other in a tree because of various artifacts, as indicated above. Thus, finding

*E-mail: adoutte@cgm.cnrs-gif.fr.

kinship is a positive, strong result whereas finding disjunction is at best indicative.

Indeed, this is a major characteristic of the new results: Discovering new and unexpected kinship relationships, between nematodes and arthropods, for example, is a stronger argument than merely claiming that nematodes should be placed at the base of protostomes and deuterostomes because they are different from them and less complex.

(iii) Congruence Is a Powerful Argument. Phylogenetic reconstruction, as much as cosmology, is an exercise in which there cannot be direct experimental testing of hypotheses through reconstitution of evolutionary history in the laboratory. In such scientific disciplines, congruence between results obtained from independent data sets remains the most decisive argument. Such congruence has increasingly emerged in animal phylogeny, as will be seen below. We claim that the improvements just listed now allow one to reach quite a few solid conclusions, enabling an independent confrontation with the vast and precious amount of morphological data.

The New rRNA-Based Phylogeny in a Nutshell. Small subunit ribosomal RNA remains the molecule for which the largest database is available for phylogenetic reconstruction. Starting with the work of Field *et al.* (8), it has progressively allowed revisions of metazoan phylogeny ranging from the shift of “superphyla” to details of in-traphyla arrangement. Fig. 1 *A* and *B* summarize many of these modifications, based on the experimental work of several laboratories (9) with emphasis on those that appear to be robust when using the criteria discussed above. Fig. 1*A*, “traditional” animal phylogeny, is basically that reproduced in major precladistic zoology textbooks (10) following the work of Hyman (11). It is a good illustration of the long prevailing notion that animal evolution went from simple to complex through gradual steps, with extant animals actually representing grades of intermediate complexity supposed to have been those of their ancestors. Fig. 1*B* is exclusively based on rRNA. One can notice the depth of the reorganization by comparing the shift in colored rectangles between Fig. 1*A* and *B*.

The clear demarcation of Bilaterians. All molecular phylogenies show the bilaterians as a monophyletic group clearly separated from sponges, cnidarians, and ctenophores. In the rRNA tree, bilaterians arise from a long stem, probably reflecting mutational acceleration in rRNA. Recent detailed studies based on rRNA involving sponges, cnidarians, and ctenophores (12–15) failed to fully resolve the phylogeny of the outgroups of Bilateria. They suggest a paraphyletic emergence of sponges at the

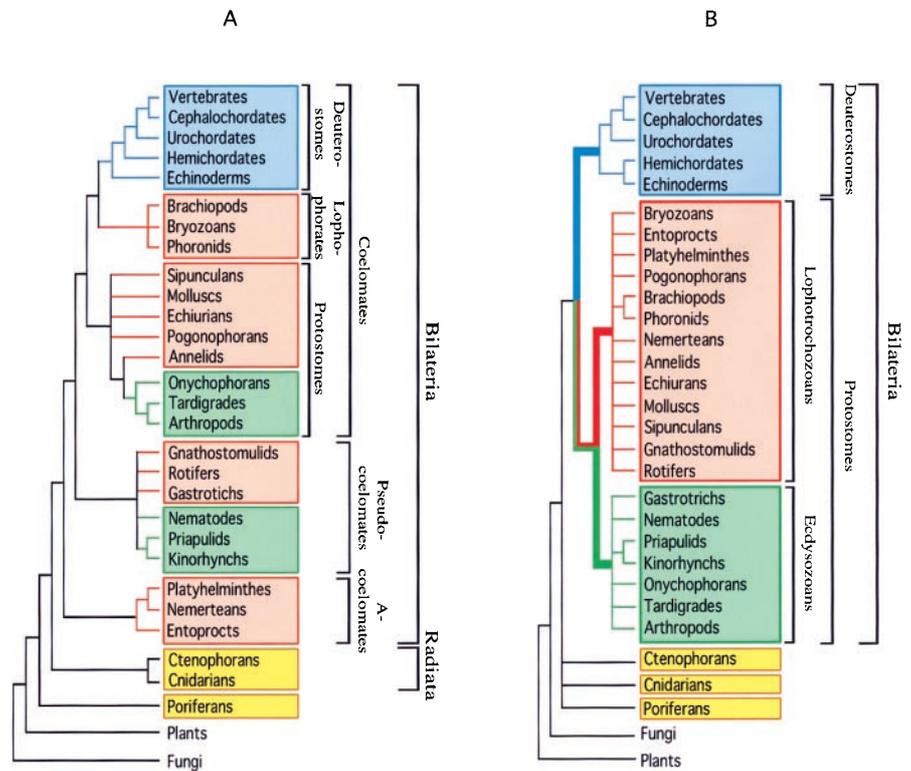


Fig. 1. Metazoan phylogenies. (A) The traditional phylogeny based on morphology and embryology, adapted from Hyman (11). (B) The new molecule-based phylogeny. A conservative approach was taken in *B*: i.e., some datasets provide resolution within some of the unresolved multifurcations displayed, but we have limited the extent of resolution displayed to that solidly provided by rRNA only.

base of the metazoan tree, followed by a monophyletic Ctenophora and a possibly paraphyletic Cnidaria. Use of protein coding genes such as EF1- α (16) or HSP 70 (17) yielded even less resolved trees.

The demise of Articulés and the birth of Lophotrochozoa. The concept of *Articulés*, i.e., the clade uniting annelids and arthropods on the basis of shared segmentation of the body trunk, is as old as comparative anatomy (18) and has been maintained for nearly two centuries in all major textbooks and even in some recent cladistic treatments (19, 20) of metazoan phylogeny with two notable exceptions (21, 22). It has been known for about the same length of time, however, that annelids share with molluscs and several other unsegmented phyla a very typical mode of spiral cleavage of the egg, usually followed by the formation of a so-called trochophore larva. The split of *Articulés* into arthropods on one side and annelids on the other is now strongly supported by rRNA. The interesting consequence in terms of evolution of development is that it resurrects the question of the ancestry of segmentation in a new frame.

Not only did *Articulés* explode, but several groups were quite unexpectedly brought in the immediate proximity of annelids and molluscs. This is especially

the case of the lophophorates, a group that comprised brachiopods, bryozoans, and phoronids, which all share a horseshoe-shaped feeding device made of ciliated tentacles. These were considered as basal deuterostomes in the majority of zoological textbooks and, especially in the case of brachiopods, even in the most recent cladistic analyses (23) because of the radial mode of cleavage of their egg and their trimeric coelom. rRNA, however, brought them robustly within protostomes and, more specifically, within the clade comprising annelids and molluscs (24). Hence, the name “Lophotrochozoa” for the whole clade uniting lophophore-bearing animals with those displaying a trochophore larva. Interestingly, removal of lophophorates from the deuterostomes induces a reevaluation of the scenario of early deuterostome evolution and genesis of the chordate body plan.

Acoelomates are Lophotrochozoans. The other groups that were brought within lophotrochozoans are the flatworms (platyhelminths) and the nemertean. These animals, lacking a coelome, segmentation, elaborate organs, and an anus (in flatworms) were considered, in a gradist perspective, to be the most primitive bilaterians. However, they were brought, through rRNA, inside the lophotrochozo-

ans (25–28), with whom they share a spiral mode of cleavage and ciliated larval forms that may be considered as modified trochophores.

The burst of Pseudocoelomates and the birth of Ecdysozoa. Perhaps the most striking result of the landmark study of Aguilardo *et al.* (28) based on rRNA was the demonstration that nematodes had been misplaced outside of the bilaterians by a long-branch attraction artifact and that their true position was as a sister group of arthropods. This result came as the conclusion of a set of results, both molecular and morphological, showing that pseudocoelomates (or aschelminths) did not make up a monophyletic group. The various phyla grouped by Hyman (11) under this name comprised Rotifera, Gastrotricha, Kinorhyncha, Nematomorpha, and Nematoda. Priapulids are often attached to this group. They are all essentially small animals having some form of internal cavity but devoid of a true coelom. Both molecular and morphological analysis (23, 29–31) showed them to distribute between the two major protostome lines, but the nematodes resisted and remained very basal in molecular analyses because, previous to the analysis of Aguilardo *et al.* (28), all of their representatives had extremely long branches. Displacement of the nematodes to a much higher position in the metazoan tree, if true, is a major result because it forces a complete reinterpretation of the data originating from their now fully sequenced genome as well as of all of their biological features: hence, the importance of confirming this placement with independent data, as described below.

In short, the subdivision of protostomes into two large group was confirmed and extended. As a sister group to lophotrochozoans, a vast group comprising nematodes, arthropods, and other phyla (kinorhynchs, priapulids, nematomorphs, etc.) emerged. These phyla all share the presence of a molting cuticle (albeit of very different composition, chitin in arthropods, collagen in nematodes), hence the name “Ecdysozoa” given to them (28).

The relative stability of deuterostomes. In the face of the deep restructuring of protostome phylogeny, deuterostomes have remained stable as a monophyletic group but have undergone significant internal reorganization. Other than the removal of lophophorates, one major point is the joining of hemichordates with echinoderms (32). The important implication is that the existence of a sister group to chordates allows the reevaluation of competing *scenarii* of vertebrate origination.

The Lack of Resolution Within each of the Two Great Protostome Clades. An observation repeatedly made when using rRNA data is

of the extreme difficulty in resolving the branching order of phyla within the lophotrochozoans and the ecdysozoans. This is so much the case that even groups that are strongly believed to be monophyletic on the basis of morphological data, such as molluscs, emerge as polyphyletic in these trees (33). We have argued elsewhere that, within both branches, the phyla have emerged in a relatively rapid historical succession, thus leading to a case in which rRNA reaches its limits of resolution (34). We would like to stress that, if this view is correct, it leads to a profound reappraisal of the Cambrian explosion: Instead of corresponding to the rapid diversification of all of the bilaterian phyla, the explosion would have occurred simultaneously in three already well separated and poorly diversified lineages (the lophotrochozoan stem line, the ecdysozoan one, and the deuterostome one), implying that such an explosion would have been caused not by a single “internal” genetic innovation but, more likely, by an “external” (i.e., ecological) set of events.

The Gist of Supporting Evidence from Hox Genes. The 60-amino acid homeodomain of the *Hox* genes and its flanking sequences contain specific phylogenetic information in the form of signature amino acids or short characteristic peptides (35). Together with the laboratories of Carroll and Akam, we recently sequenced genes from the *Hox* complex of a number of key taxa to look for signatures that might allow to test the new rRNA phylogeny (36). No less than five *Hox* genes show signatures supporting the close affinity of brachiopods and annelids. Two of these signatures are also recognized in flatworms. In parallel, one strongly conserved “posterior” gene supports the close relationship between nematodes, priapulids, and arthropods. The existence of each of the two protostome clades is thus greatly strengthened by the *Hox* data.

Are Acoels the Most Primitive Bilaterians? It has recently been claimed by Ruiz-Trillo *et al.* (37) on the basis of rRNA data that acoel worms did not belong to the Platyhelminthes but instead formed a separate lineage emerging at the base of the Bilateria. This would be an important result, invalidating all of the previous conclusions and resurrecting the idea of an extant evolutionary intermediate of “simple” design. However, despite the precautions that were taken to ensure the reliability of this conclusion, there are reasons to be doubtful. First, the data of Ruiz-Trillo *et al.* (37) show that a substantial amount of saturation already affects the rRNA genes of the acoels they used, raising the risk of a long-branch attraction artifact, pulling acoels to the bottom of the tree. Second, there are morphological characters and

even molecular studies [summarized by Peterson *et al.* (38)] linking acoels to nemertodermatids, which themselves clearly belong to lophotrochozoans, along with all other platyhelminths. Third, we have isolated from the acoel *Childia* a number of *Hox* sequences that bear clear lophotrochozoan signatures (N.L., B.P., and A.A., unpublished work). Finally, Berney *et al.* (39) have very recently shown, by using EF1- α sequences, that acoels are closely related to platyhelminths within the lophotrochozoans, both on the basis of full sequence phylogenetic analysis and through a shared sequence signature with three triclad platyhelminths.

A New Perspective on Animal Evolution. The new molecular based phylogeny has several important implications. Foremost among them is the disappearance of “intermediate” taxa between sponges, cnidarians, ctenophores, and the last common ancestor of bilaterians or “*Urbilateria*.” Several lineages previously thought to branch at the base of the bilaterian tree, most notably acoelomates (such as platyhelminths) and pseudocoelomates (such as nematodes) are now embedded within or next to groups that display elaborate morphologies and complex genomic arrays. The implication is that these groups are secondarily simplified, in their morphology as well as at the molecular level. A corollary is that we have a major gap in the stem leading to the *Urbilateria*. We have lost the hope, so common in older evolutionary reasoning, of reconstructing the morphology of the “coelomate ancestor” through a scenario involving successive grades of increasing complexity based on the anatomy of extant “primitive” lineages. For example, the traditional view of an acoel-like ancestor, progressively acquiring a coelome, differentiated internal organs, segments, and so on must be abandoned. In this respect, the situation is not unlike the new perspective emerging on the phylogeny of eukaryotes as a whole (40), in which most of the formerly intermediate taxa have been pulled upwards.

How then can we attempt to reconstruct the path to the *Urbilateria*? Four research programs can be advocated (also see ref. 41). First, through comparison of extant terminal taxa belonging to the two big branches, protostomes and deuterostomes, and careful evaluation of all of their possible homologous characters, we should be able to reconstruct an image of the urbilaterian. That approach is certainly feasible in terms of genetic homologies because establishment of homology at the sequence level is fairly straightforward, and, once several genome programs of metazoans are completed, we should be able to identify the minimal gene content

that was present in the urbilaterian. It will prove more tricky to establish that these genes, especially the ones involved in development, were carrying out the same function in the ancestor. More elaborate strategies will be needed on that point because recruitment of gene networks to different functions may have been widespread during evolution. Interestingly, the new phylogeny draws attention to a badly understudied group of animals, the lophotrochozoans, which holds great promise for this reconstruction. None of the major model organisms presently belongs to this large animal branch. The new phylogeny thus provides a plea for a major effort toward the developmental and genomic study of a lophotrochozoan model.

The second approach will consist of better characterizing the outgroups to bilaterians, sponges, cnidarians, and ctenophores. A good start has already been made (42–45). Following the same reasoning as above, comparison of diploblasts vs. bilateria gene content should enable us to characterize the basal metazoan genome and hence the one from which the urbilaterian was progressively constructed.

Indeed, the demise of the gradist interpretation of early bilaterian evolution does not mean, of course, that the last common ancestor has not itself been the result of a progressive construction, possibly through an extended period. It means that we do not

have extant representatives of these stages. This emphasizes the importance of the third approach, that of paleontological investigations on the pre-Cambrian and early Cambrian, which may well yield the crucial missing information (41, 46).

A fourth approach to reconstruct the steps toward the last common ancestor was recently introduced (47). Through comparative analysis of early development in all metazoan phyla, these authors were led to conclude that the ancestral mode of development was one in which a small animal of the size and design of extant larvae was first constructed on the basis of short-range cell-to-cell interactions. The later appearance in these micrometazoans of undifferentiated set aside cells with much greater multiplication potential, together with the recruitment of genetically based large scale patterning mechanisms (such as those using the *Hox* complex) would have enabled the evolution of the adult body plans of the major animal phyla. This stimulating hypothesis is now opened to some forms of experimental testing because it makes specific predictions as to the gene networks involved at each stage. At any rate, it offers the first “post gradist” scenario accounting for the genesis of the urbilaterian.

The new phylogeny nicely accounts for the innumerable homologies that have been disclosed between genes belonging to taxa

of the three branches. Because all of the bilaterians are now seen to descend from the same ancestor, they have shared the stock of genes possessed by this ancestor. Now, the fact that these homologies are so numerous implies that the genome of this ancestor was a quite elaborate one. In fact, some very crude evaluations can now be made: The number of genes is now known precisely or carefully estimated in several invertebrate phyla belonging both to protostomes (*Caenorhabditis elegans*, 20,000; *Drosophila melanogaster*, over 12,000) or to deuterostomes (*Ciona intestinalis*, 16,000). One may therefore wander to suggest that the basal metazoan genome was made up of 15–20,000 genes. The ≈70,000 genes of Vertebrates would then reflect the two massive duplication events that are thought to have occurred early in their history. If such is the case, then, except for vertebrates, morphological innovation within bilaterians would not have relied so much on generation of new genes as on tinkering with an already existing array. The new phylogeny thus re-emphasizes the importance of evolution of developmental regulatory networks (48, 49).

Work in our laboratory has been supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, and “Programme Génome” from Centre National de la Recherche Scientifique. We thank Claus Nielsen and Eric Davidson for comments on the manuscript.

1. Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J. & Hillis, D. M. (1996) in *Molecular Systematics* (Sinauer, Sunderland, MA), pp. 407–514.
2. Felsenstein, J. (1988) *Annu. Rev. Genet.* **22**, 521–565.
3. Philippe, H. & Laurent, J. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 616–623.
4. Boore, J. L. & Brown, W. M. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 668–674.
5. Nikaïdo, M., Rooney, A. P. & Okada, N. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10261–10266.
6. Philippe, H., Chenuil, A. & Adoutte, A. (1994) *Development (Cambridge, U.K.)* **1994**, Suppl., 15–25.
7. Abouheif, E., Zardoya, R. & Meyer, A. (1998) *J. Mol. Evol.* **47**, 394–405.
8. Field, K. G., Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Ghiselin, M. T., Raff, E. C., Pace, N. R. & Raff, R. A. (1988) *Science* **239**, 748–753.
9. Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N. & de Rosa, R. (1999) *Trends Genet.* **15**, 104–108.
10. Barnes, R. D. (1985) in *Invertebrate Zoology*, ed. Barnes, R. D. (Saunders College, Philadelphia), pp. 58–70.
11. Hyman, L. H. (1940) in *The Invertebrates*, (McGraw-Hill, New York), pp. 22–43.
12. Wainwright, P. O., Hinkle, G., Sogin, M. L. & Stickle, S. K. (1993) *Science* **260**, 340–342.
13. Cavalier-Smith, T., Allsopp, M. T. E. P., Chao, E. E., Boury-Esnault, N. & Vacelet, J. (1996) *Can. J. Zool.* **74**, 2031–2045.
14. Collins, A. G. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15458–15463.
15. Kim, J., Kim, W. & Cunningham, C. W. (1999) *Mol. Biol. Evol.* **16**, 423–427.
16. Kobayashi, M., Wada, H. & Satoh, N. (1996) *Mol. Phylogenet. Evol.* **5**, 414–422.
17. Borchellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J. & Le Parco, Y. (1998) *Mol. Biol. Evol.* **15**, 647–655.
18. Cuvier, G. (1817) *Le Règne Animal Distribué Selon son Organisation* (Deterville, Paris).
19. Nielsen, C. (1995) *Animal Evolution: Interrelationships of the Living Phyla* (Oxford Univ. Press, New York).
20. Brusca, R. C. & Brusca, G. J. (1990) in *Invertebrates*, (Sinauer, Sunderland, MA), pp. 879–889.
21. Eernisse, D. J., Albert, J. S. & Anderson, F. E. (1992) *Syst. Biol.* **41**, 305–330.
22. Zrzavy, J., Mihaluk, S., Kepka, P., Bezdek, A. & Tietz, D. (1998) *Cladistics* **14**, 249–285.
23. Nielsen, C., Scharff, N. & Eiby-Jacobsen, D. (1996) *Biol. J. Linn. Soc.* **57**, 385–410.
24. Halanych, K. M., Bacheller, J. D., Aguinaldo, A. M. A., Liva, S. M., Hillis, D. M. & Lake, J. A. (1995) *Science* **267**, 1641–1643.
25. Caranza, S., Baguna, J. & Riutort, M. (1997) *Mol. Biol. Evol.* **14**, 485–497.
26. Campos, A., Cummings, M. P., Peyes, J. L. & Lacleite, J. P. (1998) *Mol. Phylogenet. Evol.* **10**, 1–10.
27. Littlewood, D. T., Telford, M. J., Clough, K. A. & Rohde, K. (1998) *Mol. Phylogenet. Evol.* **9**, 72–79.
28. Aguinaldo, A. M. A., Turbeville, J. M., Linford, L. S., Rivera, M. C., Garey, J. R., Raff, R. A. & Lake, J. A. (1997) *Nature (London)* **387**, 489–493.
29. Mackey, L. Y., Winnepenninckx, B., De Wachter, R., Backeljau, T., Emschermann, P. & Garey, J. R. (1996) *J. Mol. Evol.* **42**, 552–559.
30. Winnepenninckx, B., Backeljau, T., Mackey, L. Y., Brooks, J. M., De Wachter, R., Sudhir, K. & Garey, J. R. (1995) *Mol. Biol. Evol.* **12**, 1132–1137.
31. Wallace, R. L., Ricci, C. & Melone, G. (1996) *Invertebr. Biol.* **115**, 104–112.
32. Wada, H. & Satoh, N. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1801–1804.
33. Winnepenninckx, B., Backeljau, T. & De Wachter, R. (1996) *Mol. Biol. Evol.* **13**, 1306–1317.
34. Balavoine, G. & Adoutte, A. (1998) *Science* **280**, 397–398.
35. Balavoine, G. (1998) *Am. Zool.* **38**, 843–858.
36. de Rosa, R., Grenier, J. K., Andreeva, T., Cook, C. E., Adoutte, A., Akam, M., Carroll, S. B. & Balavoine, G. (1999) *Nature (London)* **399**, 772–776.
37. Ruiz-Trillo, I., Riutort, M., Littlewood, D. T., Herniou, E. A. & Baguna, J. (1999) *Science* **283**, 1919–1923.
38. Peterson, K. J., Cameron, R. A. & Davidson, E. H. (2000) *Dev. Biol.* **219**, 1–17.
39. Berney, C., Pawlowski, J. & Zaninetti, L. (2000) *Mol. Biol. Evol.*, in press.
40. Philippe, H. & Adoutte, A. (1998) in *Evolutionary Relationships Among Protozoa*, eds. Combs, G. H., Vickerman, K., Sleight, M. A. & Warren, A. (Chapman & Hall, London), pp. 25–56.
41. Knoll, A. H. & Carroll, S. B. (1999) *Science* **284**, 2129–2137.
42. Finnerty, J. R. & Martindale, M. Q. (1999) *Evol. Dev.* **1**, 16–23.
43. Galliot, B., de Vargas, C. & Miller, D. (1999) *Dev. Genes Evol.* **209**, 186–197.
44. Martinez, D. E., Dirksen, M. L., Bode, P. M., Jamrich, M., Steele, R. E. & Bode, H. R. (1997) *Dev. Biol.* **192**, 523–536.
45. Muller, W. E., Kruse, M., Blumbach, B., Skorokhod, A. & Muller, M. (1999) *Gene* **238**, 179–193.
46. Conway Morris, S. (1994) *Development (Cambridge, U.K.)* **1994**, Suppl., 1–13.
47. Peterson, K. J., Cameron, R. A. & Davidson, E. H. (1997) *BioEssays* **19**, 623–631.
48. Jacob, F. (1977) *Science* **196**, 1161–1166.
49. Carroll, S. B. (1995) *Nature (London)* **376**, 479–485.

Partie A- Définitions et concepts

**Description et comparaison
de la formation des feuillets embryonnaires
chez les métazoaires**

A l'issue d'un bref rappel des différentes étapes de l'embryogenèse des métazoaires, la description des premiers stades du développement de quelques *Bilateria*, choisis en fonction de leur position dans la nouvelle phylogénie des métazoaires (Chapitre 1) et/ou de leur statut de système modèle en génétique du développement, va me servir à mettre en exergue l'unité des processus gouvernant l'ontogenèse des métazoaires. Les différences qui peuvent exister d'une espèce à l'autre seront soulignées en insistant notamment sur l'organisation des feuillets embryonnaires et en particulier sur la formation du mésoderme.

1. Cadre général du développement des métazoaires

Les métazoaires sont définis par la possession de cellules différenciées organisées en tissus et organes (Haeckel, 1866; Nielsen, 1995). A l'exception notable de ceux qui se reproduisent par parthénogenèse¹ ou par scissiparité², leur cycle de développement commence lors de la fécondation par la fusion de gamètes haploïdes en une cellule diploïde unique, le zygote (Figure 1). Au cours de la phase de clivage³, ce zygote va subir une série de divisions qui vont lui permettre d'acquérir son caractère multicellulaire. Durant la gastrulation, puis l'organogénèse, les cellules obtenues à l'issue du clivage vont progressivement s'organiser et se différencier en tissus et en organes (Franquinet and Foucrier, 1998; Gallien, 1979; Gallien, 1958; Gilbert, 1997; Houillon, 1967; Wolpert et al., 1998).

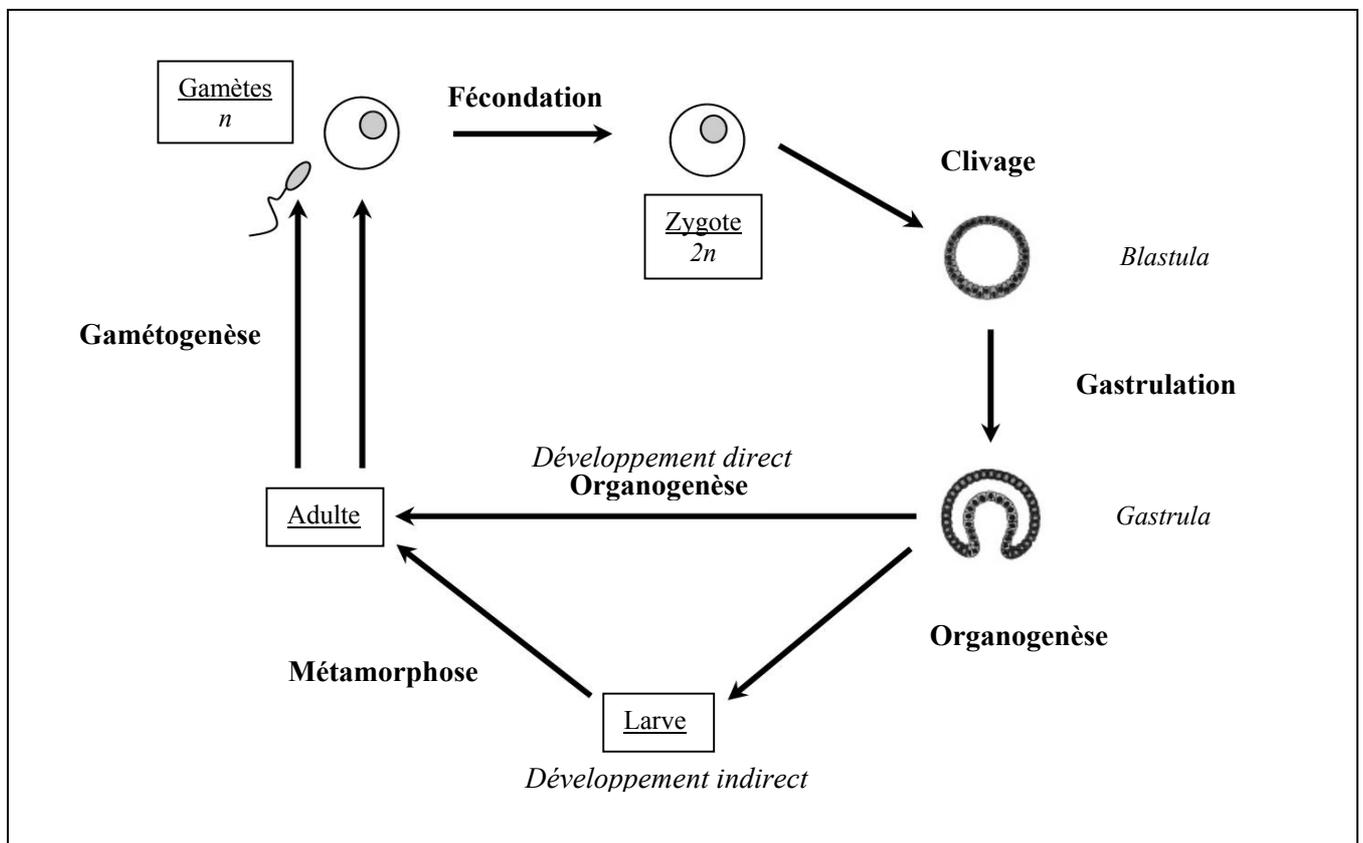


Figure 1: Schéma général du développement des métazoaires

¹ Reproduction à partir d'un ovule non fécondé.

² Forme de multiplication dans laquelle l'organisme se divise en deux parties.

³ Afin d'éviter toute confusion avec l'établissement d'une organisation segmentée du corps, j'utiliserai de préférence le terme de clivage à celui de "segmentation" classiquement utilisé pour décrire ce processus.

1.1. La fécondation: créer un nouvel organisme

La fécondation commence par la rencontre des gamètes produits par les individus sexuellement matures. A l'issue d'une première phase de reconnaissance, le noyau du gamète mâle pénètre dans le cytoplasme du gamète femelle. L'œuf ainsi fécondé va alors modifier brutalement sa concentration ionique (ions sodium et calcium). C'est, en règle générale, le début d'une étape de maturation qui se caractérise classiquement par l'élévation d'une membrane de fécondation prévenant la polyspermie, l'achèvement de la méiose du pronucléus femelle⁴, la ségrégation différentielle du cytoplasme germinale, une augmentation du métabolisme (activation de la synthèse protéique des messagers maternels, décondensation de la chromatine des pronuclei et début de la réplication). Les pronuclei mâle et femelle vont ensuite fusionner pour former le noyau du zygote, c'est l'amphimixie.

1.2. Le clivage: organiser la multicellularité

Le clivage de l'embryon consiste en une succession de divisions cellulaires, sans qu'il y ait d'augmentation du volume de l'embryon. Cela aboutit à la compartimentation de l'embryon et de ses composants cytoplasmiques et contribue à sa différenciation et à son organisation ultérieures.

On distingue classiquement plusieurs modes de clivage. Selon la quantité de vitellus présente dans l'œuf, la division peut en effet être holoblastique (totale) ou méroblastique (superficielle). D'une manière générale, le clivage est holoblastique lorsque l'œuf est relativement pauvre en vitellus⁵. Dans le cas d'œufs particulièrement chargés en vitellus⁶, la cytodierèse⁷ est incomplète et l'on observe un clivage méroblastique qui n'affecte qu'une petite partie du cytoplasme.

Un deuxième critère de classification concerne la taille des blastomères obtenus au cours des divisions successives. Si les blastomères sont de même taille, on considère que la division est égale. Sinon, on parle de division inégale (Figure 2).

Un autre critère important de classification concerne l'orientation des fuseaux de division. Plusieurs cas se présentent. Ils peuvent en effet être longitudinaux (parallèles), latitudinaux (perpendiculaires) ou obliques par rapport à l'axe animal-végétatif du zygote⁸ (Figures 3 et 5).

⁴ Selon le degré de maturation de l'ovocyte avant la fécondation, on assiste à l'émission d'un ou de deux globules polaires.

⁵ Cas des œufs alcécites, oligolécithes ou hétérolécithes.

⁶ Œufs centrolécithes ou télolécithes.

⁷ Formation d'une membrane cellulaire qui sépare les cellules sœurs obtenues par mitose.

⁸ Le pôle animal se définit généralement par la position des globules polaires.

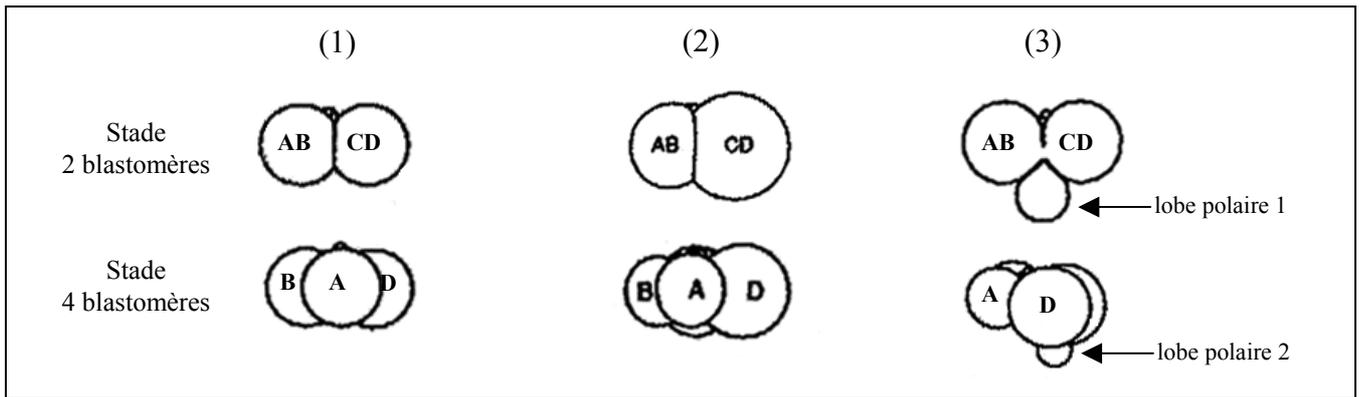


Figure 2: Clivage égal et inégal. (1) Clivage égal. (2) Clivage inégal. (3) Clivage inégal avec formation de lobes polaires (d'après Freeman, 1992).

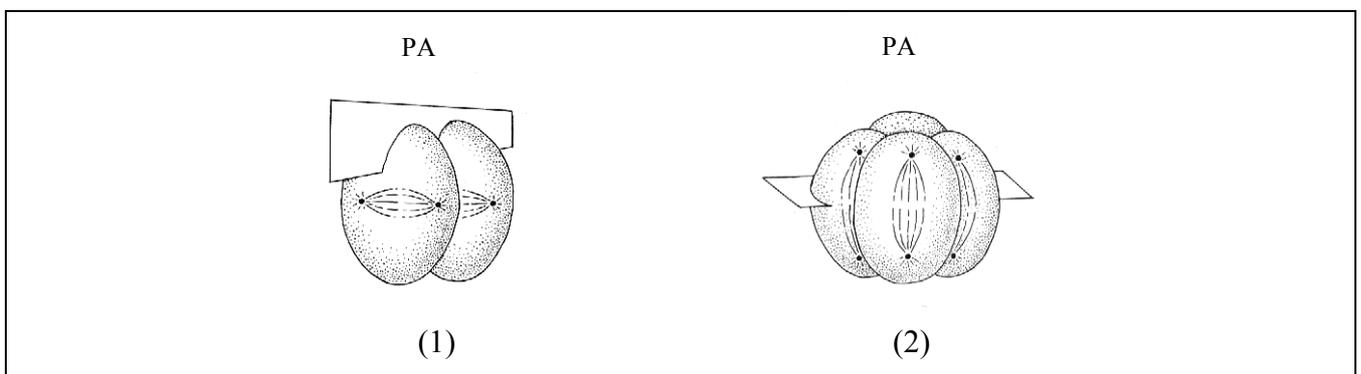


Figure 3: Différents plans de clivage. (1) Clivage longitudinal. (2) Clivage latitudinale. PA: Pôle Animal. (d'après Gilbert, 1997).

Cette diversité nous conduit à distinguer plusieurs types de clivages. On définit ainsi par exemple, le clivage radiaire (à symétrie axiale ou bilatérale) qui se caractérise par une alternance de plan de division longitudinaux et latitudinaux et le clivage rotationnel ou les plans de division longitudinaux et latitudinaux co-existent durant le même cycle de division (Figure 4).

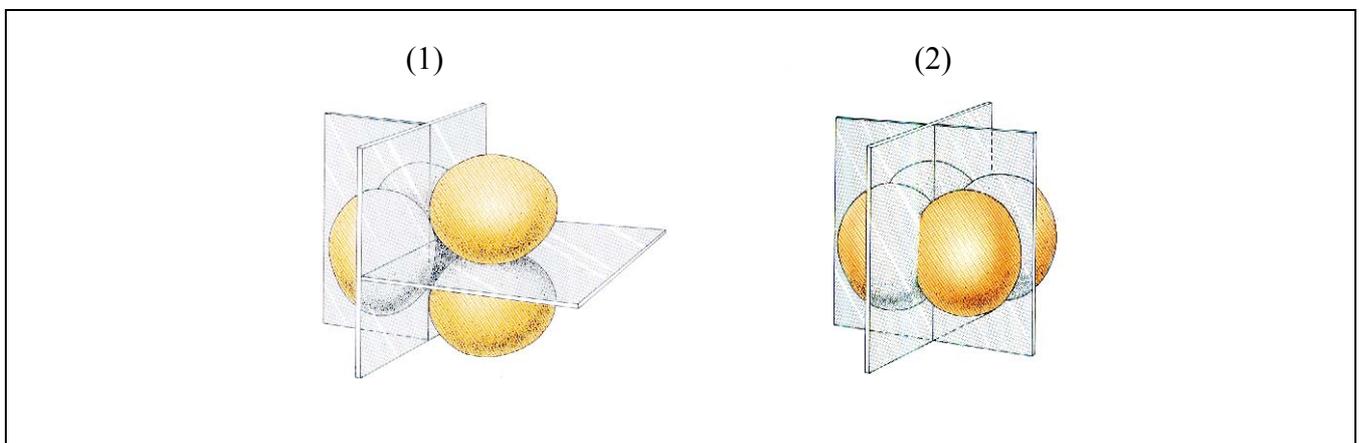


Figure 4: Différents types de clivages. (1) Clivage rotationnel. (2) Clivage radiaire (d'après Gilbert, 1997).

On définit enfin, le clivage spiral qui se caractérise par une disposition en quinconce des blastomères selon l'axe radial (animal-végétatif) de l'embryon. Ce mouvement de rotation résulte de la position oblique des fuseaux de divisions par rapport à cet axe⁹ ainsi que du basculement de l'orientation des fuseaux entre chaque divisions (Figure 5).

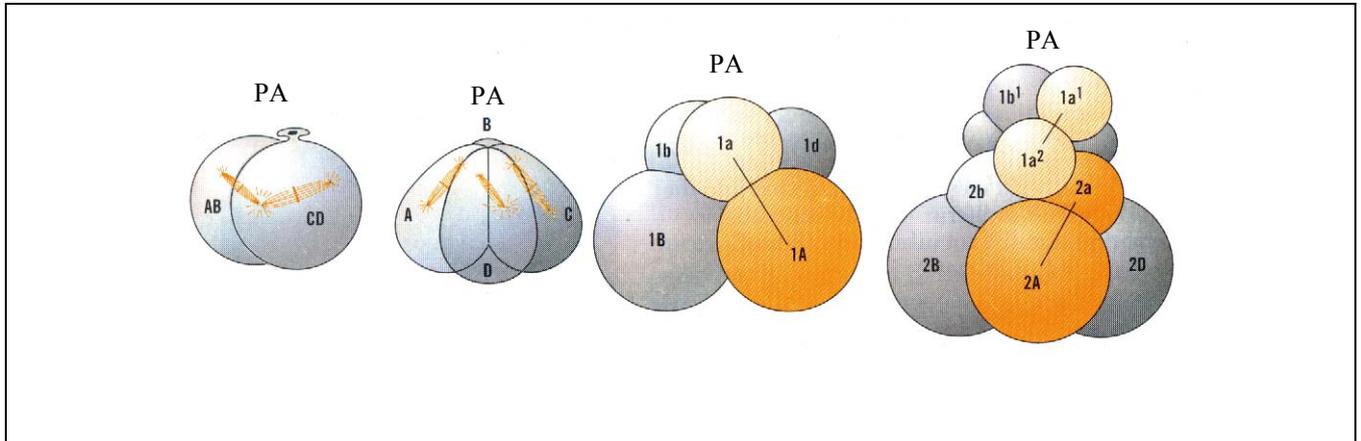


Figure 5: Clivage Spiral. On remarquera la position oblique des fuseaux de division, ainsi que leur orientation alternée à chaque nouvelle division. PA: Pôle animal (d'après Gilbert, 1997).

Quelque soit son type, le clivage conduit à l'obtention d'une *blastula* multicellulaire (Figure 1) possédant un faible niveau d'organisation et dont les cellules sont agencées en un épithélium unistratifié définissant une cavité centrale, le blastocèle. Selon la taille de cette cavité on distingue deux principaux types de *blastula*. La *coeloblastula* possède une cavité importante alors que la *sterroblastula* est quasiment dépourvue de blastocèle (Figure 6).

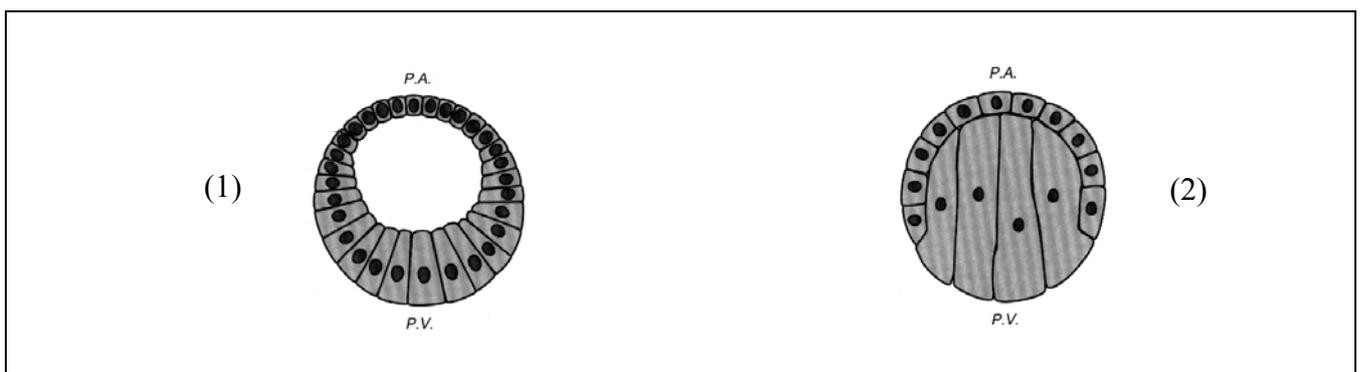


Figure 6: Différents types de blastulas. (1) Coeloblastula. (2) Sterroblastula (d'après Franquinet et Foucrier, 1998).

⁹ On parle parfois également de division oblique.

1.3. La gastrulation: établir les feuillets embryonnaires

La gastrulation fait suite au clivage (Figure 1) et se caractérise par l'acquisition d'un haut niveau d'organisation. Au cours de cette phase du développement et sous l'action conjuguée de détermination cellulaire et de mouvements morphogénétiques complexes, la *blastula* va s'organiser en feuillets embryonnaires qui contribueront à définir l'organisation générale de l'adulte (Denis, 1997).

Formalisée par Haeckel et Lankester à la fin du 19^{ième} siècle (Haeckel, 1874; Lankester, 1877; Willmer, 1994), l'idée d'une organisation précoce de tous les métazoaires en feuillets embryonnaires a pour origine les toutes premières observations réalisées chez le poulet, puis leur extension progressive aux autres métazoaires (Hall, 2000). Ainsi, chez les métazoaires les plus "simples", la gastrulation conduirait initialement à organiser l'embryon en deux feuillets épithéliaux primaires : l'ectoderme externe et l'endoderme interne (Figure 7). On parle alors dans ce cas de métazoaires diploblastiques (*i.e.* cnidaires et cténaires). Chez les métazoaires à symétrie bilatérale (*Bilateria*) un nouveau feuillet intermédiaire fait son apparition. On parle alors d'animaux triploblastiques (Figure 7). Certaines cellules de l'ectoderme et/ou de l'endoderme vont en effet se dissocier des deux feuillets initiaux pour se placer entre les membranes basales de leurs épithéliums respectifs et constituer ainsi un troisième feuillet: le mésoderme. Ce feuillet est qualifié de secondaire et peut se présenter sous la forme d'un épithélium ou bien d'un tissu mésenchymateux.

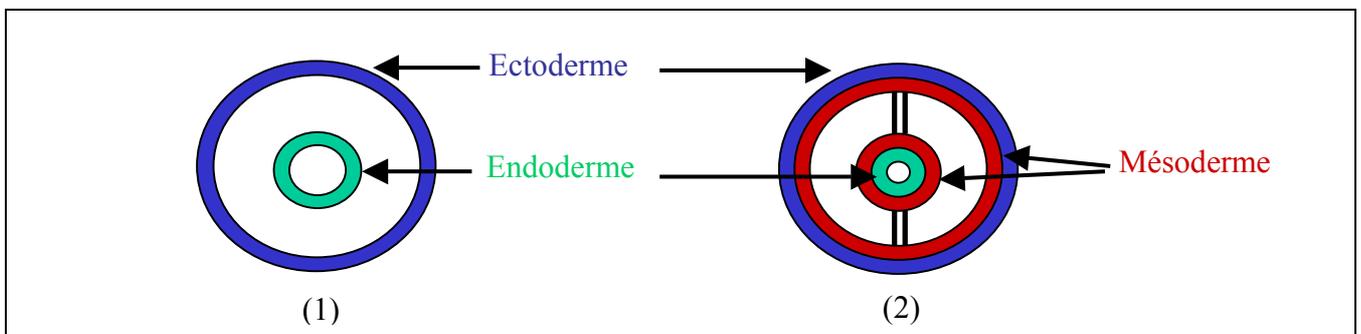


Figure 7: Métazoaires diploblastiques (1) et triploblastiques (2).

Une modification de la classification dichotomique traditionnelle (diploblastiques vs triploblastiques) a récemment été proposée par Brian Hall. Sur la base de leur homologie, les cellules de la crête neurale des vertébrés formeraient en effet selon lui un quatrième feuillet embryonnaire. Les vertébrés ne seraient donc plus triploblastiques, mais quadroblastiques (Hall, 2000).

Cette vision graduelle de l'évolution des métazoaires par l'acquisition successive de feuillets embryonnaires est, on le voit, directement inspirée de la théorie de la récapitulation de Haeckel, où les stades embryonnaires successifs sont vus comme les étapes successives de l'évolution (Haeckel, 1866).

La gastrulation commence en règle générale, par l'élaboration de l'archentéron (intestin primitif) qui s'ouvre sur le milieu extérieur par l'intermédiaire du blastopore. Cette région blastoporale donnera par la suite, soit la bouche chez les protostomiens, soit l'anus chez les deuterostomiens¹⁰.

La différenciation des feuilletts embryonnaires résulte de l'association des processus de déformation (*i.e.* extension), de prolifération et de migration cellulaire (*i.e.* convergence). Selon les combinaisons de ces différents processus, on définit classiquement plusieurs types de mouvements morphogénétiques: ingression¹¹, immigration¹², embolie ou invagination¹³, involution¹⁴, épibolie¹⁵ et délamination¹⁶.

La formation du feuillet mésodermique s'accompagne généralement de l'élaboration de la cavité coelomique. Celle-ci peut se constituer selon deux modes distincts, soit par schizocoelie (creusement du mésoderme), soit par entérocoelie (bourgeonnement de l'endo-mésoderme) (Figure 8).

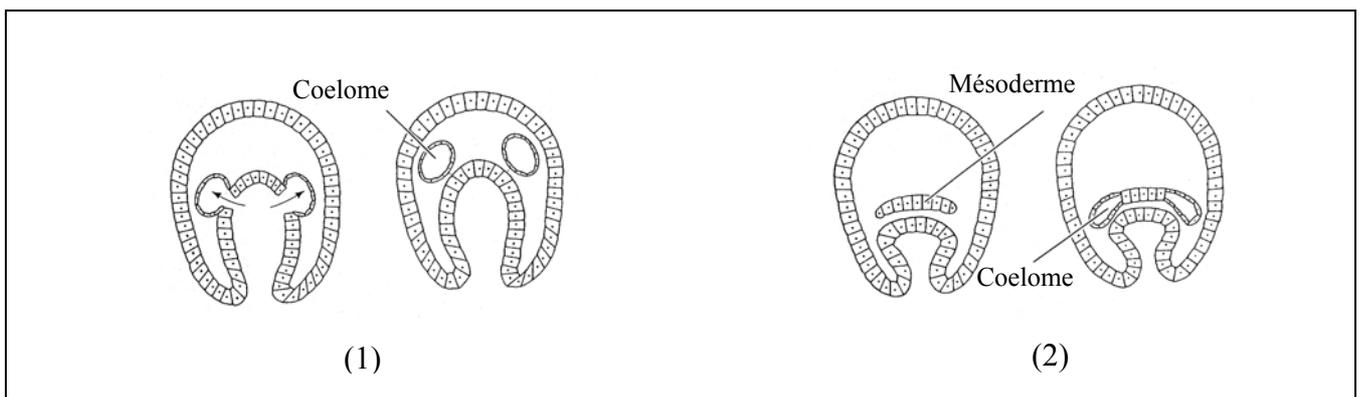


Figure 8: Formation de la cavité coelomique. (1) Par formation de vésicules à partir de l'endo-mésoderme: Entérocoelie. (2) Par creusement de la masse mésodermique: Schizocoelie (d'après Brusca, 1990).

¹⁰ Il existe au moins deux exceptions à cette règle: *Eunice* et *Viviparus* (Arendt et Nübler-Jung, 1997)

¹¹ Ingression: Prolifération cellulaire localisée à l'intérieur du blastocèle et à partir de laquelle vont s'organiser de nouvelles structures.

¹² Immigration: Dissociation des cellules de l'épithélium blastuléen suivie de leur migration à l'intérieur du blastocèle

¹³ Invagination: Mouvement d'ensemble de l'épithélium blastuléen. Provoqué par des déformations cellulaires, il est dirigé vers l'intérieur de la cavité blastocélique.

¹⁴ Involution: Prolifération cellulaire importante et déformation localisée qui aboutissent à un repliement interne de l'épithélium blastuléen. Des mouvements de convergence et d'extension vont ensuite permettre aux cellules du feuillet externe de migrer entre l'épithélium externe et la cavité du blastocèle.

¹⁵ Epibolie: Recouvrement résultant de la prolifération d'un ensemble cellulaire externe et de son extension pour recouvrir un ensemble des cellules qui se retrouvera ainsi intériorisé.

¹⁶ Délamination: Division d'un feuillet épithélial en deux feuilletts parallèles

1.4. L'organogenèse : réaliser le plan d'organisation

C'est la dernière grande étape de l'embryogenèse des *bilatéria* (Figure 1). Elle précède une histodifférenciation importante et aboutit à la formation d'organes fonctionnels. Selon que le développement est direct ou indirect, elle conduit à l'obtention d'un jeune adulte ou à l'éclosion d'une larve qui au terme d'une période de croissance subira une complète réorganisation, c'est la métamorphose.

2. Développement précoce de quelques métazoaires

Afin de donner un aperçu qui reflète un tant soit peu l'extraordinaire diversité des modes de développement utilisés pour établir les trois feuilletts embryonnaires, j'ai choisi de décrire les étapes les plus précoces de ce mécanisme chez quelques métazoaires. Les animaux présentés ici figurent parmi les principaux modèles utilisés en embryologie et représentent les trois grands groupes de la nouvelle phylogénie des métazoaires (Chapitre 1): ecdysozoaires, lophotrochozoaires et deuterostomiens.

2.1. Les ecdysozoaires

En raison de leur facilité d'élevage et de leur temps de génération relativement court¹⁷, *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* sont deux organismes qui se prêtent particulièrement bien aux études génétiques. L'utilisation des nombreux mutants disponibles et les expériences de transgénèse ont ainsi permis d'appréhender de nombreux phénomènes biologiques. Parmi ceux-ci, le contrôle génétique de la gastrulation et de la formation du mésoderme ont été particulièrement bien décrit chez la Drosophile. Chez le nématode, c'est l'utilisation de mutants, couplée à des études de lignages cellulaires qui nous permet d'appréhender un processus de gastrulation assez rudimentaire.

2.1.1. *Drosophila melanogaster* (Arthropode)

La drosophile est un insecte à longue bande germinative¹⁸ chez lequel les axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont déterminés dès la fin de l'ovogenèse (Anderson and Nusslein-Volhard, 1984).

¹⁷ 10 jours pour la Drosophile à 25°C et 3 pour le Nématode à 20°C (Wolpert et al., 1998).

¹⁸ Tous les segments de l'abdomen sont formés en même temps.

Aussitôt après sa ponte, l'œuf fécondé de drosophile subit une série de 9 divisions nucléaires rapides¹⁹ et synchrones qui aboutissent à la formation d'une structure syncytiale pluri-nucléée. Lors du 10^{ème} cycle de division, une trentaine de noyaux vont migrer au pôle postérieur de l'embryon pour constituer les cellules souche de la lignée germinale. Tout en continuant à se diviser, les autres noyaux migrent quant à eux vers la périphérie du cytoplasme, c'est le stade blastoderme syncytial. Les 13^{ème} et 14^{ème} divisions voient le début de la transcription zygotique (13^{ème}) ainsi que la cellularisation du blastoderme (14^{ème}) par invagination de la membrane plasmique. Trois heures après la fécondation (à 25°C), l'embryon est donc constitué d'une couche externe d'environ 8000 cellules entourant le vitellus, c'est le blastoderme cellulaire (*periblastula*) (Foe et al., 1993).

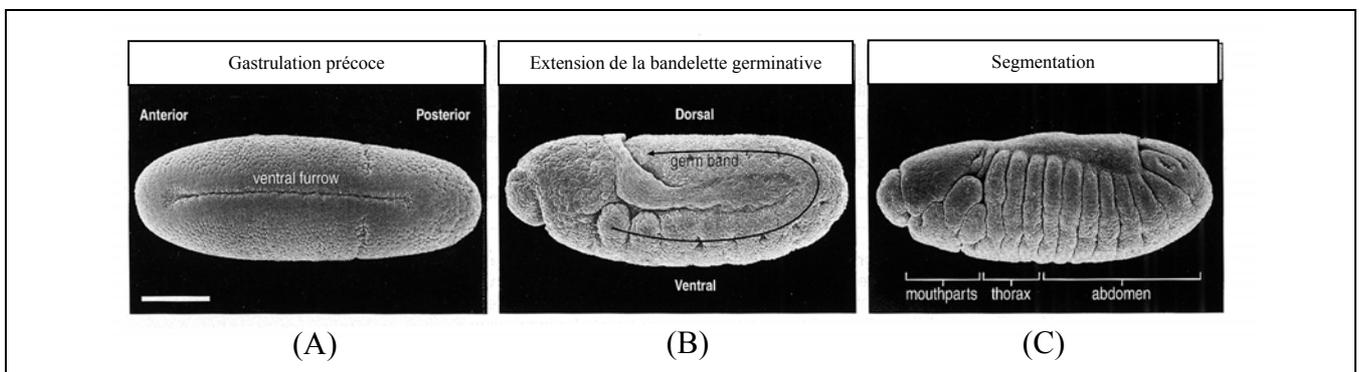


Figure 9: Stades du développement précoce de *Drosophila melanogaster* (d'après Wolpert, 1998).

La gastrulation est concomitante à la cellularisation du blastoderme et commence par la formation du sillon longitudinal ventral (Costa et al., 1993) (Figure 9A). Large d'une vingtaine de cellules environ, il se forme par déformation, puis par invagination des cellules les plus ventrales (Leptin, 1995; Leptin, 1999; Leptin and Grunewald, 1990).



Figure 10: Formation du mésoderme. Expression de la protéine Twist dans les cellules mésodermiques (d'après Leptin, 1992).

¹⁹ Une division toutes les 8 à 10 minutes.

Lors de la fermeture du sillon ventral, les cellules invaginées perdent alors leur caractère épithélial pour s'étaler en une couche de cellules mésodermiques située au-dessus de l'ectoderme ventral (Figure 10) (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997).

Parallèlement à celle du mésoderme, l'invagination des cellules antérieures et postérieures au sillon ventral va conduire à la formation de l'endoderme. Peu de temps après le début de la gastrulation, la bandelette germinative s'étend postérieurement, grâce à d'importants réarrangements cellulaires (Figure 9B). Les premiers signes visibles de la segmentation du mésoderme et de l'endoderme apparaissent sous la forme d'une série de sillons régulièrement espacés et délimitant les parasegments. L'organogénèse commence lorsque l'élongation est maximale. On assiste alors à la ségrégation des cellules imaginables²⁰ ainsi qu'à la migration de certaines cellules de l'ectoderme qui constitueront une couche cellulaire neurogénique située entre le mésoderme et l'ectoderme (neuroblastes). Par la suite, la bandelette germinative se rétracte, remplaçant les parasegments les plus postérieurs au niveau du pôle postérieur de l'embryon. C'est également à ce moment qu'a lieu la fusion des régions endodermiques antérieures et postérieures. Les parasegments cessent alors d'être apparents pour laisser la place à de véritables segments (Figure 9C). On considère généralement à ce stade que la gastrulation est terminée et que le mésoderme est segmenté selon l'axe antéro-postérieur (Azpiazu et al., 1996; Riechmann et al., 1997)

2.1.2. *Caenorhabditis elegans* (Nématode)

Le lignage cellulaire est invariant chez le nématode. Bien que son développement soit généralement considéré comme "mosaïque", les interactions cellulaires sont également importantes et contribuent à spécifier les différents types cellulaires (Wiegner and Schierenberg, 1999). Le clivage est holoblastique, rotationnel et se caractérise par une première division longitudinale inégale qui divise l'œuf en un large blastomère antérieur AB et en un petit blastomère postérieur P1 (Figure 11B).

Cette asymétrie contribue à définir l'axe antéro-postérieur de l'embryon. La division de AB est longitudinale et donne deux blastomères de même taille, ABa (antérieur) et ABp (postérieur). La division de P1 est décalée dans le temps. Asymétrique et latitudinale, elle donne un gros blastomère EMS et un petit blastomère P2 (Figure 11C). De part sa position ventrale, EMS contribue à définir l'axe dorso-ventral. Les deux divisions suivantes conduiront à définir l'axe droite-gauche (3^{ième}

²⁰ Cellules réservées (disques imaginaires et cellules histoblastiques) qui contribueront exclusivement à la formation de l'animal adulte.

division) ainsi qu'à mettre en place les cellules fondatrices : AB, C, D, E, MS et la cellule germinale P4 (Figure 11) (Schierenberg and Strome, 1992).

Chez *C. elegans*, la gastrulation se superpose au clivage et commence environ 100 minutes après la fécondation (stade 24/28 cellules). On remarque l'existence d'une cavité blastocélique rudimentaire à ce stade (*sterroblastula*) (figure 11E).

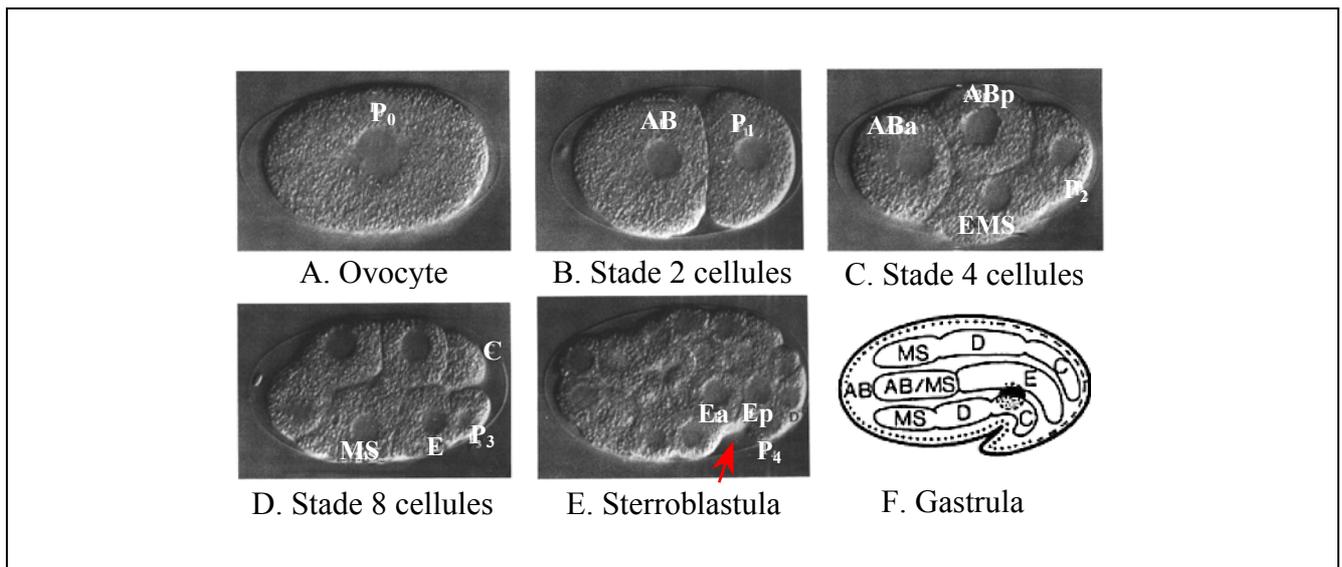


Figure 11: Clivage et segmentation chez le nématode. La position du blastocèle est représentée par une flèche (E). (d'après Schierenberg et al., 1986; Schierenberg et al., 1992).

Le premier mouvement de la gastrulation consiste en l'ingression de deux cellules (Ea et Ep) issues du blastomère E (endoderme), et situées initialement en position postéro-ventrale (Figure 11E). Plus tard, lorsque l'embryon est formé d'environ 100 cellules, ce mouvement se poursuit ventralement par la pénétration de 2 cellules provenant de P4 (lignée germinale) et des 8 blastomères issus de MS (mésoderme). Enfin les cellules issues de C, D, et AB pénètrent dans un sillon ventral qui se forme au bout de 4/5 heures après le début du clivage. La gastrulation est considérée comme achevée à la 6^{ème} heure (stade 550 cellules). Dans la partie postérieure, les cellules descendantes de MS, C et D (mésoderme) sont alors disposées latéralement de part et d'autre de l'ébauche du tube digestif (descendants de E) et du pharynx (descendants de AB et MS). Enfin, l'hypoderme et les précurseurs neuraux (descendants de AB et C) recouvrent l'ensemble de l'embryon (figure 11F). On considère généralement cette disposition cellulaire comme l'esquisse d'une organisation triploblastique rudimentaire (Bucher and Seydoux, 1994; Schierenberg, 1997).

2.2. Les lophotrochozoaires

Aucuns des systèmes modèles classiquement utilisés en biologie n'appartenant à ce groupe de métazoaires, j'ai donc choisi de présenter uniquement le développement de l'organisme sur lequel a porté mon travail de thèse, *Patella vulgata*²¹.

2.2.1. *Patella vulgata* (Mollusque)

Le clivage de *Patella vulgata* est égal et invariant. Dès la seconde division le mode spiral du clivage est évident. En-effet, le fuseau de division est légèrement incliné par rapport au plan équatorial de l'embryon. L'une des extrémités du fuseau de division est située légèrement au-dessus du plan équatorial, l'autre légèrement en dessous. La conséquence est que, dès ce stade, les quatre blastomères définissant les quatre quadrants de l'embryon (A, B, C et D) ne sont pas situés dans le même plan. Les blastomères A et C se contactent au niveau du pôle animal pour former le sillon polaire animal, les blastomères B et D sont positionnés légèrement en-dessous et forment le sillon polaire végétatif (Figure 12A).

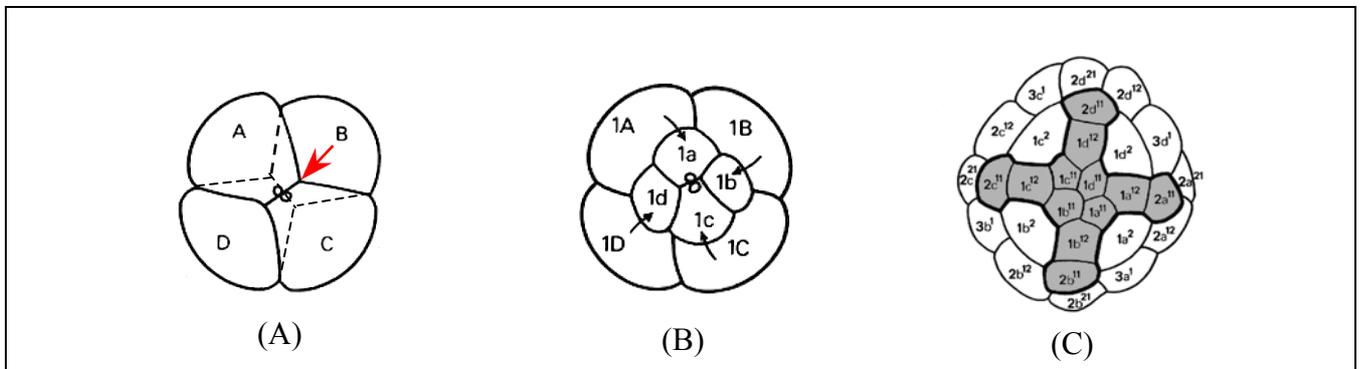


Figure 12: Clivage des mollusques vu du pôle animal. (A) Sillon polaire animal (flèche rouge). (B) Rotation des micromères. (C) La croix des mollusques (d'après Verdonk et van den Biggelaar, 1983).

Par la suite, les divisions seront alternativement dextres (fuseaux orientés vers la droite) et senestres (fuseaux orientés vers la gauche) (Guerrier, 1970; Kofoid, 1894). La troisième division est latitudinale, dextre et aboutit à la formation du premier quartet de micromères animaux (1m)²² dont la descendance sera à l'origine d'une structure caractéristique dite " croix des mollusques" (Figure 12C). Du fait du clivage spiral, les micromères 1m sont légèrement déplacés (sens des aiguilles d'une montre) par

²¹ Sur les raisons de ce choix, se reporter au chapitre 4, page 66.

²² (m) représente indistinctement les quadrants a,b,c ou d. La nomenclature utilisée est celle définie par Conklin (Conklin, 1897).

rapport aux quatre macromères végétatifs (1M) (Figure 12B). La division suivante voit la division des micromères 1m en une rangée supérieure de micromères animaux $1m^1$ et en une rangée inférieure de micromères $1m^2$ à l'origine des trochoblastes primaires (Figure 13).

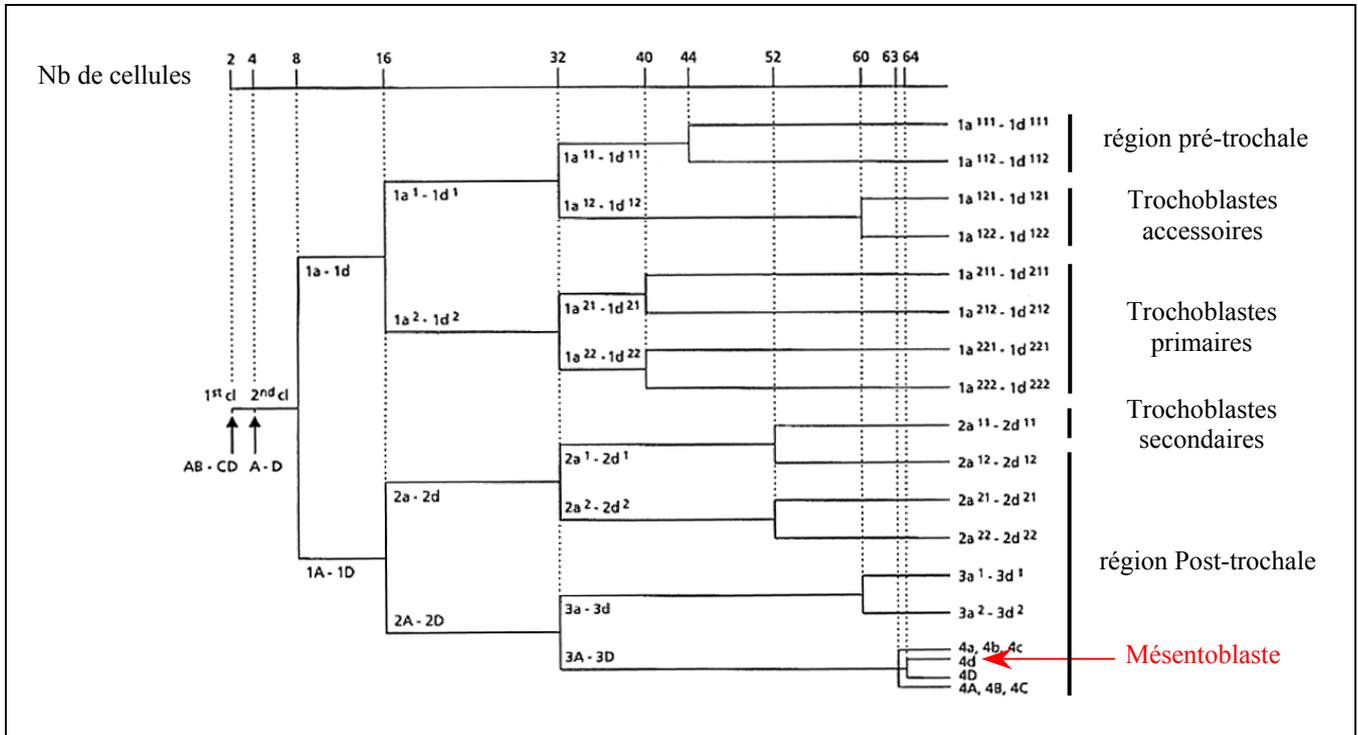


Figure 13: Lignage cellulaire de *Patella vulgata* (d'après Damen et al., 1994 et van den Biggelaar, 1996).

Les macromères 1M se divisent en un deuxième quartet de micromères 2m et en macromères 2M. La cinquième division est la dernière division synchrone. Elle voit la division des macromères 2M en macromères 3M végétatifs et en un troisième quartet de micromères 3m. Les micromères 2m se divisent en deux rangées supérieure $2m^1$ et inférieure $2m^2$ de micromères. Les micromères $1m^2$ se divisent en deux rangées de cellules mères des trochoblastes primaires, $1m^{21}$ supérieurs et $1m^{22}$ inférieurs. Enfin, les micromères animaux $1m^1$ se divisent en quatre cellules apicales situées au pôle animal $1m^{11}$ et en quatre cellules situées en position plus basales à l'origine des trochoblastes accessoires, $1m^{12}$ (Damen, 1994; Damen and Dictus, 1994; Damen and Dictus, 1994). On observe par la suite un net ralentissement du rythme des divisions et le début d'une asynchronie à partir de la 6^{ème} division. Les premières cellules à se diviser à ce stade sont les trochoblastes $1m^{21}$ et $1m^{22}$ qui donneront respectivement les trochoblastes primaires $1m^{211}$, $1m^{212}$, $1m^{221}$ et $1m^{222}$. Ces cellules arrêteront de se diviser et se différencieront par la suite en cellules ciliées. A ce stade, l'embryon est constitué de 40 cellules et possède une symétrie axiale définie par l'axe animal-végétatif. On assiste alors à l'internalisation des quatre macromères (3M) dans la cavité blastocélique. Un des deux

macromères constituant le sillon polaire végétatif va rester en contact avec les micromères du premier quartet et va subir une induction (Figure 14). Le quadrant D adopte alors un comportement différent des trois autres et va définir la face dorsale de l'embryon (van den Biggelaar, 1977).

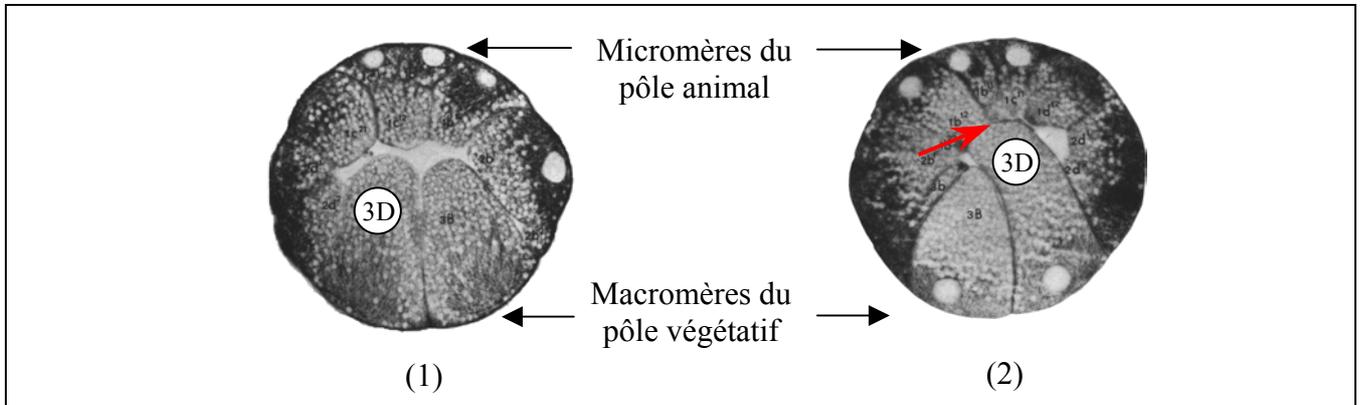


Figure 14: Stade 32 cellules, induction du macromère 3D. (1) 30 minutes (2) 70 minutes. Le contact entre 3D et les micromères animaux est représenté par un flèche (d'après van den Biggelaar, 1977).

C'est le premier signe visible de la rupture de la symétrie quadri-radiale de l'embryon et de l'établissement de la symétrie bilatérale (van den Biggelaar, 1977; van den Biggelaar et Guerrier, 1979). Ce macromère central sera le dernier à se diviser lors du passage du stade 63 vers 64 cellules pour donner le macromère 4D ainsi que la cellule souche de l'endomésoderme, le mésentoblaste 4d (van den Biggelaar, 1977).

La suite du développement telle qu'elle est décrite ci-dessous est un compromis entre une description récente d'une partie du développement de *Patella vulgata* (Damen, 1994) et des observations réalisées sur des stades plus tardifs d'autres espèces de gastéropodes (Verdonk and van den Biggelaar, 1983).

La gastrulation commence quand l'embryon possède un petit nombre de cellules (64 cellules). L'archentéron se forme par invagination des cellules végétatives centrales, les macromères (5M) sont alors situés au sommet de l'archentéron et les micromères du cinquième quartet (5m) sur les côtés. Au début de la gastrulation, le blastopore est très large mais se rétrécit progressivement en rapprochant ses lèvres latérales. Il finira par se clore quasiment, à l'exception d'une petite ouverture antérieure encadrée par les micromères dérivés de 2b, 2d, 3c et 3d (Damen, 1994). Du fait de la migration dorsale des dérivés des micromères 2a, 2b et 2c et de la migration ventrale des dérivés de 2d, le blastopore initialement situé au pôle végétatif va se déplacer antérieurement sur la face ventrale (Morrill, 1997). L'ectoderme s'invagine alors pour former le stomodeum à l'origine de la cavité buccale, du pharynx et de l'œsophage. Le blastopore devient la bouche et l'anus se développera plus tard en un point indiqué

par les cellules anales situées au niveau postérieur de la lèvre blastoporale. Un proctodéum très court s'invagine et la partie postérieure de l'intestin se forme à partir de l'ectoderme.

A ce stade du développement, l'ectoderme est divisé par la prototroche (une bande ciliée constituée des trochoblastes) en une région prétrachale et une région posttrachale. La région prétrachale donnera la plaque céphalique et se forme à partir du premier quartet de micromères ($1m^1$). La région posttrachale est quand à elle formée des deuxièmes ($2m$) et troisièmes ($3m$) quartet de micromères et consitue pour l'essentiel la plaque somatique (glande coquillière et tissus précurseurs du pied) (Dictus and Damen, 1997).

Le mésoderme peut être subdivisé en endo- et ectomésoderme, ces deux types de mésoderme formant à la fois des structures larvaires et adultes. L'ectomésoderme se développe à partir des cellules des 2^{ème} et 3^{ème} quartet de micromères ($2b$, $3a$ et $3b$) (Damen, 1994). Ces cellules situées tout d'abord en surface vont migrer dans le blastocèle, où elle vont se mutiplier par des divisions répétées et vont rejoindre les cellules de l'endomésoderme. Ce dernier se forme à partir du mésentoblaste $4d$. Celui-ci s'enfonce dans le blastocèle et se divise en deux cellules de taille égale $4d^1$ (Mr) et $4d^2$ (MI) situées respectivement à droite et à gauche de la ligne dorsale médiane. Les deux mésentoblastes vont ensuite produire des enteroblastes avant de devenir de vrais téloblastes mésodermiques (Wierzejski, 1905). Ces téloblastes sont situés de part et d'autre de la face dorsale de l'archentéron et vont bourgeonner en petites cellules vers l'avant pour produire les bandelettes mésodermiques. Celles-ci vont croître par addition de nouvelles cellules à leur extrémité postérieure et par division des cellules déjà formées à leur extrémité antérieure. Le mésoderme va alors envelopper progressivement l'archentéron comme un fer à cheval (Figure 15) (Verdonk and van den Biggelaar, 1983).

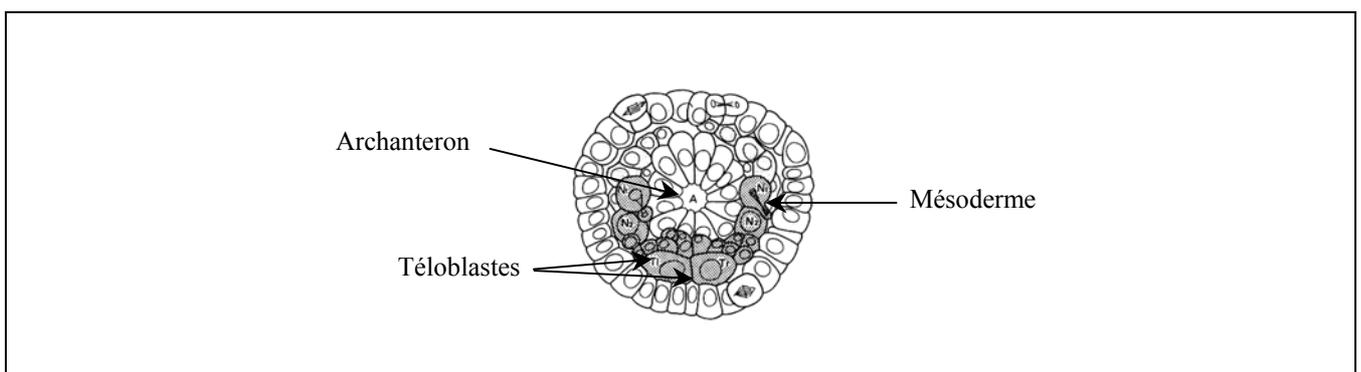


Figure 15: Disposition du mésoderme chez *Physa fontinalis*. Coupe sagittale, vue du pôle végétatif (d'après Wierzejski, 1905 et Verdonk et van den Biggelaar, 1983).

2.3. Les deutérostomiens

Si dans ce groupe les systèmes modèles les plus connus appartiennent tous au phylum des vertébrés: Xénope, Danio, Poulet et Souris. Les deutérostomiens ne se limitent cependant pas aux seuls vertébrés (Chapitre 1). En plus des modèles vertébrés classiques, je présenterai donc également trois modèles deutérostomiens un peu moins connus: Oursin (échinodermes), Ascidie (urochordés) et Amphioxus (céphalochordés).

Parmi ces sept modèles, seul le Danio et la Souris permettent une approche génétique par mutagenèse comparable à ce qui existe chez la Drosophile et le Nématode. Le Danio possède en outre l'avantage de produire des embryons totalement transparents, ce qui facilite grandement l'observation des différentes étapes de son ontogenèse. Chez la souris en revanche, l'étude de la gastrulation est compliquée en raison de son développement interne, de la petite taille de l'embryon et de la présence de nombreuses annexes embryonnaires. L'utilisation de ces deux modèles est cependant assez récente et historiquement les modèles classiquement utilisés par les embryologistes pour l'étude de la gastrulation sont plutôt le Xénope et le Poulet. Tous deux présentent en effet l'avantage de produire en grande quantité des embryons de grande taille et facilement accessibles. Ils sont donc surtout utilisés pour des expériences de microchirurgie et de lignage cellulaire. Bien qu'il demeure peu utilisé par les généticiens, l'oursin est également un modèle classique de l'embryologie et la gastrulation est relativement facile à suivre chez cet animal. Enfin, le développement de l'ascidie et de l'amphioxus possède de nombreux points communs avec celui des vertébrés (*i.e.* corde neurale) mais les lignages cellulaires restent cependant beaucoup plus simples à suivre du fait d'un bien plus petit nombre de cellules. Leur plan d'organisation est en outre beaucoup plus simple que celui des vertébrés, ce qui facilite les comparaisons protostomiens / deutérostomiens.

2.3.1. *Paracentrotus lividus* (Echinoderme)

Chez cette espèce, d'importants remaniements cytoplasmiques se produisent après la fécondation. Le clivage radiaire à symétrie axiale est stéréotypé et devient inégal à partir de la quatrième division. La gastrulation est assez classique sans que l'on puisse cependant observer de véritable organisation en feuillets embryonnaires. Les plans des deux premières divisions sont longitudinaux et perpendiculaires. Le troisième plan de division est équatorial et à l'origine de 4 blastomères animaux et de 4 blastomères végétatifs (Figure 16).

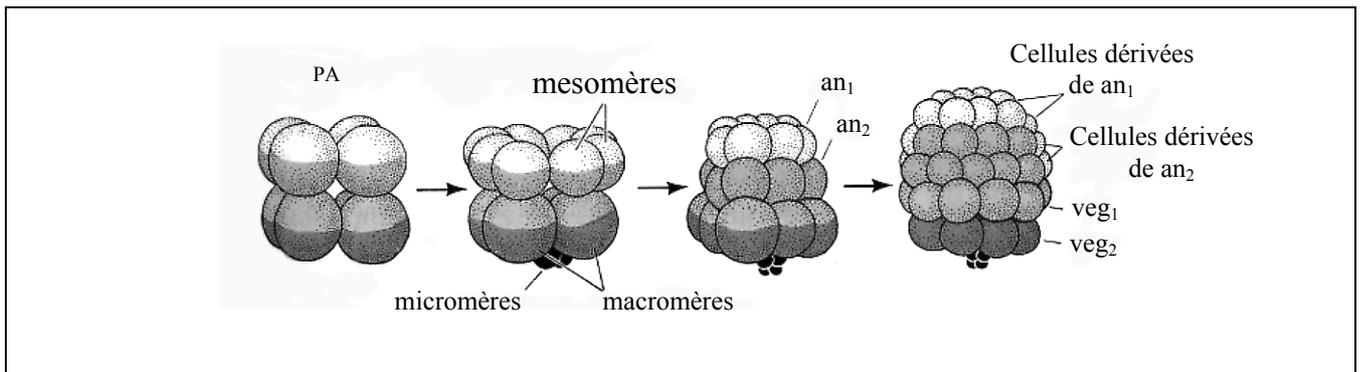


Figure 16: Premières étapes du clivage chez l'oursin (d'après Gilbert, 1997)

Le blastocèle commence dès lors à se creuser et les blastomères acquièrent une organisation épithéliale dont la lame basale est dirigée vers la cavité intérieure du blastocèle. Le pôle apical de cet épithélium se différencie tout d'abord par des microvillosités, puis par une ciliature permettant à la larve de nager. Lors du 4^{ème} cycle de division, les 4 blastomères animaux donnent 8 mésomères par division longitudinale (figure 16). Les 4 blastomères végétatifs subissent une division latitudinale très inégale pour donner 4 grands macromères et 4 petits micromères situés au pôle végétatif. Au cours du cycle suivant, on assiste à une inversion des plans de division. Les 8 mésomères se divisent en effet latitudinalement pour donner naissance à 2 octets superposés de blastomères de même taille (an1 et an2). Les 4 macromères subissent chacun une division longitudinale pour former 8 macromères de taille identique. Les 4 micromères donnent 8 micromères végétaux de tailles différentes (4 gros et 4 petits micromères). Par la suite, seuls les macromères subissent une division latitudinale aboutissant à la formation de deux couronnes de 8 macromères superposés (veg1 et veg2), tous les autres blastomères subissent une division longitudinale (Figure 16).

A partir du stade 128 cellules, l'asynchronie des divisions se met ensuite progressivement en place et les inégalités de tailles entre les blastomères s'atténuent.

Environ 6H après la fécondation, l'embryon est constitué d'un millier de cellules et le rythme des divisions se ralentit. C'est le début de la transcription zygotique qui annonce la gastrulation. Une touffe ciliaire apicale apparaît alors au pôle animal et la région végétative s'aplatie pour former la plaque végétative. La migration vers l'intérieur du blastocèle de cellules appartenant à la population des micromères les plus gros marque le début de la gastrulation (Figure 17A et B).

Ces cellules constituent le mésenchyme primaire qui sera à l'origine des éléments squelettiques larvaires. Les cellules restantes de la plaque végétative (veg2) ainsi que quelques micromères n'ayant pas encore migré dans le blastocèle, s'invaginent alors en entraînant la formation d'un tube

correspondant à l'archentéron et dont l'une des extrémités reste ouverte sur l'extérieur par le blastopore qui constituera le futur anus. Ce mouvement d'invagination s'accompagne de l'involution d'un petit nombre de cellules au niveau de la lèvre du blastopore (Ettensohn, 1999) (Figure 17C et D).

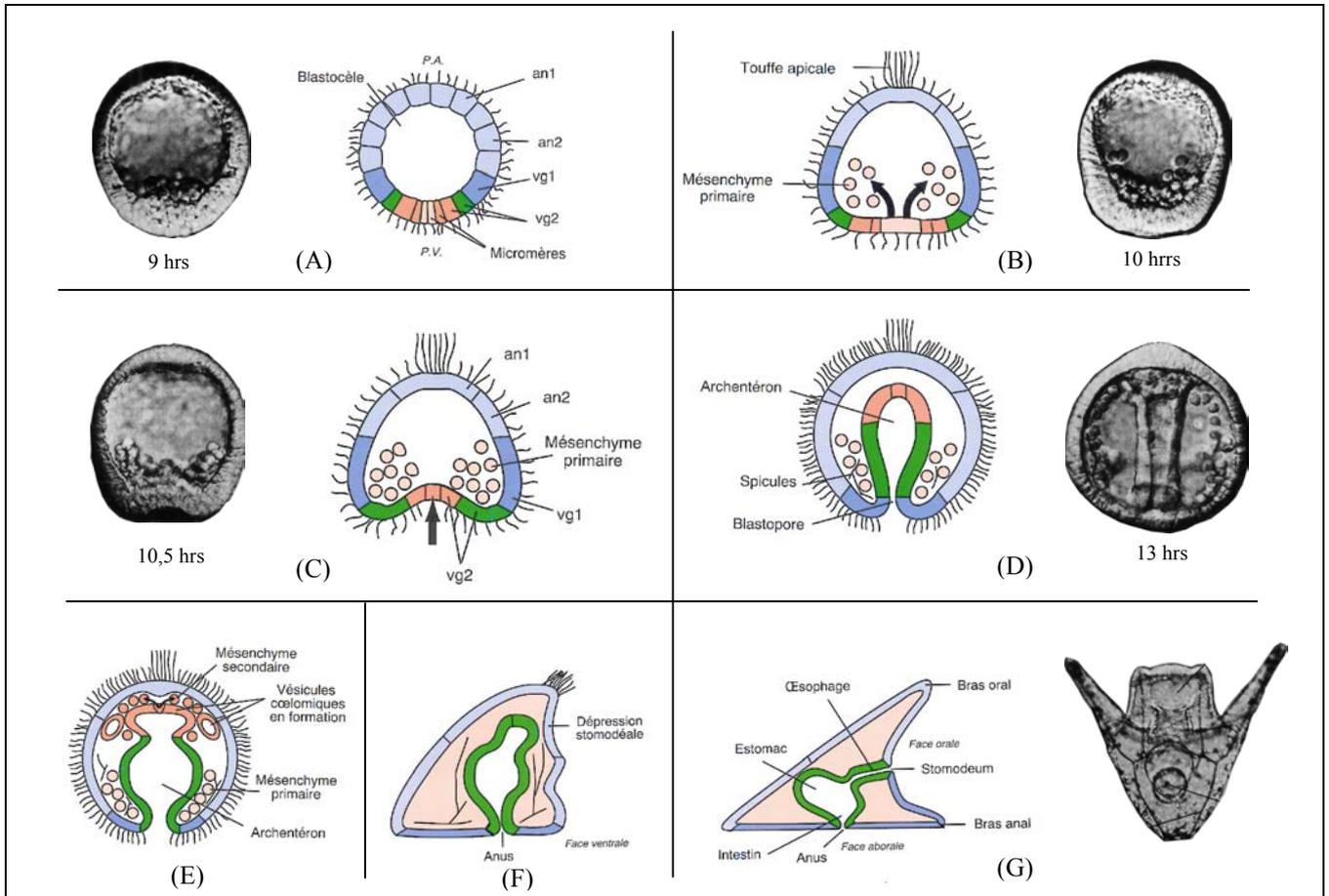


Figure 17: La gastrulation chez l'oursin (d'après Gilbert, 1997; Foucrier, 1999)

Par la suite, la paroi du sommet animal de l'archentéron bourgeonne pour former le mésenchyme secondaire à l'origine des dérivés coelomiques (Figure 17E). A ce stade et bien que le mésoderme soit fragmenté en mésenchyme primaire et secondaire, la gastrulation est considérée comme achevée. Au cours de l'individualisation du mésenchyme secondaire, les premiers signes d'une symétrie bilatérale apparaissent. Ils se caractérisent notamment par un aplatissement latéral de la future région ventrale de la larve (Figure 17F). C'est également sur cette face ventrale que se forme la dépression stomodéale, au niveau de laquelle se percera la bouche. L'ouverture buccale se faisant au point de contact entre l'archentéron et la face ventrale de l'embryon (Wray, 1997) (Figure 17G).

La larve *pluteus* d'oursin subira par la suite une profonde métamorphose. L'organisme adulte dérivant d'un petit nombre de cellules réservées (le rudiment). La symétrie bilatérale de la larve fera alors place à la symétrie penta-radiaire de l'adulte.

2.3.2. *Halocynthia roretzi* (Urochordé)

Sitôt après la fécondation, le cytoplasme de l'embryon subit de profonds réarrangements pour s'organiser en myoplasme, ectoplasme et endoplasme selon un gradient végétatif-animal. Dans une seconde phase, le myoplasme se déplace de nouveau pour former un croissant sur l'un des côtés de l'œuf et l'ectoplasme se déplace vers la zone équatoriale pour finir en position animale (Nishida, 1994). A l'issue de cette ségrégation ooplasmique, l'embryon présente déjà une symétrie bilatérale : l'axe dorso-ventral étant confondu avec l'axe animal-végétatif, la partie végétative devenant la partie dorsale. L'axe antéro-postérieur est perpendiculaire au précédent, le myoplasme définissant la partie postérieure (Figure 18A).

Le clivage commence environ une heure après la fécondation. Il est invariant et possède une symétrie bilatérale. Les deux premières divisions produisent 4 blastomères de taille identique²³ : A3 (antérieur gauche), A3 (antérieur droit), B3 (postérieur gauche) et B3 (postérieur droit). A l'exception du myoplasme confiné aux blastomères B3 et B3, les deux autres plasmes sont répartis sur les quatre blastomères. Le troisième plan de clivage est latitudinal et coupe l'embryon en 4 blastomères animaux, légèrement décalés du côté antérieur, et en 4 blastomères végétatifs (Figure 18B).

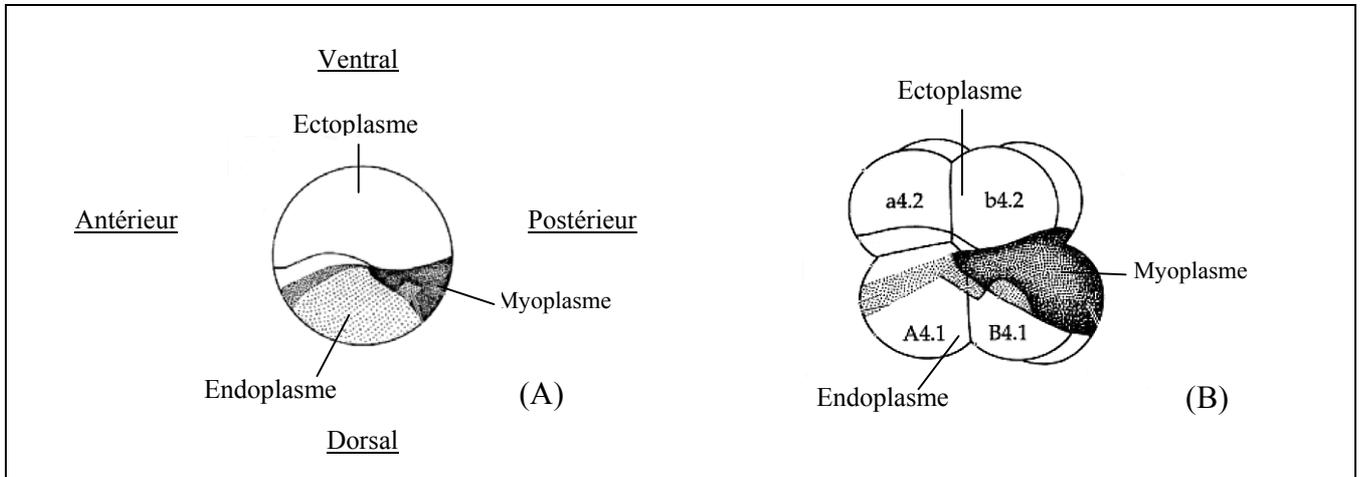


Figure 18: Réorganisation cytoplasmique et clivage de l'œuf d'ascidie. (A) Réorganisation cytoplasmique après la fécondation. (B) Stade 4 cellules (d'après Jeffery et Swalla, 1997)

Le myoplasme est alors restreint aux blastomères B4.1 et B4.1, l'endoplasme aux quatre blastomères végétaux (B4.1, A4.1, B4.1, A4.1) et l'ectoplasme aux blastomères animaux (a4.2, b4.2, a4.2, b4.2). A partir du cinquième cycle de division une certaine asynchronie se manifeste. Au stade 64 cellules, l'ectoplasme est localisé dans les blastomères animaux, l'endoplasme et le myoplasme dans les

²³ Les noms des blastomères animaux sont en caractères minuscules, ceux situés sur le côté droit sont soulignés. Le premier chiffre indique la génération cellulaire, le second le nombre de cellules dans chaque quadrant (Conklin, 1905).

blastomères végétatifs. La segmentation se poursuit jusqu'au stade 110 cellules où débute la gastrulation. A ce stade, la blastula est dépourvue de blastocèle.

La gastrulation commence par une invagination de l'endoderme végétatif qui s'accompagne d'une migration antérieure des cellules invaginées. Le blastopore est entouré des cellules à l'origine du mésoderme. Les cellules précurseurs de la corde neurale sont situées sur sa lèvre antérieure, les précurseurs du mésenchyme sur ses lèvres latérales et les cellules à l'origine des muscles sur sa lèvre postérieure. La seconde étape de la gastrulation consiste en l'involution du mésoderme de la lèvre antérieure du blastopore (corde neurale). Cette involution s'étend progressivement vers la lèvre postérieure (muscles) jusqu'à ce que le mésoderme soit complètement internalisé. Initiée sur la face antérieure, l'épibolie de l'ectoderme progresse alors en direction du pôle végétatif tout en s'étendant vers la face postérieure de l'embryon. A la fin de la gastrulation, la surface de l'embryon est recouverte d'ectoderme et celui-ci s'allonge alors selon l'axe antéro-postérieur. Cette extension s'accompagne d'une migration des cellules de l'endoderme vers le pôle antérieur et des cellules du mésoderme vers le pôle postérieur.

La gastrulation est suivie par la neurulation c'est à dire la formation du neural tube à l'origine du système nerveux central. Il se formera sur la face dorsale par repliement puis par fermeture de la plaque neurale. La partie antérieure du tube neural donnera le cerveau et la partie postérieure la moelle épinière. Par la suite, l'élongation de la corde neurale ainsi que la différenciation des muscles contribueront à former la queue de l'animal (Jeffery and Swalla, 1997).

2.3.3. *Branchistoma floridae* (Céphalochordé)

Bien qu'on ne distingue pas de ségrégation ooplasmique importante après l'entrée du spermatozoïde, un certain nombre de granules s'accumulent cependant au pôle végétatif dans une zone dépourvue de cytoplasme.

Le clivage est radiaire à symétrie axiale et les divisions successives sont synchrones jusqu'à la 7^{ième} division (128 cellules). La troisième division est latitudinale et coupe l'embryon en un quartet animal dont les blastomères sont d'une taille légèrement inférieure au quartet végétatif. La division suivante (4^{ième}) est méridienne et produit 1 premier octet de blastomères animaux et un second de blastomères végétatifs. La division suivante est latitudinale et donne 4 octets appelés respectivement an1, an2, veg1 et veg2 (Figure 19A). Il n'y a quasiment pas de différence de taille entre les différents blastomères à ce stade (32 cellules). Au stade 64 cellules, se forme une cavité blastocélique qui s'agrandira au cours des stades 128 et 256 (Figure 19B).

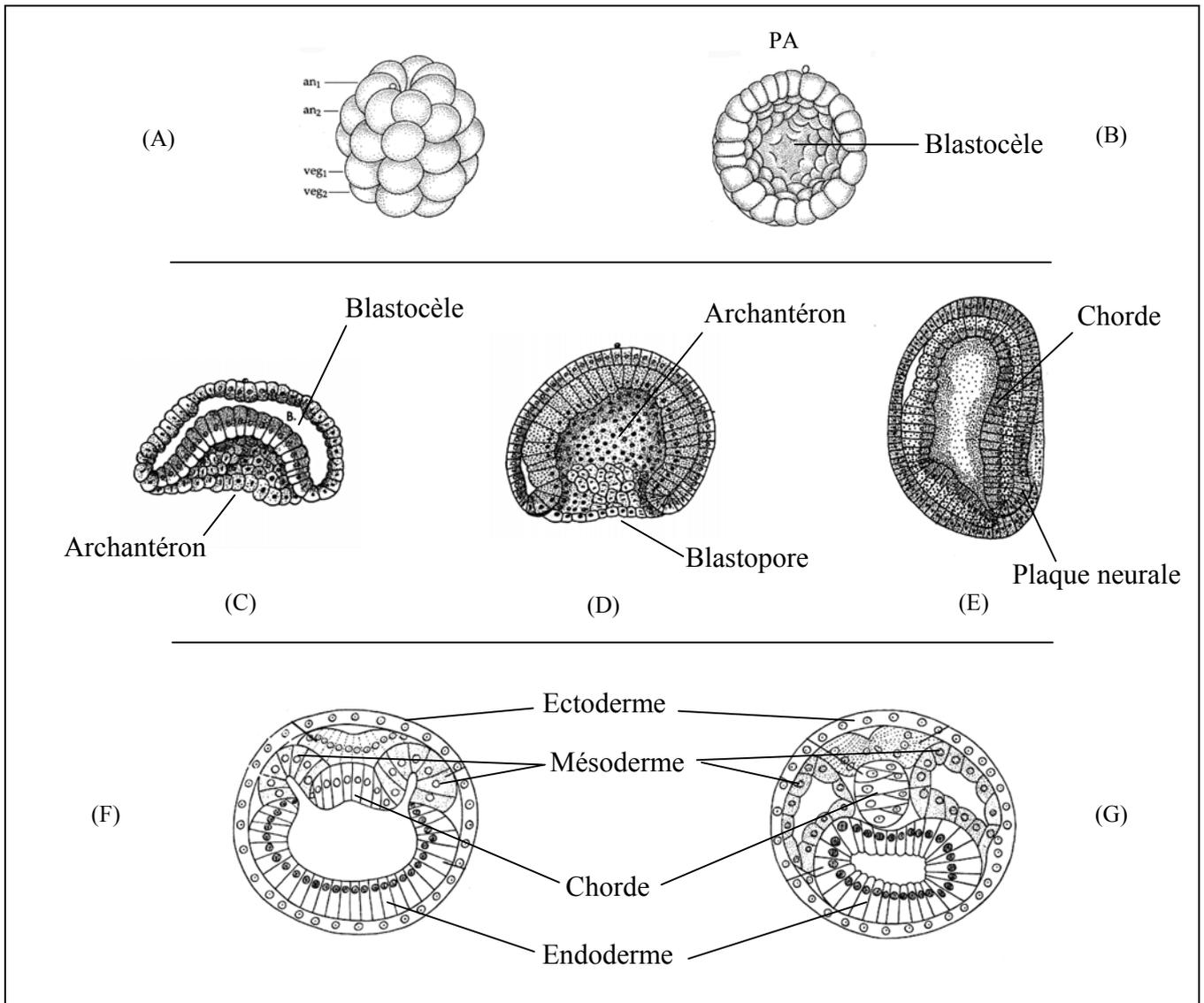


Figure 19: Gastrulation et formation du mésoderme chez l'amphioxus (d'après Gallien, 1979 et Whittaker, 1997)

Au début de la gastrulation, on observe l'aplatissement de la zone végétative en une plaque endodermique. L'invagination de cette plaque va supprimer la cavité du blastocèle pour laisser la place à un archentéron très profond qui s'ouvre sur l'extérieur par un large blastopore (Figure 19C et D). Les cellules de la lèvre dorsale du blastopore constituent les précurseurs de la chorde neurale (Figure 19E) tandis que celles des lèvres latérales formeront le mésoderme. Au terme d'un mouvement progressif d'enroulement ces cellules vont être internalisées. La chorde neurale constituant une bandelette de cellules située dorsalement et bordée de chaque côté d'un sillon mésodermique (Figure 19F et G).

La bande ectodermique située au-dessus de la chorde deviendra par la suite la plaque neurale. A la fin de la gastrulation, l'embryon devient ovoïde et s'aplati, une lame ectodermique recouvre alors progressivement le blastopore postéro-dorsal et glisse au-dessus de la plaque neurale, masquant le

creusement puis la fermeture de la plaque neurale. Au cours de la neurulation, le mode de formation des somites reste une curiosité. En-effet, les somites les plus antérieurs se forment par entérocélie alors que les somites postérieurs se forment par schizocélie (Gallien, 1979; Whittaker, 1997).

2.3.4. *Danio rerio* (Vertébré)

Peu de temps après la fécondation, l'embryon subit une série de contractions aboutissant à concentrer le cytoplasme dépourvu de vitellus au pôle animal pour former le blastodisque (Figure 20A). Le clivage est méroblastique et les divisions se restreindront par la suite au blastodisque animal. On parle alors de clivage discoïdal.

Le clivage est stéréotypé et les 6 premières divisions sont synchrones. La première division commence environ 40 minutes après la fécondation, elle est méridienne et divise le blastodisque en deux blastomères de taille identique (Figure 20B). La seconde division est également méridienne, mais à angle droit de la première (Figure 20C). Les plans de division du troisième cycle de division étant parallèles à celui de la première, on obtient 2 rangées de 4 blastomères (Figure 20D).

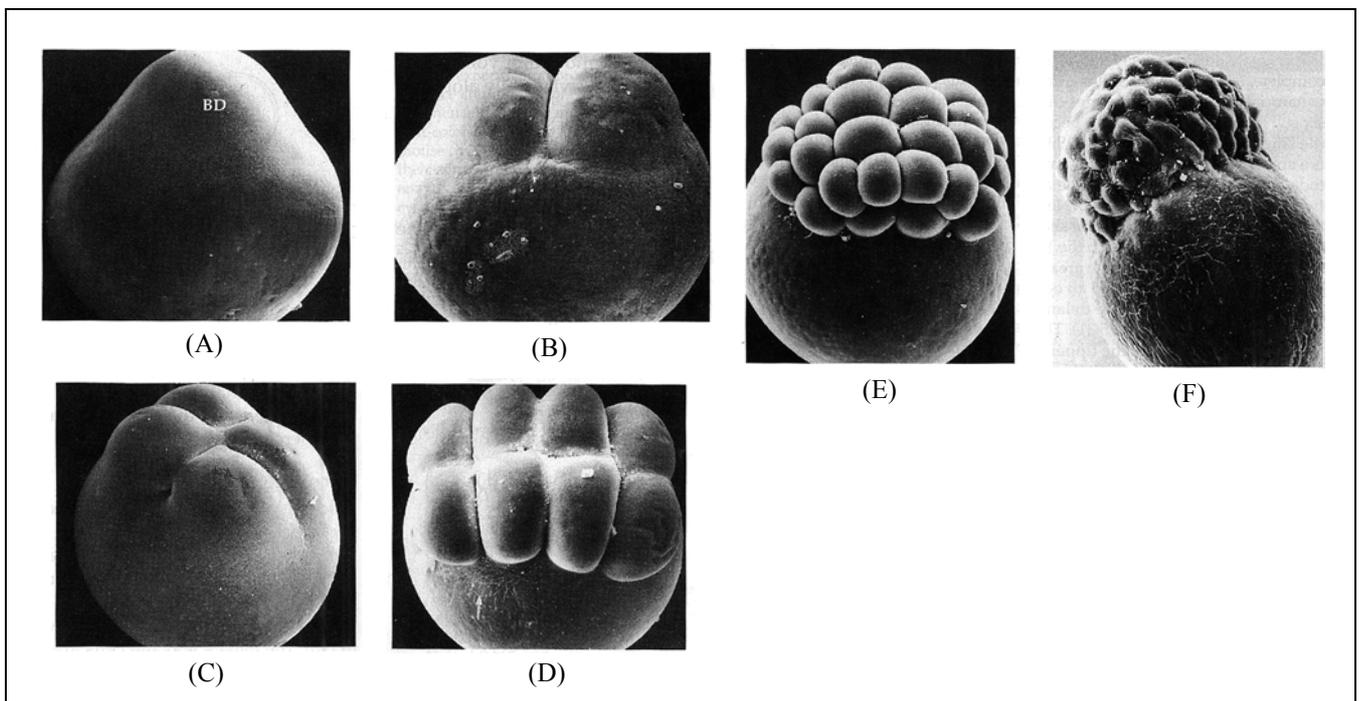


Figure 20: Clivage chez le Danio (D'après Gilbert, 1997)

De la même manière, les plans de division du quatrième cycle de division sont parallèles à celui de la seconde division, pour aboutir à un ensemble constitué de 4x4 blastomères (Figure 20E). A ce stade, seuls les 4 blastomères centraux sont isolés du vitellus, les 12 blastomères latéraux (marginaux) restent

en contact avec le vitellus. Au cours des divisions successives, les cellules filles des blastomères marginaux conserveront des contacts cytoplasmiques avec le vitellus, alors que les cellules filles des blastomères centraux continueront à être isolées (Figure 20F). Les plans de division du cinquième cycle sont de nouveau parallèles au premier. Le 6^{ème} cycle de division est le premier à être équatorial et partage les blastomères en deux couches de blastomères superposés. Tous ceux de la couche supérieure, ainsi que les blastomères marginaux de la couche inférieure constituent la couche enveloppante. Les 4 blastomères centraux de la couche inférieure forment les cellules profondes.

Au delà du sixième cycle de segmentation, les divisions deviennent asynchrones et l'agencement régulier des blastomères n'étant plus maintenu il devient délicat de suivre le devenir de chaque blastomères. Du fait de la croissance du nombre de cellules et de l'association intime des blastomères marginaux avec le sac vitellin, la blastula dépourvue de cavité blastocèliquie s'arrondie et semble perchée sur le sac vitellin (stade dôme). On observe également à ce stade, la fusion des blastomères marginaux avec le syncytium pour former la couche syncytiale vitelline externe. A partir du 10^{ème} clivage (environ 1000 cellules) se produit la transition blastuléenne qui caractérise l'initiation de la transcription zygotique. Cette transition blastuléenne marque le début de l'épibolie. Les cellules du blastoderme s'aplatissent en effet (stade sphère) et se dispersent au-dessus du sac vitellin pour le recouvrir progressivement (Figure 21). Ce phénomène s'accompagne d'une intercalation radicale des cellules les plus profondes du blastoderme avec celles des couches superficielles.

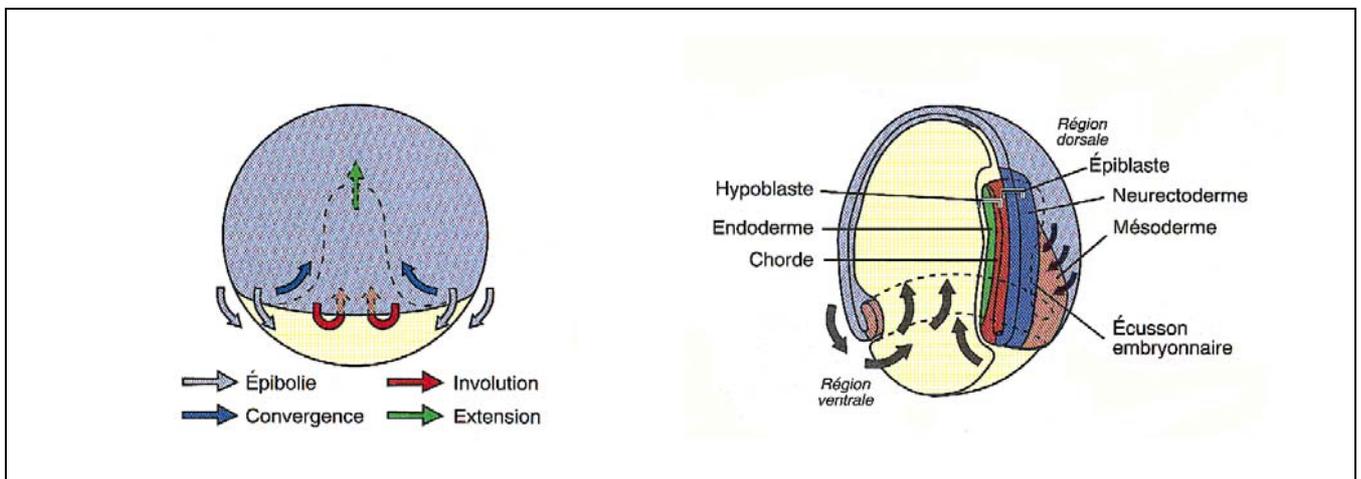


Figure 21: Gastrulation chez le Danio (d'après Foucrier et Franquinet, 1998)

La gastrulation commence avec l'établissement de l'anneau germinatif (50% d'épibolie). Il s'agit d'un renflement causé par une involution des cellules profondes du blastoderme sur la face dorsale et qui s'étend progressivement sur tout le pourtour de l'embryon (Figure 21). La couche cellulaire supérieure de l'anneau est appelée épiblaste, la couche inférieure hypoblaste. Des mouvements de convergence

des cellules de l'épiblaste et de l'hypoblaste, conduisent alors à la formation de l'écusson embryonnaire sur le côté dorsal de l'anneau germinatif. L'écusson joue le rôle d'un organisateur comparable à celui du centre de Spemann chez le Xénope. Par la suite, au fur et à mesure qu'il s'allonge vers le pôle animal il va se rétrécir latéralement par intercalation médiolatérale. C'est l'extension. Les mouvements d'épibolie, d'involution, de convergence et d'extension se produisent de façon simultanée.

Le bourgeon caudal se forme lorsque l'épibolie est achevée et que le blastoderme recouvre complètement le sac vitellin. Entre la 10^{ème} et la 24^{ème} heure, on assiste à un fort accroissement de la région caudale et à un allongement de l'embryon selon l'axe antéro-postérieur, c'est le début de La somitogenèse (10h).

A la fin de la gastrulation, la corde s'individualise conjointement à la somitogenèse et à la neurulation. La plaque neurale, qui correspondant à une zone aplatie et épaissie de l'ectoderme se forme également à cette occasion. A la différence des tétrapodes, il ne se forme pas de gouttière neurale, et le tube nerveux se forme par condensation. Au cours de l'individualisation du tube nerveux, les cellules de la crête neurale ségrègent progressivement par délamination (Langeland and Kimmel, 1997).

2.3.5. *Xenopus laevis* (Vertébré)

Après la fécondation et sous l'effet de la pesanteur, l'œuf subit une rotation d'équilibrage. C'est à dire que son hémisphère végétatif plus lourd s'oriente vers le bas. Environ une heure plus tard a lieu la rotation corticale (rotation de symétrisation).

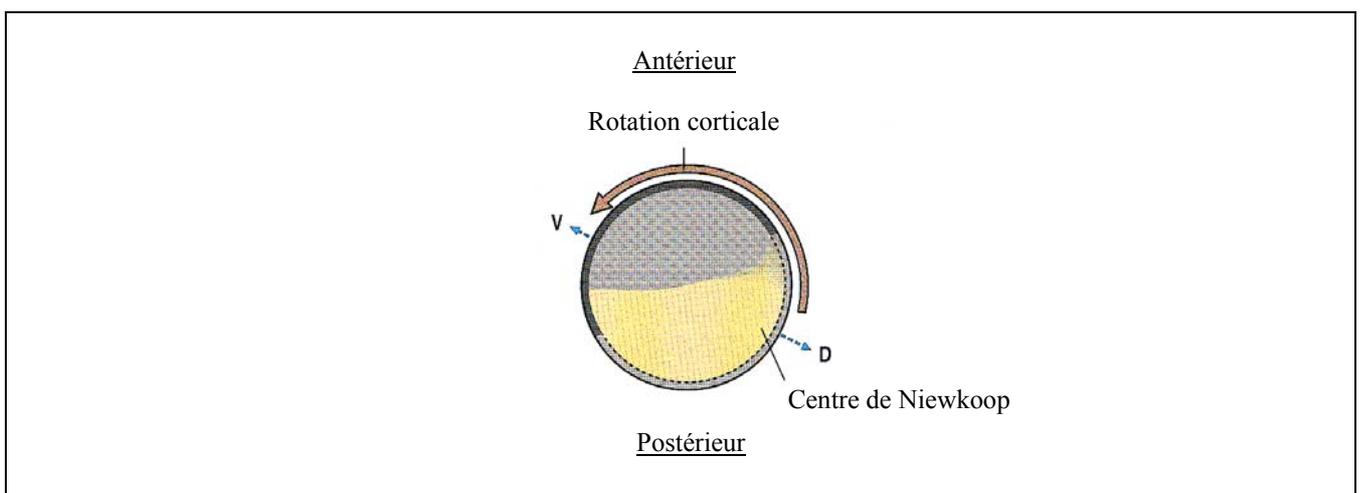


Figure 22: La réaction corticale de l'œuf de Xénope. V:Ventral, D:Dorsal (d'après Wolpert, 1998).

Cette rotation (environ 30°) de la couche corticale cytoplasmique est dirigée vers le point d'entrée du spermatozoïde²⁴ et contribue à la formation du centre inducteur de Nieuwkoop (Figure 22). Situé dans la région végétale du côté dorsal du futur embryon²⁵, ce centre établit la polarité dorso-ventrale de l'embryon.

Le clivage est holoblastique et la première division a lieu 90 minutes après la fécondation. Les plans des deux premières divisions sont perpendiculaires entre eux et orientés selon l'axe animal-végétatif. La troisième division est latitudinale et inégale, elle divise l'embryon en 4 petits blastomères animaux et en 4 gros blastomères végétatifs (Figure 23).

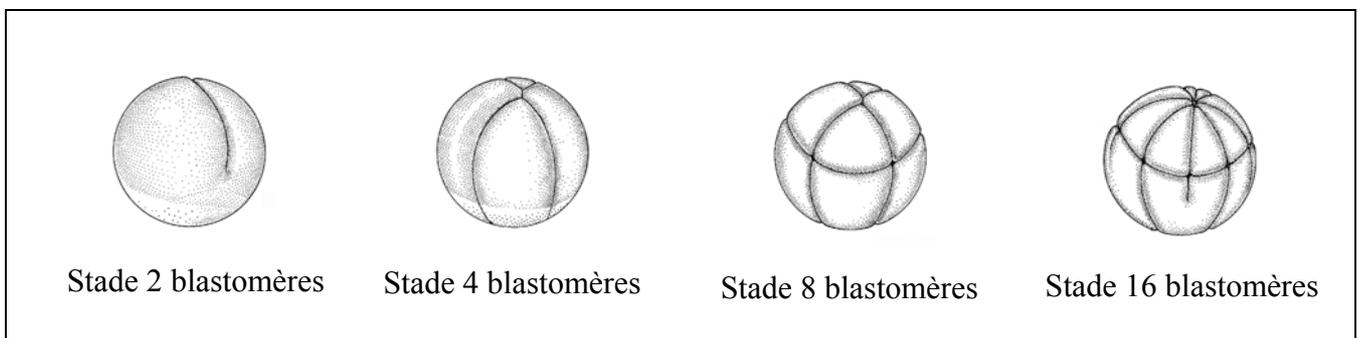


Figure 23: Premières étapes du clivage chez le Xénope (d'après Elinson, 1997)

Les divisions successives sont longitudinales et asynchrones. A partir du stade 128 cellules, le blastocèle se creuse au niveau du pôle animal, l'embryon est alors au stade blastula. L'endoderme et le mésoderme sont respectivement situés au pôle végétatif et dans la région équatoriale. On notera que chez le Xénope, le mésoderme est recouvert d'une ceinture de cellules endodermiques, le tout formant la zone marginale. L'ectoderme est quant à lui confiné à la région apicale de l'embryon (pôle animal) (Figure 24A).

Le premier signe visible du début de la gastrulation est une petite invagination dorsale appelée encoche blastoporale. L'embryon a déjà subi environ 12 divisions et est alors constitué de plusieurs milliers de cellules. Au niveau de la lèvre dorsale du blastopore, se produit un mouvement d'involution qui va conduire à l'internalisation progressive des cellules du mésoderme et de l'endoderme. Ce mouvement s'accompagne de la formation de l'archentéron entre les cellules de l'endoderme dorsal et les cellules vitellines végétatives (Figure 24B). Par la suite, les cellules du mésoderme et de l'endoderme

²⁴ Au niveau du pôle animal.

²⁵ A l'opposé du point d'entrée du spermatozoïde.

s'étendent latéralement de part et d'autre du blastopore pour recouvrir entièrement l'archentéron. Le mésoderme subit également des mouvements de convergence et d'extension le long de l'axe antéro-postérieur ce qui conduit à la formation d'une ligne mésodermique médio-dorsale. Dans le même temps, l'ectoderme s'étend par épibolie vers la région végétative (postérieure) pour recouvrir l'embryon dans sa totalité (Figure 24C et D). Au cours de ces processus de mouvements cellulaires, le mésoderme de la région médio-dorsale se développe en deux structures principales : la chorde neurale et les somites. La chorde neurale se forme le long de la ligne dorsale. Quant aux somites, ils se forment par segmentation antéro-postérieure du mésoderme situé de part et d'autre de la chorde neurale.

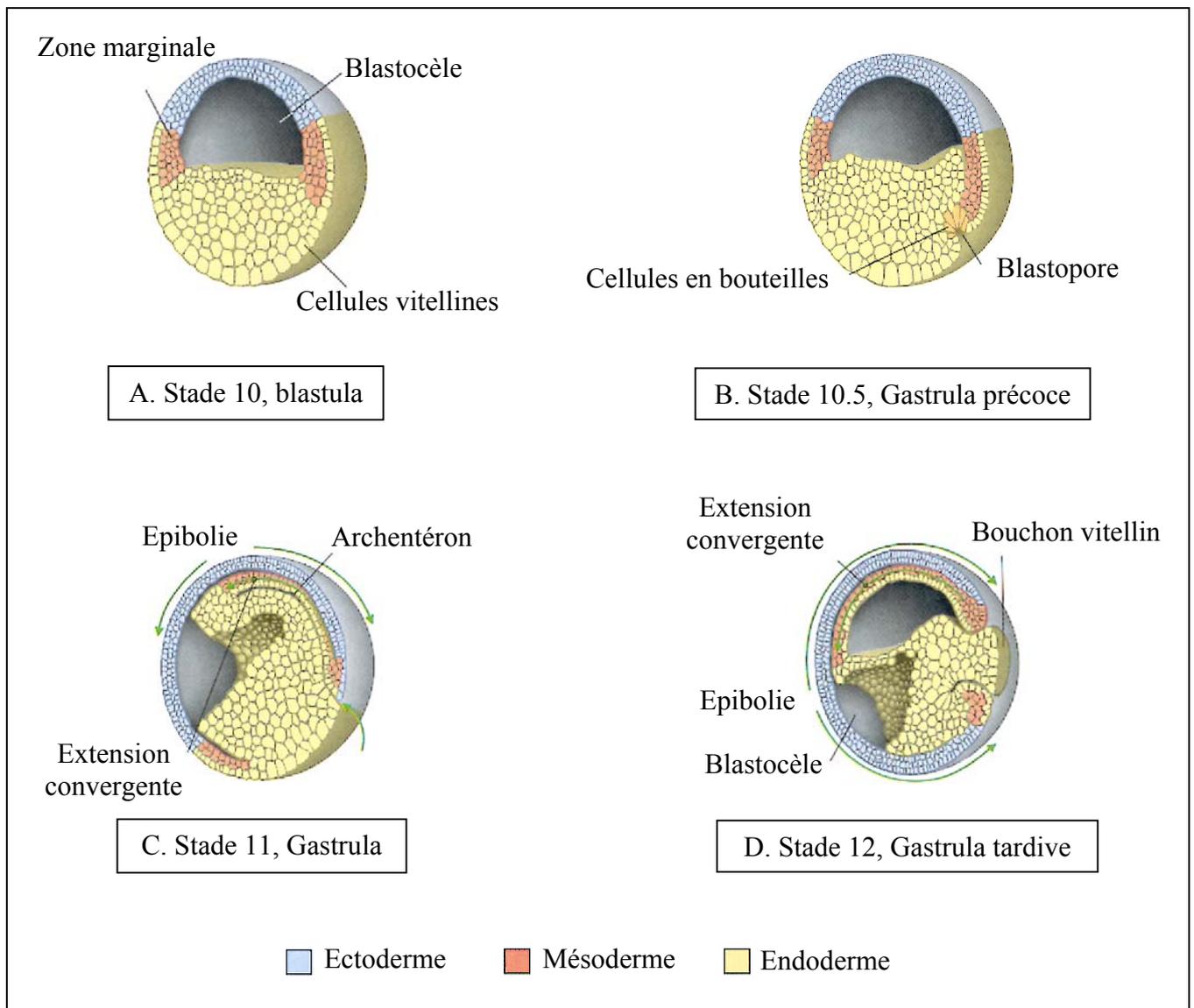


Figure 24: La gastrulation chez le Xénope (d'après Wolpert, 1998)

Le premier signe visible de la neurulation est la formation des replis neuraux (crête neurale) sur les bords de la plaque neurale. Ils se déplacent par la suite vers la ligne médiane et fusionnent pour donner le tube neural qui s'enfoncera alors dans l'épiderme (Gilbert, 1997) (Figure 27).

2.3.6. *Gallus gallus* (Vertébré)

Compte tenu de l'énorme masse de vitellus présente dans l'œuf de Poulet, le clivage est de type méroblastique et n'affecte que le noyau et le cytoplasme qui surmonte le vitellus. La segmentation débute dans l'oviducte et aboutit à la formation d'un disque de cellules appelé blastodisque ou blastoderme. Les quatre premiers cycles de division sont longitudinaux et aboutissent au stade 16 blastomères (Figure 25A, B, C, D et E). Comme pour le *Danio*, la délimitation membranaire des blastomères est incomplète et les blastomères restent en contact avec le vitellus (Figure 25F).

Les divisions deviennent asynchrones à partir du cinquième cycle de division et les premières divisions latitudinales sont clairement visible à partir du stade 64 cellules. Dès le stade 128 on observe une organisation pluristratifiée du blastoderme au-dessus de la cavité blastocélique primaire (Figure 25).

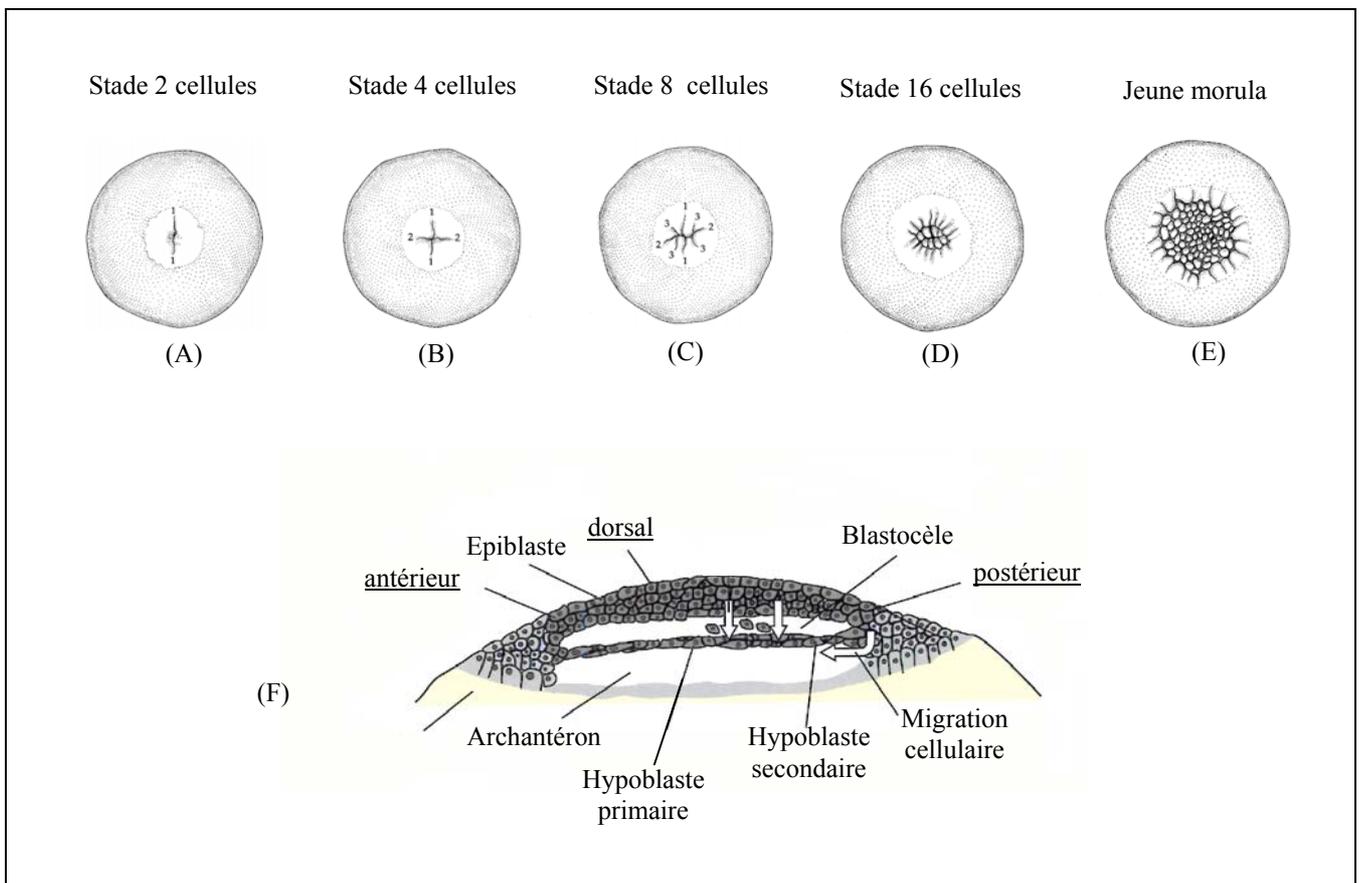


Figure 25: Clivage chez le poulet (d'après Schoenwolf, 1997 et Foucrier, 1998)

Au moment de la ponte (20H après la fécondation), le blastoderme est constitué d'environ 60 000 cellules. Sa région centrale qui surmonte le blastocèle est appelée aire pellucide par contraste avec la région la plus externe, aire opaque. La segmentation se poursuit après la ponte, et le blastoderme s'organise pour entourer le blastocèle. Les cellules inférieures au blastocèle proviennent à la fois de la zone marginale postérieure, située à la jonction entre l'aire pellucide et l'aire opaque, ainsi que des cellules du blastoderme proprement dit (Figure 25F). Elles constituent l'hypoblaste qui donnera les structures extra-embryonnaires. Les cellules surmontant la cavité du blastocèle constituent l'épiblaste qui formera l'embryon. Au niveau de l'aire pellucide, une seconde cavité constituant l'archentéron primaire se forme entre les cellules de l'hypoblaste et le vitellus (Figure 25F). La zone marginale postérieure définit à la fois la face dorsale et l'extrémité postérieure de l'embryon. L'axe antéro-postérieur ayant été défini par gravité (Eyal-Giladi, 1997).

Le début de la gastrulation est marqué par le développement du sillon primitif à partir de la zone marginale postérieure (Figure 26A). Il se développe complètement et s'étend sur environ la moitié de l'aire pellucide dans les 16 heures suivant la ponte et oriente le futur axe antéro-postérieur. Il représente une région où les cellules de l'épiblaste prolifèrent et s'invaginent en dessous de la couche cellulaire supérieure (Figure 26A).

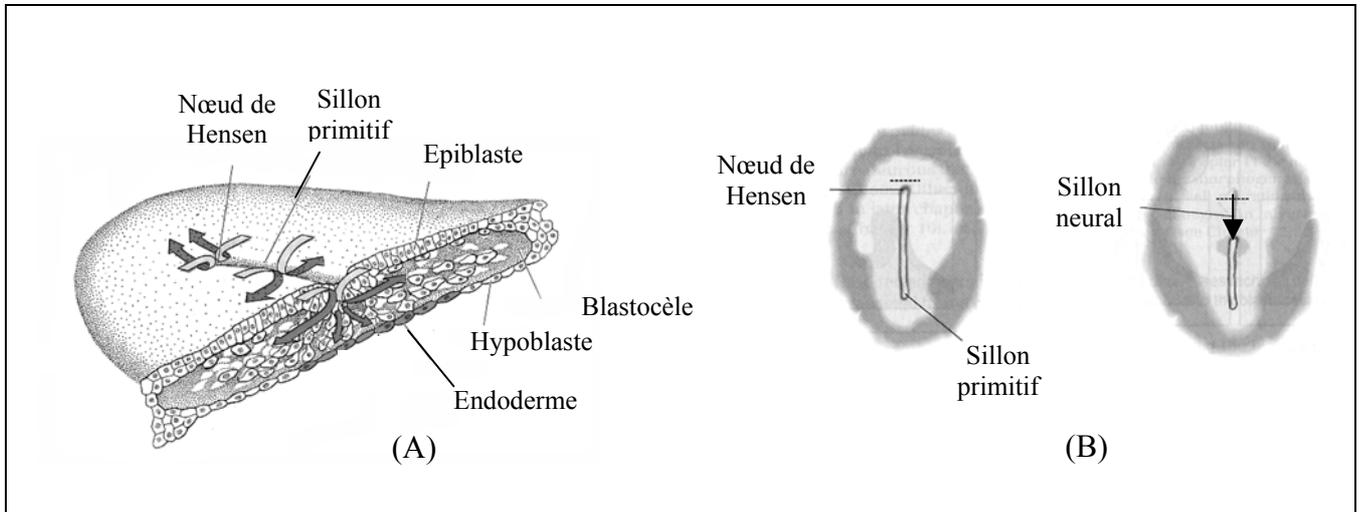


Figure 26: Gastrulation chez le poulet. (A) Formation et (B) régression du sillon primitif, indiqué par une flèche (d'après Gilbert, 1997 et Wolpert, 1998)

Chez le poulet, à la différence de nombreux autres animaux, la prolifération et la croissance cellulaire perdurent durant la gastrulation. Les cellules de l'épiblaste se déplacent vers l'avant au fur et à mesure du déplacement du sillon primitif (Figure 26B). Les cellules qui se déplacent vers l'intérieur donneront l'endoderme et le mésoderme, celles qui restent en surface donneront l'ectoderme. Au cours de la gastrulation, l'aire pellucide change de forme, les cellules se regroupant à l'extrémité antérieure du

sillon (Koller's sickle) pour former le nœud de Hensen (Figure 26B). Une fois que la majorité du mésoderme et de l'endoderme s'est déplacé vers l'intérieur, le sillon régresse et le nœud de Hensen se déplace vers le pôle postérieur de l'embryon (Figure 26B).

La région de la future tête est visible grâce à l'apparition du sillon céphalique. Au fur et à mesure de sa régression vers la région postérieure de l'embryon, la corde neurale et les somites se forment dans la partie antérieure précédant immédiatement le nœud. La formation des somites progresse vers la région postérieure à raison d'environ une paire de somites par heure dans la région du mésoderme présomitique (entre le nœud et le dernier somite formé). Une fois la corde neurale formée, le tube neural se forme à son tour grâce au repliement puis à la soudure des bourrelets neuraux situés de part et d'autre de la ligne centrale de la plaque neurale dorsale (ectodermique) (Figure 27).

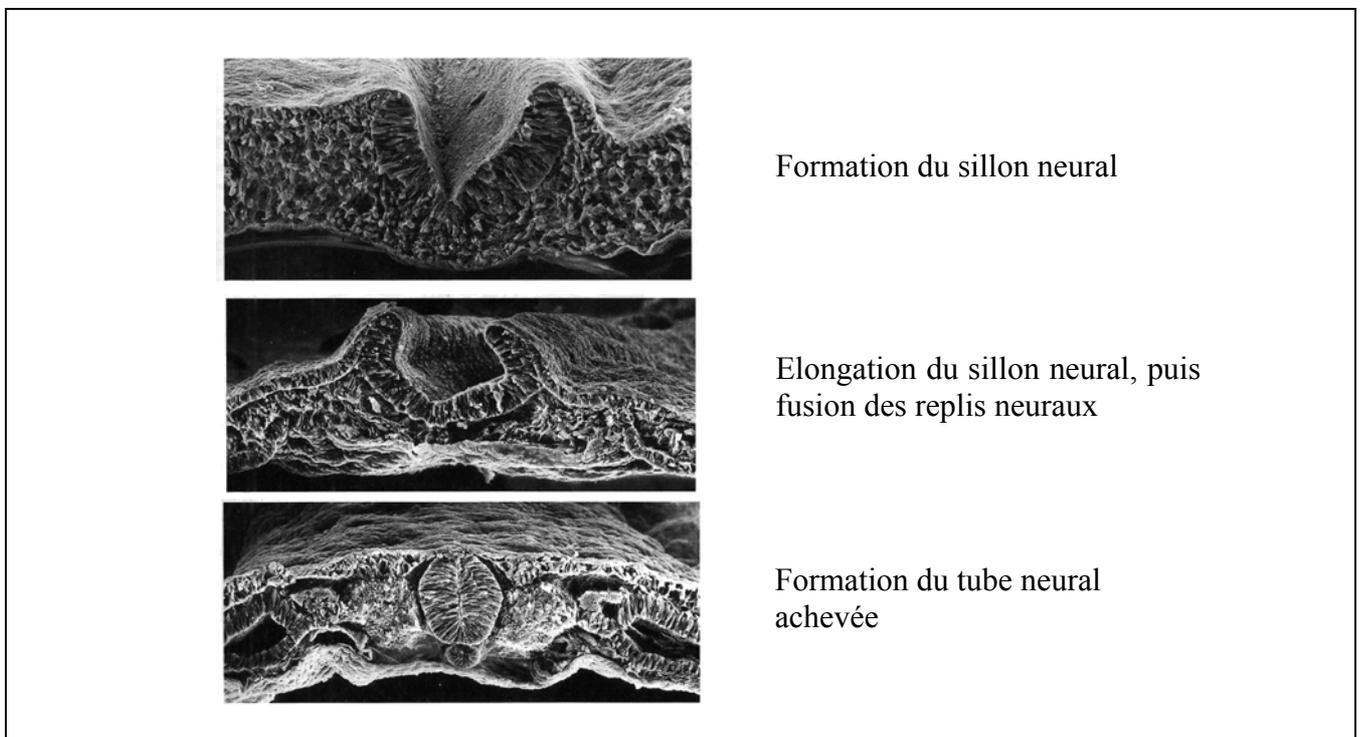


Figure 27: Formation de la crête neurale (d'après Gilbert, 1997)

Ce repliement s'étend progressivement de la région antérieure vers la région postérieure. Les cellules de la crête neurale se détachent de part et d'autre de la zone de fusion. Au même moment, la tête se développe et s'individualise, la neurulation se poursuit, et l'embryon se replie ventralement pour former l'intestin. Les deux parties de cœur se rejoignent. Par la suite, l'embryon se tourne alors sur le côté, la tête subit une flexion.

Parallèlement au développement de l'embryon de poulet, on assiste à la mise en place d'annexes embryonnaires qui le protègent et le nourrissent jusqu'à l'éclosion. La vésicule vitelline contient les nutriments nécessaires au développement de l'embryon. Le sac amniotique est rempli de fluide et lui

fournit une protection mécanique. l'allantoïde lui permet les échanges gazeux et l'excrétion des déchets (Figure 28).

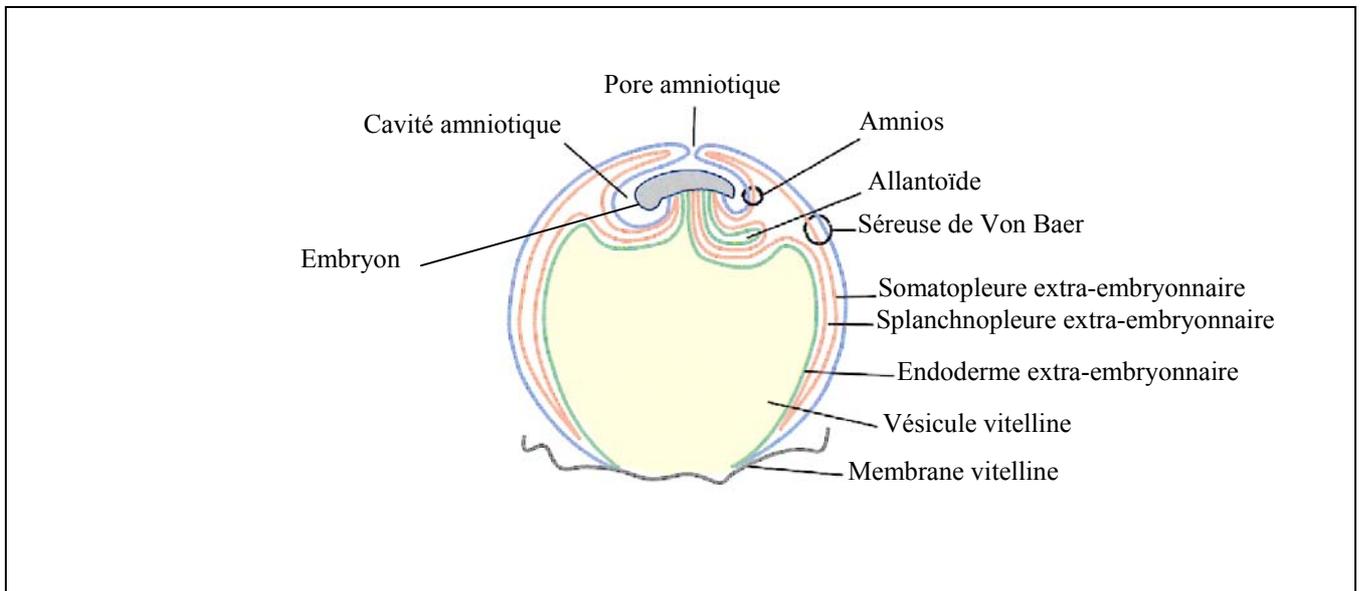


Figure 28: Annexes embryonnaires chez le Poulet (d'après Foucrier et Franquinet, 1998)

2.3.7. *Mus musculus* (Vertébré)

Le clivage commence environ une journée après la fécondation. Si la première division est méridienne, la seconde en revanche a lieu dans deux plans différents, longitudinal pour l'un des deux blastomères et latitudinal pour le second. On parle de clivage rotationnel L'œuf étant quasiment dépourvu de vitellus, la transcription zygotique se produit au stade 2 cellules et dès ce stade les divisions sont asynchrones.

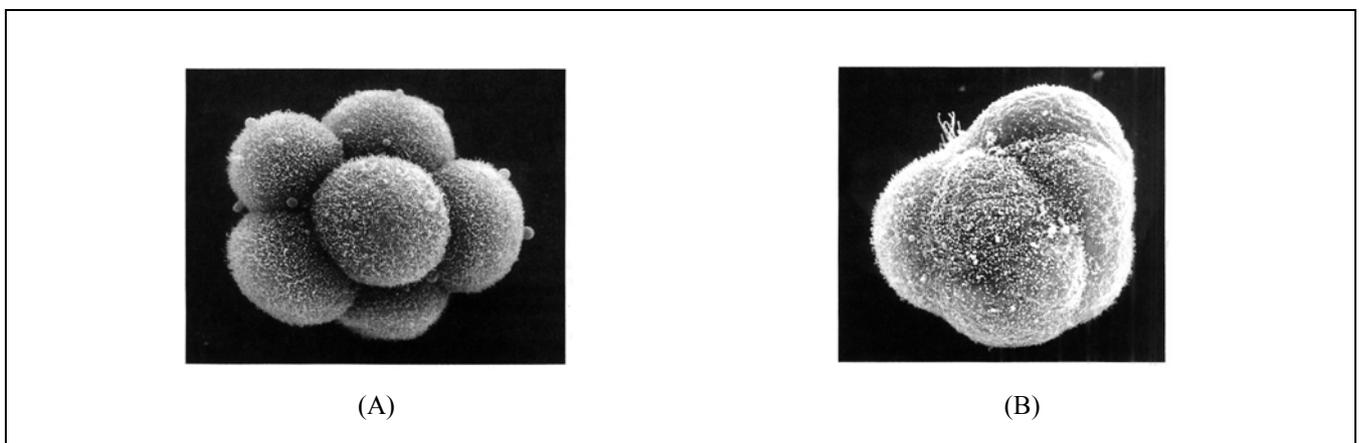


Figure 29: Compaction chez la souris. (A) Avant. (B) Après (d'après Gilbert, 1997)

A partir du stade 8 cellules, les blastomères forment une sphère compacte (Figure 29) stabilisée par des jonctions inter-cellulaires délimitant ainsi très nettement l'intérieur et l'extérieur de l'embryon.

Au stade 16 cellules, on distingue un petit groupe de cellules compactes entourées par un groupe de cellules plus grandes et plus nombreuses. Les descendants des cellules externes formeront le trophoctoderme et ne participeront pas à la formation de l'embryon, mais formeront la partie embryonnaire du placenta.

Les cellules les plus internes donneront l'embryon mais également le sac vitellin, l'allantoïde, et l'amnios. Dès le stade 64, les cellules les plus centrales (environ 13) et les cellules du trophoblaste se séparent en deux feuillets distincts. C'est le premier signe visible de différenciation cellulaire chez l'embryon de mammifère. Le blastocèle se forme alors au cours du processus de cavitation. Les cellules internes se regroupent sous le trophoblaste en un seul point pour former le bouton embryonnaire. Cette structure est appelée blastocyste (Figure 30A).

On ignore encore comment l'axe antéro-postérieur se met en place. On sait seulement qu'il est perpendiculaire à l'axe longitudinal de l'utérus. Les cellules internes sont attachées du côté dorsal. Cet axe persistera au cours de l'implantation et ce jusqu'au début de la gastrulation. A ce stade du développement (4 jours et demi après la fécondation) les cellules du bouton embryonnaire en contact avec la cavité blastocélique se différencient en endoderme primaire (entoblaste) qui ne donnera que des dérivés extra-embryonniques. Les cellules les plus internes forment quant à elles l'épiblaste qui donnera l'embryon ainsi que certaines structures extra-embryonnaires (Figure 30B).

Le blastocyste s'implante alors dans la paroi utérine (nidation). Les cellules du trophoctoderme qui sont au contact du tissu maternel vont alors former le trophoblaste alors que celles restées au contact du bouton embryonnaire vont proliférer pour former le cône ectoplacentaire. Dans le même temps, l'entoblaste va recouvrir la paroi interne du blastocèle pour constituer l'endoderme pariétal, par opposition à l'endoderme viscéral qui recouvre l'épiblaste et isole ainsi le blastocèle qui devient le lecithocèle (Figure 30C). La prolifération cellulaire du cône ectoplacentaire va contribuer à déplacer l'épiblaste vers le pôle distal du blastocyste tout créant la cavité proamniotique (Figure 30D).

Cette dernière va alors subir une subdivision transversale, lors de la formation des replis amniotiques postérieurs et antérieurs, pour former la cavité amniotique proprement dite et la cavité ectoplacentaire. Dans le même temps, la cavité coelomique extra-embryonnaire se creuse dans le repli-amniotique (Figure 30D).

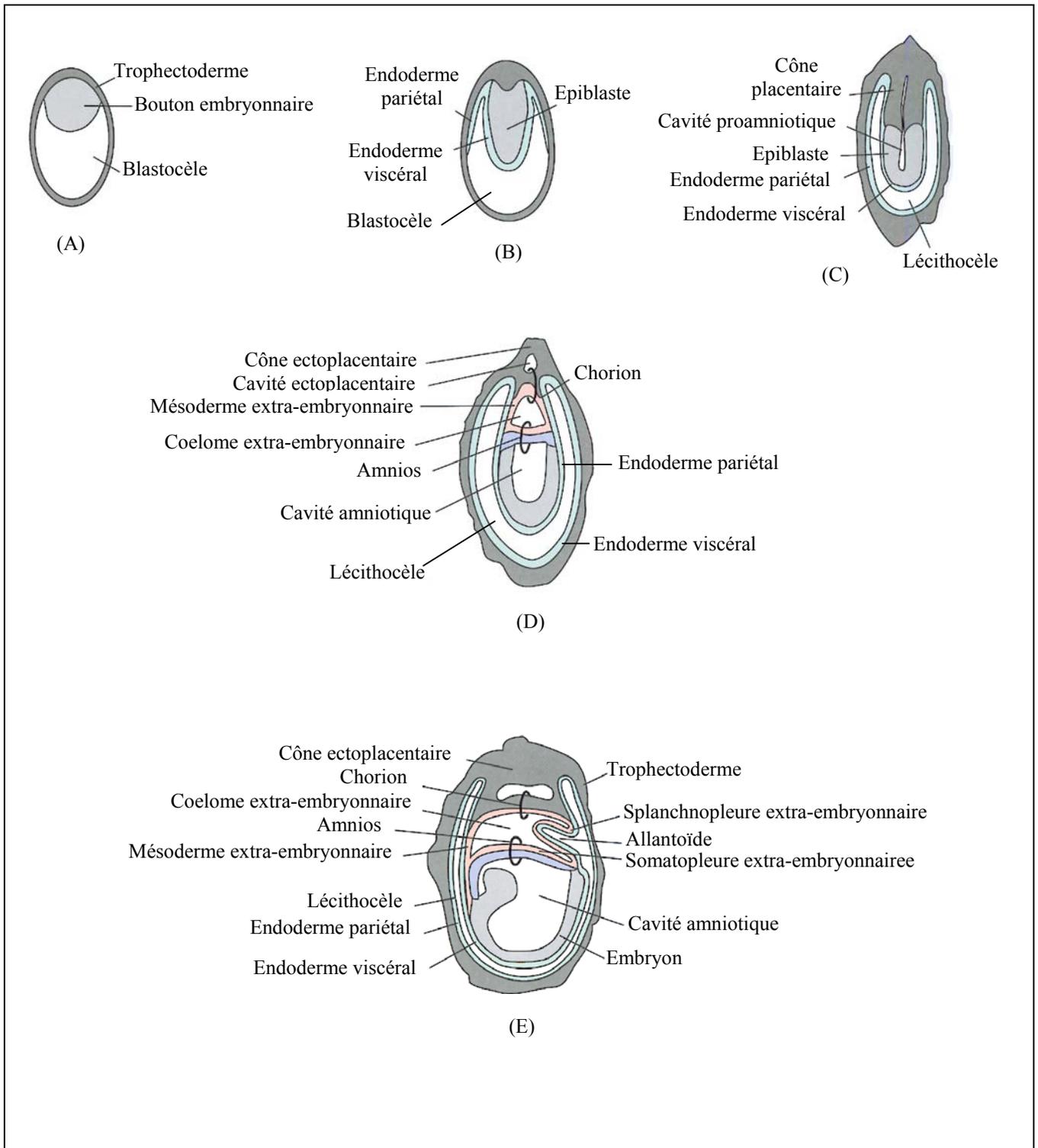


Figure 30: Gastrulation chez la Souris (d'après Foucrier et Franquinet, 1998)

La gastrulation s'accompagne de nombreux mouvements cellulaires et de la prolifération des cellules de l'épiblaste, il est donc extrêmement difficile de déterminer le devenir de chaque cellule. La gastrulation débute par l'apparition de la ligne primitive (6 jours après la fécondation) au niveau de la région postérieure de l'épiblaste. Se forme alors à ce niveau le mésoderme extra-embryonnaire qui va se glisser entre l'épiblaste et l'endoderme viscéral (Figure 30E).

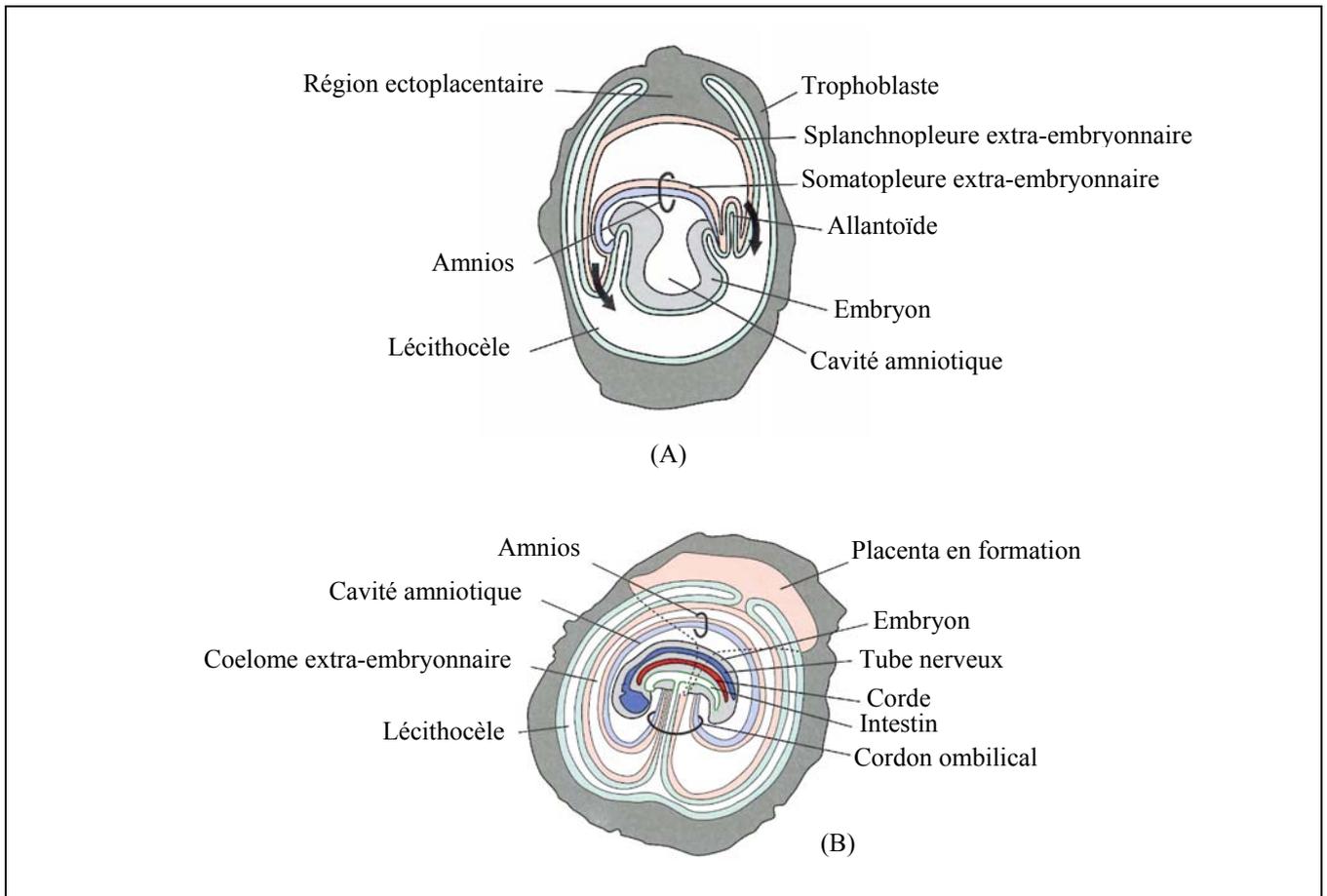


Figure 31: Mise en place des annexes embryonnaires chez la Souris (d'après Foucier et Franquinet, 1998)

La ligne primitive s'allonge pour atteindre l'extrémité distale du blastocyste (7 jours et demi). On assiste dans le même temps à une très forte augmentation du volume embryonnaire. Au fur et à mesure de la progression proximo-distale de la ligne primitive et après la formation du mésoderme extra-embryonnaire, on observe l'invagination du mésoderme et de l'endoderme embryonnaire (Figure 31A). Cette migration s'accompagne de nombreux phénomènes de migration cellulaire antéro-postérieure. A l'achèvement de la gastrulation, l'ensemble des territoires mésodermiques sont insérés entre l'endoderme et l'ectoderme conférant une structure tridermique au germe. Les extrémités antérieure et postérieure restent dépourvues de feuillet mésodermique et indiquent les emplacements où s'ouvriront les deux orifices buccal et anal du futur tube digestif.

Trois jours après le début de la gastrulation, la ligne primitive régresse dans la partie postérieure de l'embryon. La neurulation débute au niveau de la région immédiatement postérieure au futur encéphale et progresse vers les régions antérieures et caudales. Dans le même temps s'ébauchent les premiers somites et le coelome se met en place à partir du matériel mésodermique des lames latérales.

A 8 jours et demi, l'embryon va subir une inversion brutale de son orientation, due à sa croissance accélérée. Il se trouve alors complètement enveloppé par la cavité amniotique (Figure 31B).

3. Remarques et conclusions

3.1. L'unité dans la diversité

A la lecture de ce qui précède, il est saisissant de constater l'extraordinaire variabilité des processus utilisés lors du développement précoce des métazoaires et en particulier dans l'établissement du feuillet mésodermique. Cette diversité ne me semble cependant pas suffisante pour remettre en cause l'unité d'origine des processus impliqués.

Ainsi, s'il ne semble y avoir que peu de points communs entre le développement précoce de la Patelle, de l'Oursin et du Xénope, la comparaison de l'organisation des *blastula* de ces trois métazoaires, nous oblige à constater que malgré les différences, la disposition relative des différents tissus embryonnaires présomptifs est étonnamment conservée. En effet, les blastomères du pôle animal donneront dans les trois cas de l'ectoderme, ceux du pôle végétatif de l'endoderme, le mésoderme provenant le plus souvent des blastomères intermédiaires (Arendt and Nubler-Jung, 1997).

Au sein même des vertébrés, le clivage et la gastrulation semblent à priori très différents entre les amphibiens (Xénope) et les amniotes (Poulet et Souris). Malgré tout, on peut retrouver une certaine unité dans ces processus. Si l'on considère par exemple le sillon primitif comme une sorte de blastopore allongé, les mouvements morphogénétiques ayant lieu au cours de la gastrulation semblent alors plutôt similaires puisqu'il s'agit dans les deux cas d'un mouvement d'internalisation de l'endoderme et du mésoderme tandis que l'ectoderme s'étend par épibolie au dessus de la masse vitelline (Arendt and Nubler-Jung, 1999; Stern, 1992).

Chez les vertébrés, et plus généralement chez les chordés, la gastrulation s'accompagne également de la détermination de l'axe antéro-postérieur. On note dans tous les cas le rôle prépondérant dans ce processus d'un centre d'organisateur généralement mis en place à l'issue des mouvements de réorganisation cytoplasmique qui suivent la fécondation. L'axe antéro-postérieur se définissant par le méridien joignant l'organisateur au pôle animal (Eyal-Giladi, 1997; Niehrs and De Robertis, 1992). Ainsi, malgré des différences qui résultent essentiellement de la quantité et de la localisation du vitellus initialement présent dans l'œuf on aboutit *in fine* à une gastrula considérée comme homologue chez tous les chordés (Eyal-Giladi, 1997).

Un dernier point concerne non plus la diversité topologique, mais la diversité chronologique et la succession temporelle des étapes de clivage et de gastrulation. En effet, et contrairement à ce que l'on trouve classiquement dans les ouvrages traitant de l'embryologie des métazoaires (Figure 1), les étapes de clivage et de gastrulation sont parfois simultanées (*i.e.* Nématode, Patelle et Poulet). Tout ce passe donc comme si, chez ces espèces, la gastrulation était précoce et démarrait sans attendre la fin du clivage. Le découpage de l'ontogenèse en étapes discrètes et successives semble donc purement artificiel, l'ensemble de ces processus étant vraisemblablement beaucoup plus labile, ce qui constitue peut être un avantage sélectif important et contribue certainement pour beaucoup à la diversité de l'embryogenèse des métazoaires.

En conclusion, la diversité observée ne constituerait donc qu'une variation autour d'un même thème à savoir l'organisation des blastomères en feuillets embryonnaires rigoureusement agencés les uns par rapport aux autres.

3.2. De l'existence et de l'homologie des feuillets embryonnaires

Bien que la réalité d'une disposition en feuillets embryonnaires puisse rester discutable (assez sommaire chez le nématode), on peut admettre qu'on assiste au cours de la gastrulation de tous les *Bilateria*, à une réorganisation importante des blastomères en trois groupes de tissus embryonnaires distincts: l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme.

L'homologie des feuillets embryonnaires des *Bilateria* est un dogme sur lequel repose la théorie Haeckelienne de l'organisation des métazoaires. Néanmoins, devant l'extrême diversité des processus utilisés au cours de la gastrulation, la question de cette homologie reste toujours d'actualité (Nielsen, 1995; Willmer, 1994).

Notamment en raison de sa possible dualité d'origine (ectodermique et/ou endodermique) et de mode d'induction différents entre protostomiens et deutérostomiens, la question est encore plus pertinente en ce qui concerne le feuillet mésodermique. Certains n'hésitent donc pas à remettre en cause l'homologie de ce tissu embryonnaire entre protostomiens et deutérostomiens (Nielsen, 1995; van den Biggelaar and Haszprunar, 1996).

Il n'existe cependant pas à mon avis de corrélation évidente entre l'origine ectodermique et/ou endodermique du mésoderme et le devenir du blastopore. En effet, chez la *Drosophile* et le *Xénope* le

mésoderme est d'origine ectodermique alors qu'il est d'origine endodermique ou mixte (endo- et ectoderme) chez les autres métazoaires présentés ici. L'origine du mésoderme semble donc être un argument relativement faible pour soutenir la non homologie du mésoderme. Plus que l'origine du feuillet induit ou la nature du feuillet inducteur, c'est la nature des signaux moléculaires responsable de cette communication cellulaire qui devrait *in fine* nous permettre de répondre à la question de cette homologie.

En l'absence d'arguments forts infirmant la théorie d'Haeckel, je défendrai donc par la suite l'idée d'une homologie des feuillets embryonnaires et notamment celle du feuillet secondaire, le mésoderme. Cette conviction repose pour l'instant sur trois arguments.

Le premier consiste à réfuter l'emphase accordée par Nielsen à la diversité apparente des processus de gastrulation. Cette diversité ne refléterait que les différences dues à la structure initiale de l'œuf et au mode de clivage qui en découle (Arendt and Nubler-Jung, 1997; Willmer, 1994).

Le deuxième argument repose sur le devenir chez l'adulte des trois feuillets embryonnaires. En effet chacun d'entre eux va constituer chez tous les métazoaires les mêmes types de tissus et d'organes spécifiques (Hall, 2000; Nielsen, 1995). Par exemple, l'ectoderme a classiquement une fonction de protection, éventuellement de locomotion et contribue à la formation du système nerveux et des organes sensoriels. L'endoderme a une fonction digestive et forme principalement l'estomac, une partie de l'intestin ainsi que quelques structures dérivées. Enfin, le mésoderme forme les muscles et certains éléments du squelette et du système circulatoire. L'hypothèse la plus parcimonieuse semble donc d'imaginer une origine unique pour chacun de ces feuillets plutôt que de très nombreuses convergences. La diversité observée ne refléterait en fait que l'accumulation de petites variations à partir d'un état ancestral commun.

Enfin, pour terminer, mon dernier argument repose sur une propriété spécifique du mésoderme précoce, à savoir sa capacité à fonctionner comme centre organisateur, aussi bien chez le Xénope que chez la Patelle (van den Biggelaar and Haszprunar, 1996). Là encore, il est difficile d'imaginer une simple convergence et il me semble plus parcimonieux d'imaginer qu'une des fonctions ancestrales du mésoderme soit de contribuer à l'organisation de l'embryon.

3.3. Conclusions

Ces arguments ne suffisent toutefois pas pour conclure de manière définitive sur la question de l'homologie du mésoderme. Au cours de ma thèse, je me suis donc attaché à utiliser une approche expérimentale qui puisse permettre d'apporter un élément de réponse à cette question. Cela a consisté à vérifier si les gènes impliqués dans la formation du mésoderme chez les *Bilateria* étaient conservés. Il m'a fallu pour cela établir l'inventaire des gènes conservés et exprimés spécifiquement dans le territoire mésodermique des organismes modèles les plus classiques (drosophile et vertébrés) avant d'essayer de confirmer s'ils s'exprimaient également dans le mésoderme du troisième groupe de métazoaires, les lophotrochozoaires.

**Comprendre les mécanismes génétiques
gouvernant la formation du mésoderme**

L'objectif de ce chapitre est de traiter de la détermination génétique du mésoderme chez les *Bilateria*. Je me baserai essentiellement pour cela sur les travaux réalisés chez la *Drosophile* et le *Xénope*. Cette étude comparative des réseaux de gènes contrôlant la formation du mésoderme devrait me permettre de répondre à deux questions distinctes. Premièrement, quels sont les gènes ou familles de gènes impliqués dans la détermination et la différenciation précoce du mésoderme ?

Deuxièmement ces gènes sont-ils communs aux *Bilateria* ? En d'autres termes, existe-t-il un fondement génétique qui supporte l'hypothèse d'une l'homologie du mésoderme chez les *Bilateria* ?

1. La formation du mésoderme: quelques généralités

On peut schématiquement décomposer la formation du mésoderme en trois étapes qui, selon les espèces, peuvent être plus ou moins simultanées: l'induction, la détermination et la différenciation. La première est généralement contrôlée par un signal d'origine maternel et permet aux cellules de l'endoderme ou de l'ectoderme d'acquérir leur détermination mésodermique en activant une première série de gènes zygotiques spécifiques du mésoderme. Les cellules engagées dans la formation du mésoderme (déterminées) se différencieront ultérieurement en tissus mésodermiques spécialisés: muscles, système circulatoire, squelette²⁶, etc.

La principale difficulté rencontrée par les biologistes qui étudient la formation du mésoderme tient au fait qu'en raison de son rôle d'organisateur, les différentes étapes évoquées ci-dessus sont étroitement associées à l'établissement et au maintien des axes dorso-ventral et antéro-postérieur ainsi qu'aux nombreux mouvements morphogénétiques qui se produisent au cours de la gastrulation et qui accompagnent la formation des feuilletts embryonnaires. L'ensemble de ces processus étant régulé par un grand nombre de gènes organisés en de multiples réseaux possédant de nombreuses interactions, il est alors extrêmement difficile d'isoler les éléments du réseau qui sont spécifiques de la formation du mésoderme.

2. Contrôle génétique de la formation du mésoderme chez *Drosophila melanogaster*

Comme nous l'avons vu précédemment, le mésoderme est constitué par les cellules les plus ventrales du blastoderme (Chapitre 1). Des expériences de transplantations ectopiques de cellules, de noyaux ou de cytoplasme provenant de cette région ont en outre montré que la détermination du mésoderme était autonome et antérieure à la formation du sillon ventral (Beer et al., 1987; Leptin and Roth, 1994). Comme nous allons le voir par la suite, l'induction du mésoderme est contrôlée par l'établissement d'un gradient protéique maternel qui résulte directement de la mise en place de l'axe dorso-ventral.

2.1. Etablissement de l'axe Dorso-ventral chez *Drosophila melanogaster*.

Les axes antéro-postérieur et dorso-ventral, chez la Drosophile, sont spécifiés lors de l'ovogenèse (St Johnston and Nusslein-Volhard, 1992). L'établissement de ces deux axes est initié par l'action du gène

²⁶ Vertébrés uniquement

gurken (*grk*). Le noyau, initialement localisé au pôle postérieur de l'ovocyte, envoie un premier signal *grk* aux cellules folliculaires postérieures. C'est ce premier signal qui contribuera à l'établissement de l'axe antéro-postérieur. Sous l'action d'un signal en retour émanant des cellules folliculaires postérieures, le réseau de microtubules de l'ovocyte se réorganise et le noyau migre alors antérieurement, en un point aléatoire, pour déterminer le côté dorsal de l'embryon (Roth et al., 1999).

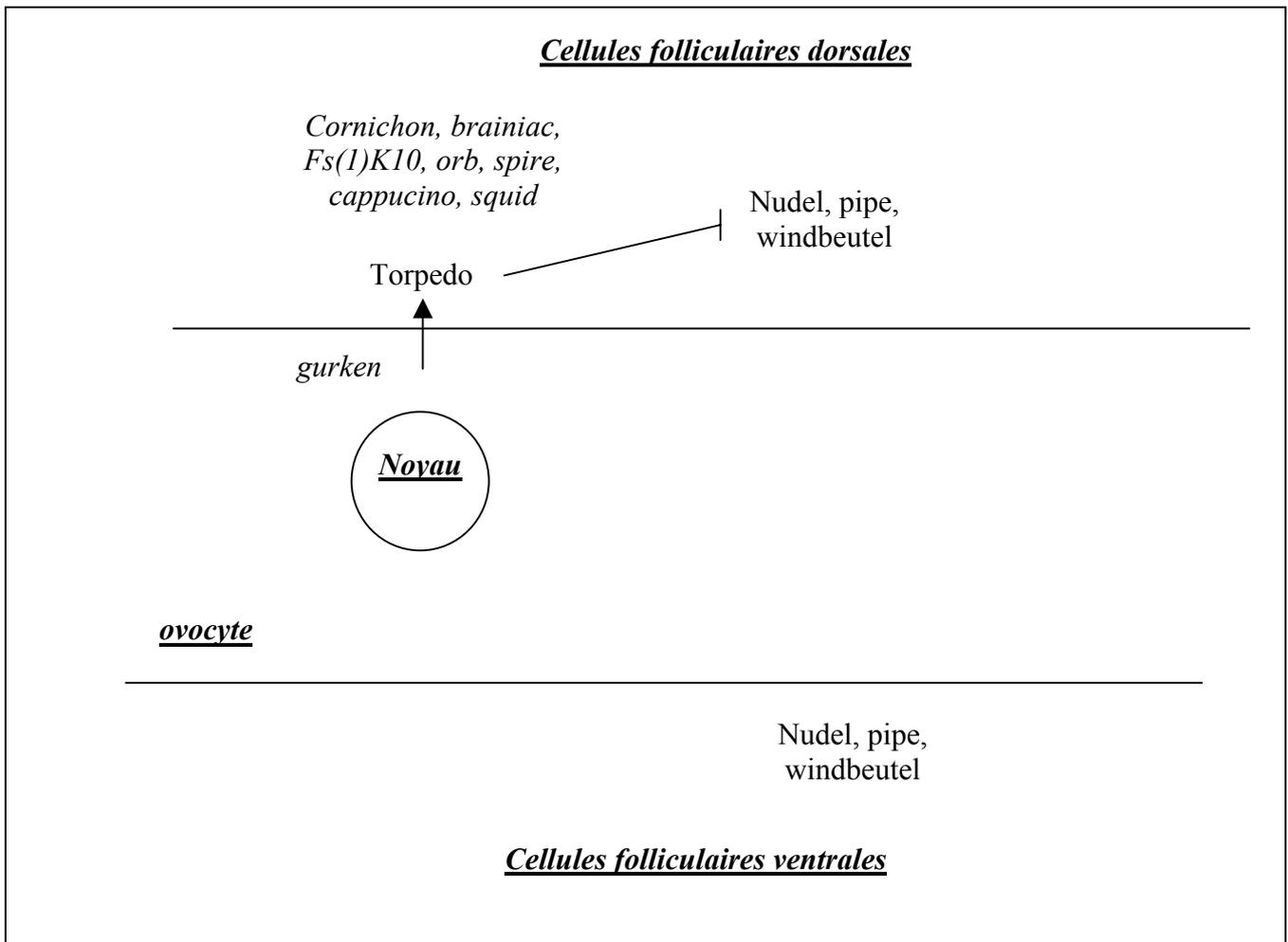


Figure 32: Etablissement de l'axe Dorso-ventral chez la Drosophile.

L'émission d'un second signal *grk* en direction des cellules folliculaires va déterminer l'orientation de l'axe dorso-ventral (van Eeden and St Johnston, 1999) (Figure 32). Le gène *grk* code pour un TGF α qui serait capable de se lier à Torpedo (*top*), un récepteur à EGF situé sur la membrane des cellules folliculaires. Les produits des gènes *cornichon* (*cni*), *brainiac* (*brn*), *fs(1)K10* (*K10*), *spire* (*spir*), *cappuccino* (*capu*), *squid* (*sqd*) et *orb* interviennent également dans l'établissement de cette première asymétrie dorso-ventrale (Roth and Schupbach, 1994; Morisato and Anderson, 1995). Pas moins de 12 gènes vont par la suite contribuer à mettre en place l'axe dorso-ventral (Anderson and Nusslein-Volhard, 1984; Chasan and Anderson, 1993). L'activation de Torpedo par Gurken contribuerait en-

effet à inactiver les produits des gènes *nudel*, *pipe* et *windbeutel* dans les cellules folliculaires dorsales. Par contre, dans les cellules folliculaires ventrales, les protéines codées par ces gènes restent actives et sont incorporées à l'enveloppe vitelline sécrétée par les cellules folliculaires (Stein et al., 1991; Stein and Nüsslein-Volhard, 1992).

Le complexe constitué par ces trois protéines va activer trois protéases à Sérine secrétées par l'ovocyte, dans l'espace perivitellin ventral, sous une forme zymogène inactive: Gastrulation-defective, Snake et Easter. L'activation de la première de ces protéines, Gastrulation-defective, va conduire à l'activation en cascade des protéases Snake et Easter pour finalement aboutir à celle de la protéine extracellulaire Spätzle (Chasan et al., 1992; Hong and Hashimoto, 1995; Han et al., 2000). Une fois activée par clivage, Spätzle se fixerait au récepteur Toll situé sur la membrane plasmique de l'ovocyte (Hashimoto et al., 1991; Morisato and Anderson, 1994; Schneider et al., 1994) et transduirait ainsi le signal à l'intérieur de l'embryon par l'intermédiaire des protéines Tube et Pelle (Shelton and Wasserman, 1993; Großhans et al., 1994; Galindo et al., 1995). Pelle est une protéine kinase cytoplasmique qui par phosphorylation va dégrader la protéine Cactus (Reach et al., 1996). Cette dégradation va alors entraîner la libération de Dorsal, un facteur de transcription de la famille NFκB, qui était jusqu'alors retenu dans le cytoplasme par Cactus (Kidd, 1992).

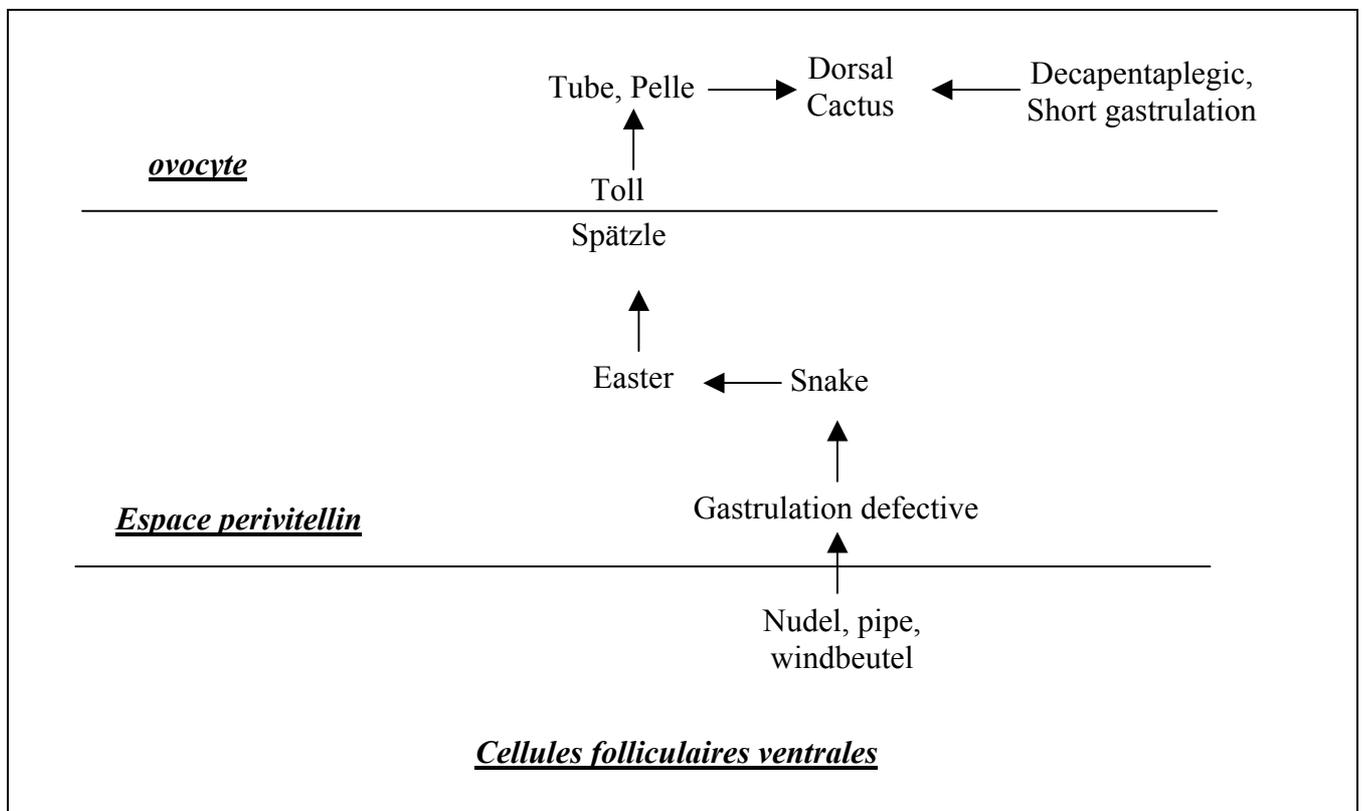


Figure 33: Axe Dorso-ventral et création du gradient de la Protéine DORSAL.

La forme libre (phosphorylée) de Dorsal est finalement importée dans le noyau (Drier et al., 1999) et va contribuer à la création d'un gradient nucléaire (dorso-ventral) de ce facteur de transcription (Roth et al., 1989; Rushlow et al., 1989; Steward, 1989). On observe en effet une forte concentration de Dorsal dans les noyaux les plus ventraux, tandis que cette même protéine est absente des noyaux dorsaux. Dorsal va se fixer de façon spécifique sur les séquences promotrices de certains gènes et en association avec des co-activateurs (CBP) ou des co-represseurs (DSP1, dCtBP, Groucho) va activer ou réprimer spécifiquement leur transcription (Lehming et al., 1994; Ip, 1995; Mannervik et al., 1999). Il a également été montré tout récemment que parallèlement à la voie Toll, l'expression maternelle de *decapentaplegic (dpp)* (un TGF β exprimé dorsalement) et de son antagoniste *short gastrulation (sog)* (exprimé ventralement) contribuait également à établir l'expression en gradient de Dorsal, en régulant la dégradation de la protéine Cactus (Araujo and Bier, 2000).

2.2. La détermination du mésoderme.

Le gradient nucléaire dorso-ventral de la protéine Dorsal va aboutir à la subdivision de l'embryon en domaines se caractérisant par l'expression différentielle de certains gènes zygotiques.

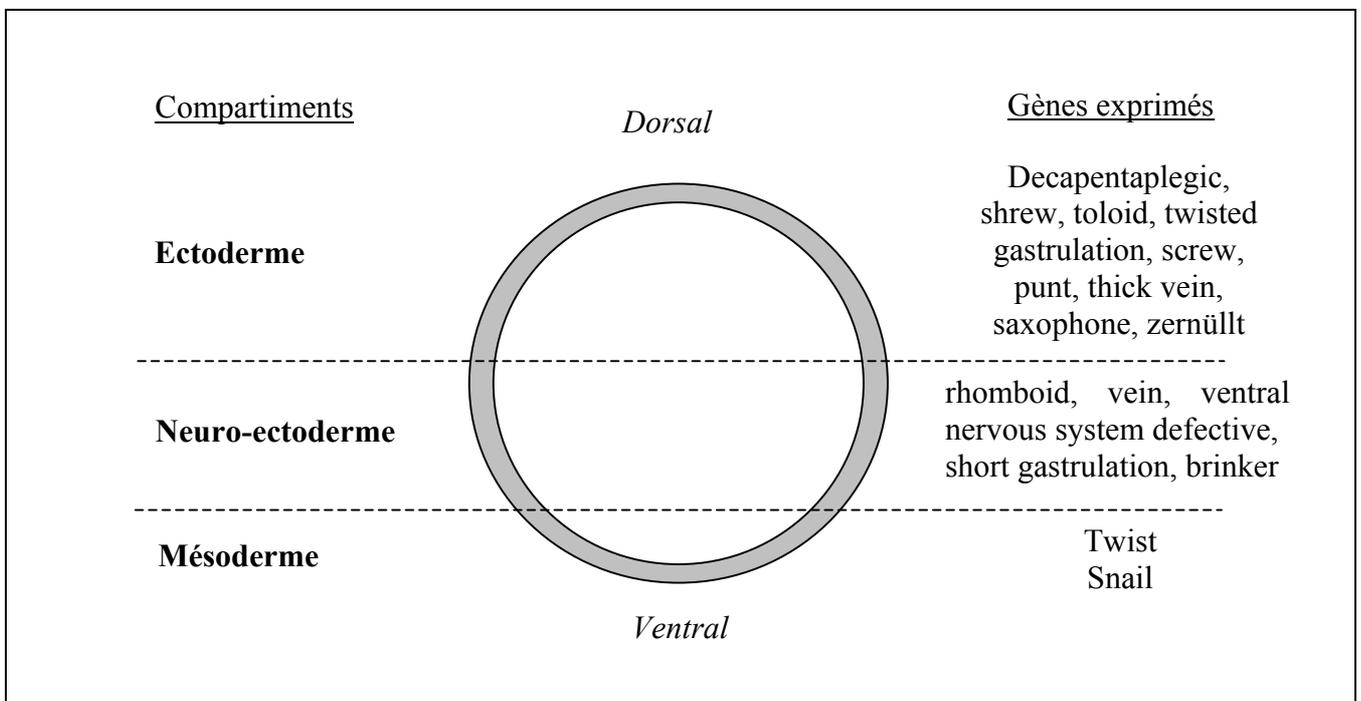


Figure 34: Subdivision Dorso-ventrale de l'embryon de Drosophile.

Ainsi, dans les noyaux des cellules ventrales où la concentration du morphogène Dorsal est la plus élevée, la transcription zygotique des gènes *twist* (*twi*) et *snail* (*sna*) sera activée tandis que celle des gènes *dpp*, *zernüllt* (*zen*) et *tolloid* (*tld*) sera réprimée (Pan et al., 1991; Thisse et al., 1991; Ip et al., 1992; Akimaru et al., 1997) (Figure 34).

Dans les cellules latérales où l'expression nucléaire de Dorsal est moindre, c'est la transcription des gènes *rhomboid* (*rho*), *vein*, *ventral nervous system defective* (*vnd*), *sog* et *brinker* qui sera activée (Kosman et al., 1991; Ip et al., 1992; François et al., 1994). Enfin, l'absence de la protéine Dorsal dans les noyaux les plus dorsaux va permettre l'expression des gènes *dpp*, *shrew* (*srw*), *tld*, *twisted gastrulation* (*tsg*), *screw* (*scw*), *punt* (*put*), *thick vein* (*tkv*), *saxophone* (*sax*) et *zen* (Figure 34) (Ray et al., 1991; Morisato and Anderson, 1995).

Bien que leurs domaines d'expression ne soient pas strictement restreints au mésoderme on considère généralement que les gènes *Twist* et *Snail* constituent chez la Drosophile les marqueurs les plus précoces de la détermination du mésoderme (Leptin, 1991; Leptin et al., 1992). Ces deux gènes s'expriment en effet dans le mésoderme au tout début de la gastrulation. Leur expression s'atténue par la suite avant de s'exprimer de nouveau de façon dynamique dans les trois feuilletts embryonnaires (Thisse et al., 1988; Leptin and Grunewald, 1990; Alberga et al., 1991;). Mais surtout, on observe que chez les mutants pour ces gènes le mésoderme est absent ou extrêmement réduit (Simpson, 1983; Grau et al., 1984; Nüsslein-Volhard et al., 1984).

En résumé, si la protéine Dorsal peut être considérée comme la molécule inductrice du mésoderme chez la Drosophile, *Twist* et *Snail* peuvent alors être considérés comme les facteurs de la détermination du mésoderme, du moins telle était la vision dominante au début de notre travail (Hammerschmidt and Nüsslein-Volhard, 1993).

Ces deux gènes codent pour des facteurs de transcription qui, à ce titre, vont pouvoir activer ou réprimer l'expression de toute une série de gènes (Leptin, 1991). Ainsi, *Twist* est un facteur de transcription de type bHLH qui permet la transcription d'une série de gènes exprimés spécifiquement dans le mésoderme: *sna*, *twi*, *tinman* (*tin*), *bagpipe* (*bag*), *nautilus*, *mef2*, *zinc-finger homeodomain protein-1* (*zfh-1*) (Lai et al., 1991). *Snail* est, quant à lui, un facteur de transcription à doigt de zinc qui intervient à la fois pour réprimer dans le mésoderme l'expression de gènes neuroectodermiques, mais aussi pour permettre l'activation de gènes contrôlant les mouvements morphogénétiques qui ont lieu au cours de la gastrulation (Ip et al., 1994; Nibu et al., 1998; Leptin, 1999). Ainsi, associé au co-répresseur dCtBP, *Snail* réprimerait ventralement les gènes neuroectodermiques *rho*, *lethal of scute* (*T3*) et *single minded* (*sim*) (Kosman et al., 1991; Nibu et al., 1998), alors qu'il activerait les gènes *serpent*

(*srp*), *zfh-1*, *hearthless (htl)* and *folded gastrulation (fog)* (Lai et al., 1991; Ip et al., 1992; Kasai et al., 1992; Costa et al., 1994; Casal and Leptin, 1996).

2.3. La différenciation précoce du mésoderme

La différenciation du mésoderme en cellules puis en tissus spécialisés (corps gras, musculature cardiaque, viscérale et somatique) commence au cours de l'extension de la bandelette germinative, peu après le début de la gastrulation. On observe alors la mise en place d'une segmentation antéro-postérieure ainsi qu'une différenciation dorso-ventrale du mésoderme. La segmentation antéro-postérieure résulte à la fois de l'expression mésodermique des gènes *engrailed (en)*, *even skipped (eve)*, *hedgehog (hh)*, *sloppy paired (slp)*, *wingless (wg)* et de l'interaction avec des signaux provenant de l'ectoderme (*hh* et *wg*). On aboutit alors à l'établissement d'une succession de parasegments exprimant *eve*, *hh* et *en* alternés avec des parasegments exprimant *slp* et *wg* (Azpiazu et al., 1996; Riechmann et al., 1997) (Figure 35).

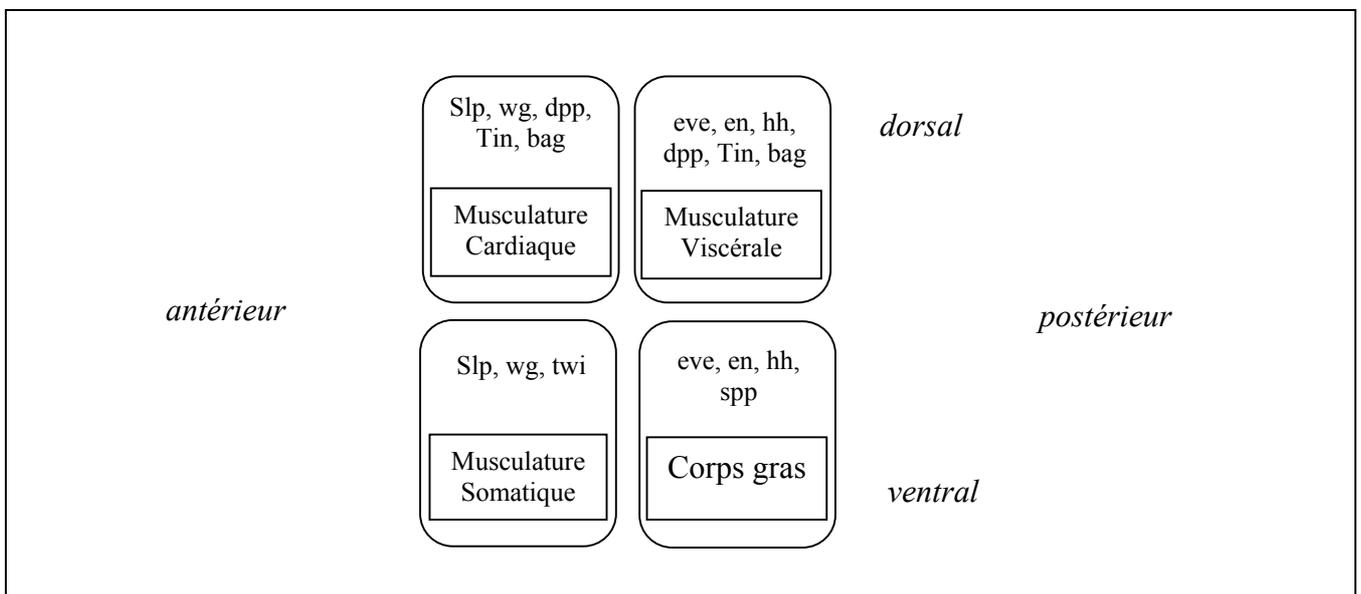


Figure 35: La différenciation précoce du mésoderme chez la Drosophile.

La différenciation dorso-ventrale du mésoderme est directement contrôlée par l'expression ectodermique dorsale de *dpp* (Staehling-Hampton et al., 1994; Frasch, 1995). L'induction du mésoderme par *dpp* conduit à maintenir dorsalement l'expression de *tin* dans le mésoderme viscéral alors que son expression disparaît ventralement dans le mésoderme somatique. Tinman activant à son tour l'expression dorsale de *bag* (Azpiazu and Frasch, 1993).

La segmentation antéro-postérieure et la détermination dorso-ventrale participent de concert à la différenciation du mésoderme. Ainsi, les cellules dorsales des parasegments exprimant *slp*, *wg*, *dpp* et *tin* vont se différencier en musculature cardiaque tandis que celles des parasegments exprimant *eve*, *en*, *hh*, *dpp* et *bag* vont donner la musculature viscérale circulaire. De même, les cellules ventrales des parasegments qui expriment *slp*, *wg* et *twi* vont se différencier en muscles somatiques alors que celles des parasegments exprimant *eve*, *en*, *hh* et *srp* se différencieront en corps gras (Frasch, 1995; Azpiazu et al., 1996; Baylies and Bate, 1996; Riechmann et al., 1997).

Enfin, l'expression dans le mésoderme le plus postérieur des gènes *brachyenteron* (*byn*) et *fork-head* (*fkf*) permet la différenciation du mésoderme viscéral longitudinal (Nguyen and Xu, 1998; Kusch and Reuter, 1999).

3. Contrôle génétique de la formation du mésoderme chez les vertébrés

Si l'on connaît certains des gènes qui chez les vertébrés s'expriment dans le mésoderme, une grande partie de l'organisation des réseaux génétiques gouvernant la détermination de ce feuillet secondaire reste encore à déterminer. Une caractéristique importante du développement des vertébrés et plus généralement des chordés est l'existence de régions dites "organisatrices": organisateur de Spemann chez le Xénope, écusson chez le Danio, nœud de Hensen chez le Poulet et nœud chez la Souris. Déterminés parfois dès la ségrégation cytoplasmique, ces organisateurs sont capables à eux seuls de spécifier l'axe dorso-ventral et jouent de ce fait un rôle prépondérant dans la différenciation dorso-ventrale des feuillets embryonnaires et en particulier du mésoderme.

3.1. La formation du mésoderme chez *Xenopus laevis*

Contrairement à la Drosophile, l'approche génétique directe à longterm a été impossible chez cet organisme et les données relatives au contrôle génétique de la formation du mésoderme restent encore parcellaires (Kimelman and Griffin, 1998). De nombreuses expériences de greffes, d'injections d'ARNm, d'ADN et de protéines ont néanmoins permis de mettre en évidence la nature des voies de signalisation responsables de la formation du mésoderme chez le Xénope (Nieto, 1999).

La détermination et la spécification du mésoderme sont étroitement associées à l'établissement de l'axe dorso-ventral et font intervenir quatre signaux de natures différentes (Figure 36) (Sive, 1993).

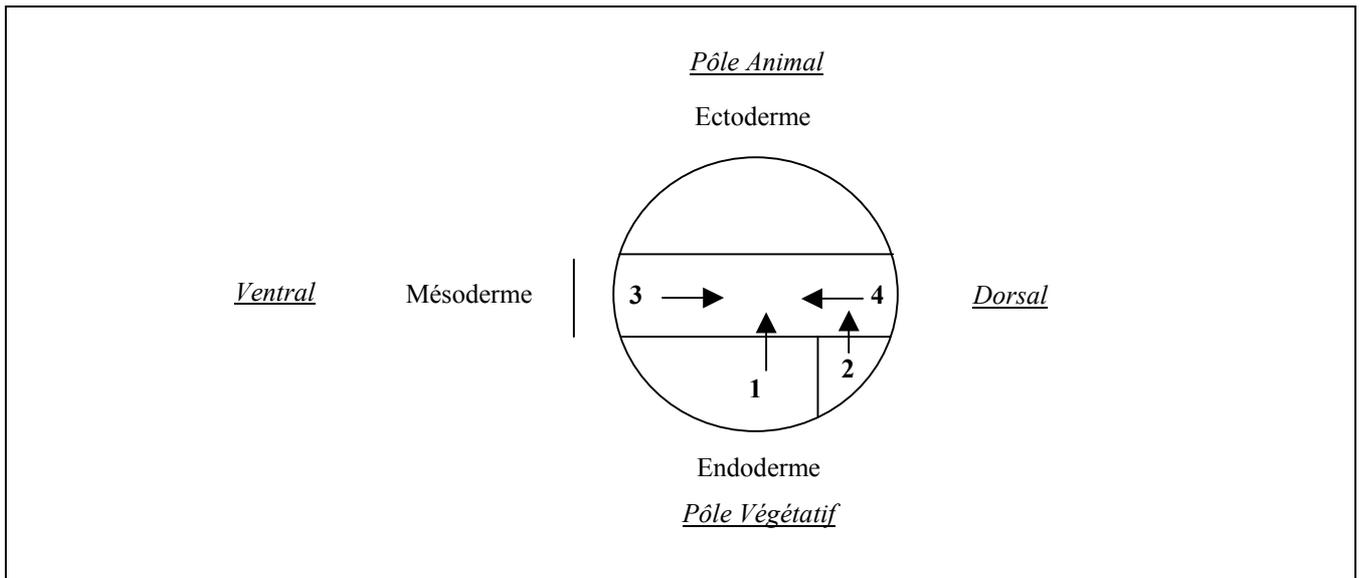


Figure 36: Détermination précoce du mésoderme chez le Xénope: Modèle à quatre signaux.

Selon ce modèle, les deux premiers signaux proviennent de l'endoderme végétatif et induisent la formation du mésoderme au niveau de la zone marginale équatoriale. Deux signaux supplémentaires émanant du mésoderme provoquent alors sa différenciation dorso-ventrale. Il reste cependant extrêmement difficile de discriminer avec certitude les gènes nécessaires à la détermination générale du mésoderme, de ceux utilisés uniquement pour sa différenciation dorso-ventrale (Harland and Gerhart, 1997).

On s'accorde généralement pour dissocier les deux premiers signaux inducteurs en un signal endodermique dorsal provenant de l'inducteur de Nieuwkoop (Nieuwkoop, 1969) et en un signal plus général, localisé de façon ubiquitaire dans l'endoderme végétatif. Le signal dorsal induirait spécifiquement la zone marginale dorsale pour établir l'organisateur de Spemann à l'origine de la spécification dorsale du mésoderme (chorde neurale et somites) (Speman and Mangold, 1924). Le signal ventral spécifiant quant à lui le mésoderme ventral et latéral (système circulatoire, mésoenchyme et muscles) (Figure 36) (Heasman, 1997). Après la première étape d'induction et de détermination, la différenciation dorso-ventrale du mésoderme s'effectuerait par interactions réciproques d'un signal dorsalisant en provenance de l'organisateur de Spemann et d'un signal ventralisant en provenance du mésoderme ventral.

Si la nature et le mode d'action de ces signaux demeurent encore en grande partie inconnus, on a cependant déjà identifié certaines des voies de signalisation qui contrôlent ces processus. Ainsi, les voies $TGF\beta^{27}$, Wnt/β caténines et FGF^{28}/MAP kinases jouent un rôle prépondérant dans les différentes étapes de l'induction du mésoderme (Harland and Gerhart, 1997; Massagué, 1998; Sokol, 1999).

²⁷ Transforming Growth Factor β

²⁸ Fibroblast Growth Factor

Cependant, et malgré de nombreux travaux, les facteurs maternels permettant l'activation de ces différentes voies restent encore mystérieux (Agius et al., 2000). Bien que l'on ait longtemps soupçonné l'*Activine* et *Vg1* (deux TGF β) de jouer un rôle majeur dans le contrôle maternel de ces processus, aucun résultat robuste ne vient pour l'instant confirmer ces suppositions (Kimelman and Griffin, 2000; Schier and Shen, 2000). La découverte récente du facteur de transcription *VegT* a cependant permis de formuler de nouvelles hypothèses en ce qui concerne la voie TGF β . Ce facteur de transcription de la famille T-box (Papaioannou and Silver, 1998) est transcrit maternellement dans toute la région végétative de l'embryon et l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens a montré qu'il jouait un rôle essentiel dans l'activation de la voie TGF β et dans l'induction du mésoderme (Zhang et al., 1998).

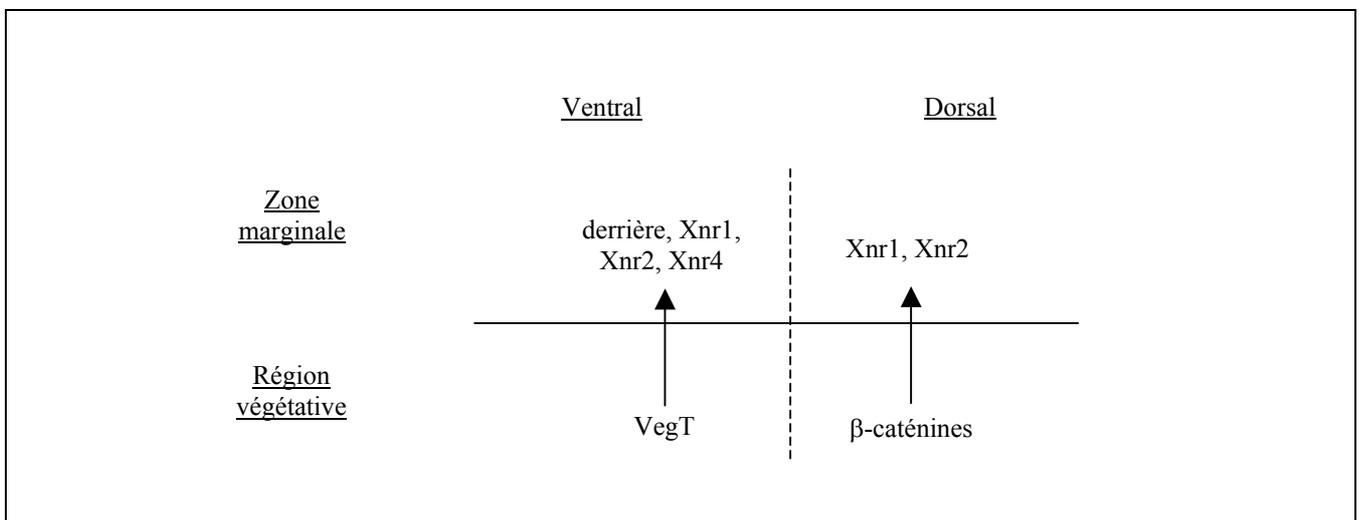


Figure 37: La voie VegT/TGF β et β -caténines.

Lors de la transition mid-blastuléenne (stade blastula), *VegT* contrôlerait l'expression zygotique des TGF β *derrière*, *Xnr*²⁹*1*, *Xnr2* et *Xnr4* au niveau de la zone marginale (Clements et al., 1999; Kofron et al., 1999; Sun et al., 1999; Hyde and Old, 2000). De plus, l'action de *VegT* serait renforcée dorsalement par celle des β -caténines qui activeraient également *Xnr1* et *Xnr2* (Wylie et al., 1996). L'expression plus élevée de *Xnr1* et *Xnr2* au niveau de l'organisateur de Spemann contribuerait à initier la différenciation dorso-ventrale du mésoderme (Osada and Wright, 1999; Kimelman and Griffin, 2000) (Figure 37).

Ces TGF β sont des signaux diffusibles qui vont se fixer aux récepteurs membranaires à TGF β Ser/Thr kinase de type II qui, en coopération avec les récepteurs à TGF β Ser/Thr kinase de type I, vont phosphoryler la protéine Smad2 et transduire ainsi le signal dans les cellules induites. En association

²⁹ Xenopus nodal related

avec Smad4, Smad2 va alors migrer dans le noyau pour former alors un complexe avec la protéine nucléaire FAST1 et activer la transcription spécifique de certains gènes comme par exemple *Mix2* (Massagué, 1996; Massagué, 1998).

La voie Wnt/ β -caténine est la seconde voie de signalisation importante pour l'établissement de l'organisateur et la différenciation dorsale du mésoderme. Ainsi, la déplétion des messagers maternels des β -caténines conduit à l'obtention d'embryons ventralisés, alors que l'injection ectopique de β -caténines induit la formation d'un nouvel axe dorsal (Heasman et al., 1994; Wylie et al., 1996). Les β -caténines sont des molécules régulatrices instables capables de se lier au facteur de transcription XTcf-3 et d'activer alors spécifiquement l'expression de certains gènes comme *Siamois* ou *Goosecoid* (Brannon et al., 1997; Heasman, 1997). L'ensemble de la voie étant vraisemblablement activé par l'expression maternelle de la protéine Wnt-8 (Larabell et al., 1997; Sokol, 1999). Les protéines Wnt vont se fixer au récepteur membranaire Frizzled qui va transduire le signal à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire des protéines Dishevelled, Axin, APC, GBP et va réguler négativement l'activité de la protéine kinase GSK3, empêchant ainsi la dégradation des β -caténines (Miller and Moon, 1996; Miller et al., 1999; Farr et al., 2000).

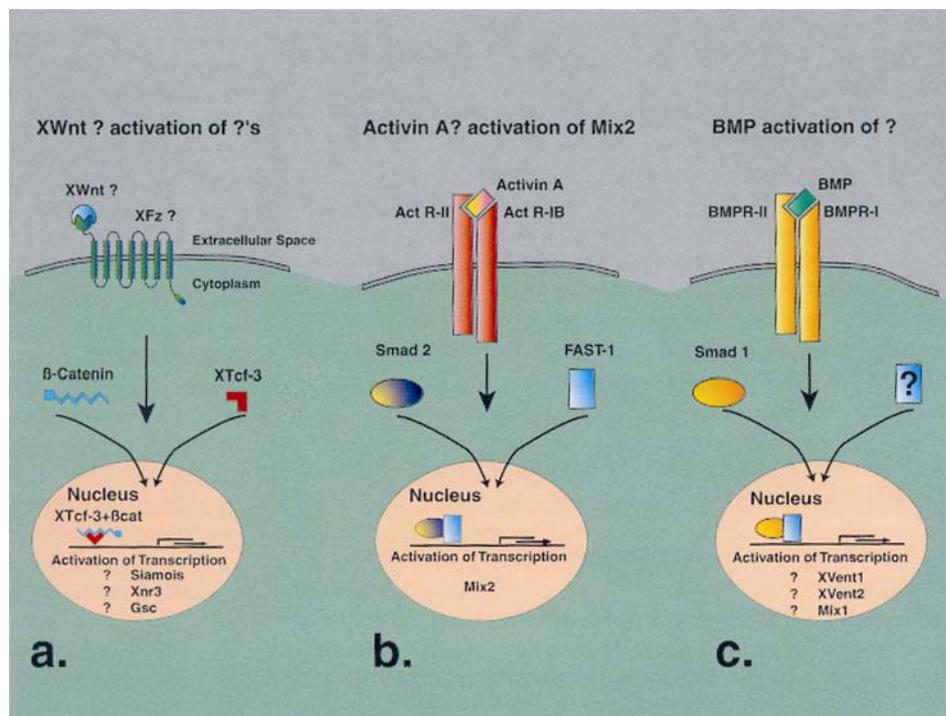


Figure 38: Formation du mésoderme et transduction du signal chez le Xénope. (a) voie Wnt/ β -caténines (b) voie TGF β /Activine (c) voie BMP (d'après Heasman, 1997)

Les voies *VegT/TGFβ* et *Wnt/β-caténines* évoquée ci-dessus agiraient de concert avec la voie FGF/MAP kinase dont on ignore le mode de fonctionnement (Labonne et al., 1995; Umbauher et al., 1995) pour permettre l'expression spécifiques, au niveau de l'organisateur de Spemann et du mésoderme dorsal, des gènes *Chordin*, *Noggin*, *Follistatin*, *Xnot*, *Frizbee*, *Pentallavis*, *Xnf3β*, *Siamois*, *Goosecoid*, *lim-1*, *XANF1* et *Xnr3* (Lemaire and Kodjabachan, 1996; Brannon et al., 1997; Heasman, 1997; Massagué, 1998; Wolpert et al., 1998; Sokol, 1999).

En parallèle une voie TGFβ BMP, qu'il reste encore à caractériser, activerait l'expression mésodermique ventrale des gènes *Xwnt8*, *BMP4*, *Xvent1*, *Xvent2* et *Mix1* (Heasman, 1997; Massagué, 1998; Wolpert et al., 1998) (Figure 38).

Parmi les gènes exprimés ventralement, BMP4 et Xwnt8 seraient les molécules responsable du troisième signal (Sive, 1993) et contribueraient à la différenciation ventrale du mésoderme (Jones et al., 1992; Christian and Moon, 1993; Jones et al., 1996; Hoppler and Moon, 1998). Chordin, Noggin et Follistatin constitueraient alors un signal antagoniste induisant la différenciation dorsale du mésoderme. Ces trois gènes possèdent en effet la particularité de se lier à BMP4 et de réprimer ainsi son action ventralisante. L'interaction de ces deux types de signaux contribuerait ainsi à établir un gradient ventro-dorsal de BMP4 responsable de la différenciation dorso-ventrale du mésoderme (Piccolo et al., 1996; Zimmerman et al., 1996; Iemura et al., 1998).

Enfin, et bien que l'on ignore précisément quelles sont les voies qui activent *in vivo* leur expression, les gènes *Xbra*, *Xsnail* et *Xtwist* sont également connus pour être exprimés de façon générique dans le mésoderme ou dans des régions spécifiques du mésoderme (chorde neurale) (Hopwood et al., 1989; Sargent and Bennett, 1990; Smith et al., 1991; Essex et al., 1993).

3.2. Le contrôle du mésoderme chez les autres vertébrés

Des homologues de la plupart des gènes évoquées ci dessus ont également été isolés chez le Danio, le Poulet et la Souris. D'une espèce à l'autre, il peut cependant exister des différences en ce qui concerne les domaines d'expression, les fonctions ainsi que les relations d'épistasie et de régulation à l'intérieur d'un réseau constitué des même gènes. Toutes ces modification sont bien évidemment à mettre en corrélation avec des mécanismes de développement sensiblement différents (Chapitre 2).

Chez les amniotes (Poulet et Souris), par exemple, on n'observe pas de phase évidente d'induction du mésoderme et c'est plutôt la formation du sillon ventral qui jouerait ce rôle inducteur (Streit and Stern,

1999). A l'opposé, Chez le Danio, le signal inducteur semble provenir du syncytium vitellin et l'on a mis récemment en évidence l'accumulation nucléaire dorsale des β -caténines au niveau de cette structure, ce qui tend à soutenir le rôle de la voie *Wnt* dans l'activation de l'axe dorso-ventral (Kelly et al., 2000). Par contre, toujours chez le Danio, *Spatedail* l'homologue de *VegT* n'est pas exprimé maternellement mais interviendrait plus tardivement pour réguler la subdivision rostro-caudale du mésoderme postérieur (somites). *Spadetail* définirait ainsi le mésoderme rostral alors que *No tail*, l'homologue de *Xbra* s'exprimerait comme chez le Xénope dans le mésoderme le plus dorsal et contribuerait ainsi à définir le mésoderme caudal (Kimelman and Griffin, 2000).

En ce qui concerne les voies FGF et TGF β de type Activine ou Nodal. On observe chez le Danio la présence d'Activine et de *Vg1* dans l'ovocyte, ce qui accrédite l'existence d'une voie TGF β précoce impliquée dans la formation du mésoderme. Chez le Poulet, l'Activine, *Vg1* et les *FGF* sont capable d'induire la formation du mésoderme et constitueraient des acteurs privilégiés dans la formation du mésoderme (Streit and Stern, 1999). Enfin, chez la Souris, la voie Activine ne semble pas requise pour la formation du mésoderme et les mutants pour les récepteurs de l'Activine subissent une gastrulation normale (Beddington and Robertson, 1999). Le TGF β Nodal a été isolé initialement chez la Souris comme étant nécessaire à la formation du mésoderme. Depuis, des membres de la famille *Nodal* ont été trouvés chez tous les vertébrés. On retrouve par exemple les gène *Cnr-1* chez le Poulet, *Xnr1*, *Xnr2*, *Xnr3* et *Xnr4* chez le Xénope, *Cyclops* et *Squint* chez le Danio. Ces gènes interviennent non seulement dans la détermination du mésoderme, mais également dans la définition de l'axe droite-gauche chez le Poulet, le Danio et la Souris (Schier and Shen, 2000). Les mécanismes de régulation de *Nodal* apparaissent également comme relativement bien conservés puisque des régulateurs de l'expression de ce gène du type EGF-CFC, Cerberus ou Lefty sont retrouvés chez le Xénope (*cerberus*, *Xatv*), la Souris (*crypto*, *cryptic*, *lefty1*, *lefty2*), le Danio (*one-eyed pinehead*, *lefty*) et le Poulet (*caronte*).

Chez le Danio, la voie Nodal semble en outre être régulée par un signal FGF (Rodaway et al., 1999) alors qu'à la différence du Xénope, la formation du mésoderme ventral semble requérir une voie TGF β non nodal (Kimelman and Griffin, 2000).

Les gènes aval de la voie TGF β Nodal (Smad et ses récepteurs) sont également retrouvés chez tous les vertébrés ce qui tend à démontrer que c'est l'ensemble de la voie qui est conservée et impliquée dans la formation du mésoderme chez les vertébrés (Whitman, 1998).

Si l'on s'intéresse maintenant aux signaux qui chez le Xénope interviennent dans la différenciation dorso-ventrale du mésoderme, on retrouve également des homologues de BMP, chordin, noggin et de follistatin chez les autres vertébrés. BMP2,4,7 s'expriment dans le mésoderme ventral et extra-

embryonnaire chez le poulet. Cependant et contrairement au Xénope, *noggin* et *follistatin* ne sont pas exprimés dans les centres organisateurs du Danio et du Poulet (Bauer et al., 1998; Schier and Talbot, 1998; Streit and Stern, 1999). Chez le Danio, *chordin*, bien qu'exprimé de façon précoce avant la gastrulation est également impliqué dans la formation de l'axe dorso-ventral et bloque l'activité ventralisante de *BMP2b*. Chez le Danio en effet, l'homologue de *BMP4* s'exprime plus tardivement que chez le Xénope. *Chordin* est également exprimé de façon précoce chez le Poulet et active la formation du sillon central alors que *Noggin* induit la formation des somites (Schier and Talbot, 1998). Enfin pour finir, les homologues de *Gooseoid* s'expriment également dans le mésoderme dorsal (au niveau du nœud) chez la Souris et le Poulet et dans le mésoderme chez le Danio. Ceux de *Xnot* s'expriment respectivement dans la corde neurale chez le Poulet (*Cnot1*) (Stein and Kessel, 1995), et le Danio (*Floating Head*) (Talbot et al., 1995; Schier and Talbot, 1998). Les homologues de *Brachyury* s'expriment de même dans le mésoderme postérieur et la corde neurale de tous les vertébrés (Holland et al., 1995) et ceux de *HNF3 β /Pentallavis* existent également chez la Souris et le Danio (Dirksen and Jamrich, 1995; Magnuson and Faust, 1995). Enfin, les homologues de *Snail* et de *Twist* s'expriment dans le mésoderme chez la Souris, le Danio et le Poulet (Chapitre 5).

4. Comparaison Protostomiens/Deutérostomiens

Bien que les choses semblent très dissemblables, il est frappant de constater que l'on retrouve des éléments communs chez les deutérostomiens et les protostomiens.

Par exemple, les molécules *Dpp/BMP*, *sog/chordin* sont dans les deux cas impliquées dans la différenciation dorso-ventrale du mésoderme. En réalité c'est une bonne partie de la cascade déterminant la différenciation de l'axe dorso-ventral qui est conservée, puisque les gènes *Tolloid* et *Twisted Gastrulation* qui régulent l'expression de *Dpp* et de *Sog* chez la Drosophile ont conservé cette fonction chez le Xénope (*XTsg/Xolloid*) (Goodman et al., 1998; Mullins, 1998; Oelgeschläger et al., 2000) et le Danio (*tolloid*) (Connors et al., 1999). Il existe cependant une différence majeure en ce qui concerne l'expression des gènes *Dpp/BMP* et *Sog/Chordin* chez les protostomiens et les deutérostomiens. En effet, chez la Drosophile l'expression de *Dpp* est dorsale et celle de *sog* est ventrale, alors que chez les vertébrés (Xénope et Danio) c'est *BMP* qui est exprimé ventralement et *chordin* qui s'exprime dorsalement. Cette observation saisissante a d'ailleurs récemment remis en perspective la théorie de Geoffroy Saint Hilaire concernant l'inversion dorso-ventrale des plans d'organisation, survenue lors de la divergence deutérostomiens/protostomiens (Saint-Hilaire, 1822; Arendt and Nübler-Jung, 1994; Nübler-Jung and Arendt, 1994; Lacalli, 1995; DeRobertis and Sasai, 1996; Ferguson, 1996; Gerhart, 2000).

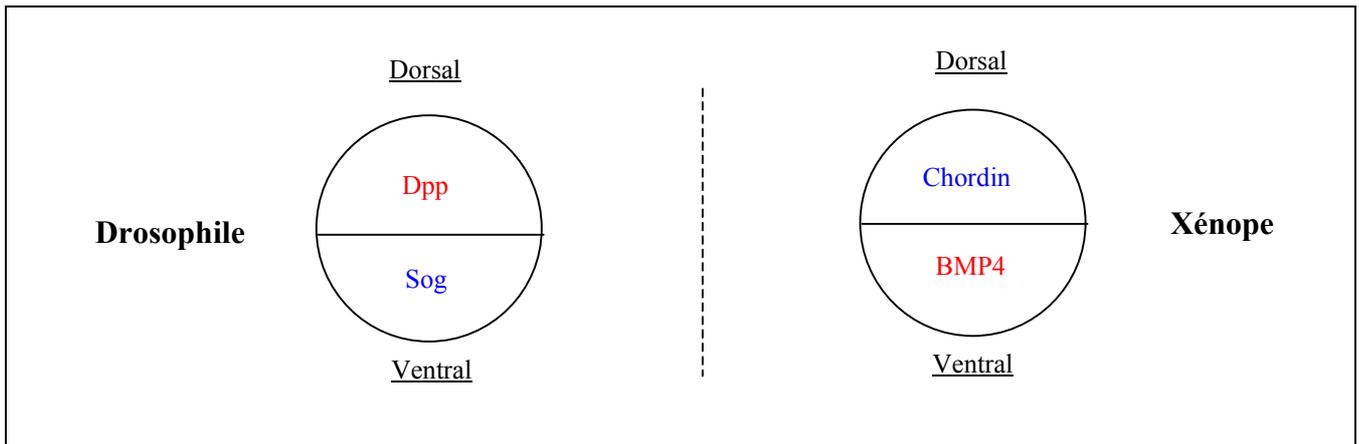


Figure 39: L'inversion de l'axe dorso-ventral entre les protostomiens et les deutérostomiens.

Gooseoid, semble t-être un autre gène très conservé entre deutérostomiens et protostomiens. Cependant, l'expression ectodermique de ce gène chez la drosophile semble indiquer que sa fonction a divergé entre les deux groupes (Goriely et al., 1996).

Chez la Souris et le Danio, l'expression de *Brachyury* permet la différenciation du mésoderme dorsal et de la corde neurale. Chez le Xénope, en revanche, si l'expression de *Brachyury* suffit pour la différenciation du mésoderme dorsal, il faut en revanche la co-expression de *Brachyury* et de *Pintallavis* pour permettre la différenciation de la corde neurale (O'Reilly et al., 1995). De façon assez étonnante, chez la Drosophile on note également la co-opération de *Brachyenteron* (*brachyury*) et de *fork head* (*Pintallavis*) lors de la détermination du mésoderme viscéral caudal (Kusch and Reuter, 1999). L'expression et la fonction de détermination mésodermique de ces deux gènes semblent donc conservées chez les deutérostomiens et les protostomiens.

Tinman et *bagpipe* sont deux gènes à homéo domaine responsables de la différenciation du mésoderme dorsal chez la drosophile (musculature cardiaque et viscérale circulaire). Chez les vertébrés, les homologues de *tinman* et *bagpipe* semblent également jouer un rôle dans la différenciation des tissus cardiaques et des muscles viscéraux (Xénope) (Bodmer and Venkatesh, 1998; Tanaka et al., 1998; Evans, 1999). L'expression mésodermique des ces deux gènes semble donc également conservée chez les deutérostomiens et les protostomiens.

Snail et *Twist* sont nous l'avons vu deux gènes majeurs du contrôle de la formation du mésoderme chez la Drosophile. Bien que leurs homologues chez les vertébrés s'expriment également dans le mésoderme, leur rôle semble être sensiblement différent (Chapitre 4).

5. Conclusion

L'étude de la petite dizaine de gènes évoqués ci dessus devrait nous apporter de nombreuses informations quant à l'éventuelle l'homologie du mésoderme chez les *Bilateria*. Devant l'ampleur du travail que représentait, il y a quatre ans, l'étude simultanée d'une dizaine de gènes, j'ai dû me résoudre à restreindre mon étude à deux de ces gènes: *Snail* et *Twist*.

Le choix de ces deux gènes était principalement motivé par leur rôle central dans la détermination du mésoderme chez la *Drosophile*. Plus que des gènes impliqués dans la différenciation du mésoderme (*tinman*, *bagpipe*, *brachyury*, *fork head*, *dpp*) nous recherchions en effet ceux qui pourraient être les gènes clés de la détermination de ce feuillet. Rappelons en effet, que l'on observe une disparition du mésoderme chez les drosophiles double mutantes pour ces gènes.

Afin de vérifier l'hypothèse d'une expression mésodermique de ces gènes chez tous les *Bilateria*, j'ai donc entrepris de cloner et de caractériser des homologues de *Twist* et de *Snail* chez des animaux appartenant au groupe sous étudié des lophotrochozoaires. Seuls les résultats concernant le gène *Snail* seront présentés ici.

Partie B - Approche expérimentale

Caractérisation de gènes homologues de

Snail* chez *Patella vulgata

Deux gènes sont dits homologues s'ils sont hérités d'un ancêtre commun (Fitch, 1970). Deux gènes homologues sont orthologues s'ils correspondent à des descendants directs d'un gène initialement présent chez l'ancêtre commun des deux espèces considérées. Si deux gènes homologues résultent d'un événement de duplication intra-spécifique, on parle alors de gènes paralogues (Fitch, 2000). Dans tous les cas, le niveau d'identité entre leurs séquences respectives reflète à la fois le temps écoulé depuis la duplication et la pression de sélection à laquelle est soumise leur séquence.

Ces définitions ne font aucune hypothèse quant à la fonction des gènes dupliqués. Deux gènes homologues peuvent ainsi avoir des fonctions analogues ou totalement différentes. Dans le cas d'une fonction analogue, deux hypothèses sont alors envisageables. Il s'agit soit de la conservation de la fonction ancestrale, soit les deux gènes ont acquis cette fonction par convergence. La recherche de nouveaux homologues chez de nouvelles espèces et l'étude de leur fonction permet alors parfois de trancher entre ces deux hypothèses et de déterminer la fonction du gène ancestral.

C'est ce type d'approche qui guide notre travail. En effet, dans l'hypothèse d'un support génétique de l'homologie du mésoderme, nous avons déjà retenu un petit nombre de gènes (Chapitre 3) dont l'expression et la fonction semblent conservées chez les ecdysozoaires et les deutérostomiens.

Parmi ceux-ci, je vais m'intéresser plus particulièrement au gène *Snail*. S'agit-il effectivement comme nous le pensions, lorsque j'ai débuté ce projet, d'un des gènes majeurs impliqués dans le contrôle de la formation du mésoderme ? La recherche de gènes homologues et l'étude de leur expression chez les lophotrochozoaires devrait nous permettre de répondre à cette question.

1. Choix d'un organisme modèle représentant les lophotrochozoaires

Avant de rechercher la présence et d'étudier l'expression de gènes homologues chez les lophotrochozoaires, il nous fallait choisir, au préalable, l'espèce sur laquelle faire porter nos travaux. A la différence des deutérostomiens et des ecdysozoaires, il n'existe pas chez les lophotrochozoaires d'organisme modèle dont l'usage soit aussi largement répandu que celui des modèles les plus classiques utilisés en biologie du développement (Chapitre 1).

Parmi ce groupe sous-étudié, un certain nombre de phylum (Annélides, Bryozoaires, Echiuriens, Entoproctes, Mollusques, Némertes, Plathelminthes, Rotifères et Sipunculides) partagent un développement spiral ancestral (*Spiralia*) (Costello and Henley, 1976; Nielsen, 1995). L'une des principales caractéristiques de l'embryologie de ce groupe consiste en la formation précoce³⁰ du mésoderme à partir d'une cellule souche unique, le mésentoblaste (Chapitre 1). Cette caractéristique nous conduit à rechercher notre modèle parmi les Annélides et les Mollusques. En effet, l'embryologie précoce de nombreuses espèces appartenant à ces deux phylums est relativement bien décrite, ce qui devrait grandement faciliter notre étude. Mais surtout, l'existence au sein des *Spiralia* d'une cellule précocement déterminée pour fournir l'essentiel du mésoderme laissait espérer un test direct de l'hypothèse de l'implication du gènes *Snail* dans cette détermination: verrait-on *Snail* s'exprimer dans le mésentoblaste ? Si en dépit de modalités de formation différentes, le rôle de gènes homologues était mis en évidence dans sa détermination, cela renforcerait l'hypothèse d'une homologie du mésoderme.

Nous avons donc réalisé en parallèle chez deux Annélides (*Enchytraeus albidus* et *Sabellaria alveolata*) et deux mollusques (*Mytilus galloprovincialis* et *Patella vulgata*), une première étude de faisabilité afin d'estimer la possibilité de se procurer des animaux matures, d'étudier les conditions d'entretien des cultures et de mesurer la facilité d'obtention et de manipulation des embryons. Le mollusque *Patella vulgata* s'est alors avéré être l'espèce qui répondait le mieux à l'ensemble de ces critères. Nous avons donc décidé de concentrer l'essentiel de notre travail sur cet organisme. Un argument important en faveur de la Patelle était également l'existence d'une équipe hollandaise possédant une grande compétence dans le domaine de l'embryologie descriptive et expérimentale de cette espèce et qui avait également démarré des approches moléculaires.

³⁰ Selon les espèces, l'embryon est alors constitué de quelques dizaines voire d'une centaine de cellules (van den Biggelaar et al., 1996; van den Biggelaar et al., 1997).

2. Un organisme modèle: *Patella vulgata*

Patella vulgata, est un mollusque archaeogastéropode relativement commun sur les côtes rocheuses de la façade atlantique nord (Bretagne et Royaume-Uni). Chez cette espèce, les deux sexes sont généralement séparés et la période de reproduction s'étend de la mi-octobre à la fin mars (Smith, 1935). Les individus sexuellement matures libèrent leurs gamètes lors des tempêtes d'hiver et la fécondation externe se produit au hasard de la rencontre des gamètes. Le développement de cet animal a été décrit pour la première fois par Patten (Patten, 1885). Il est de type spiral (Chapitre 2) et conduit à la formation d'une larve trochophore caractéristique (Figure 40). Après quelques jours, la larve devenue véligère va adopter un mode de vie sédentaire (la reptation sur le substrat remplace alors la nage en pleine eau), avant de subir une importante métamorphose.

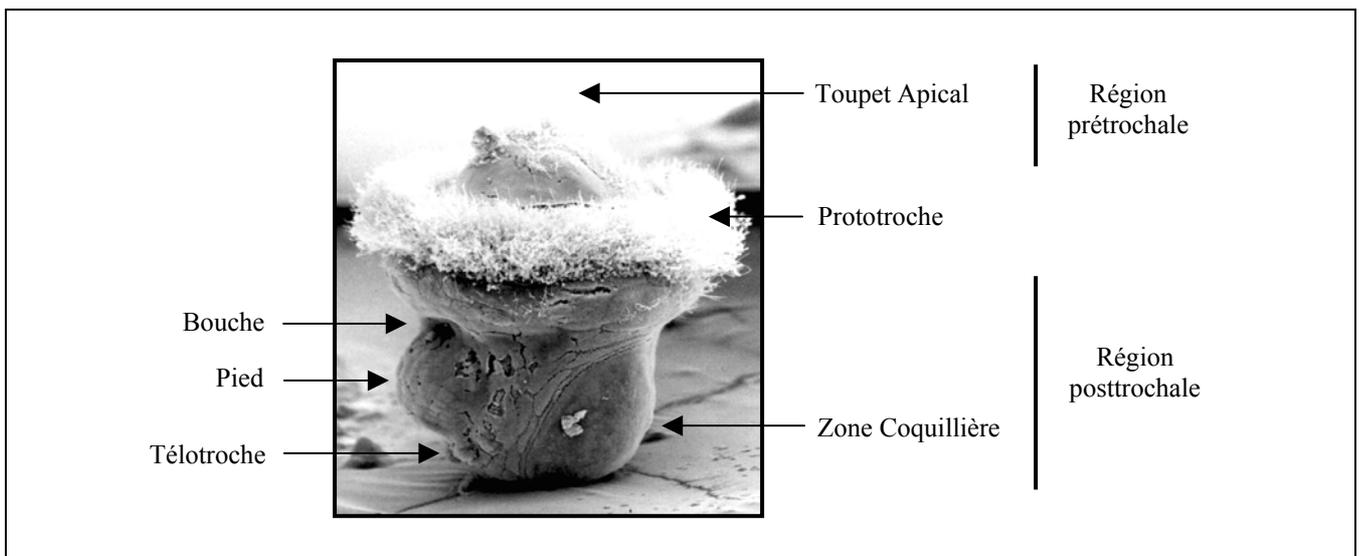


Figure 40: Larve trochophore de Patelle, 23h après la première division (d'après Damen et al., 1996)

Bien que l'on soit pour l'instant incapable de reproduire en laboratoire l'ensemble du cycle de développement de la Patelle, la fécondation *in vitro* de ce mollusque est assez simple à réaliser et permet d'obtenir jusqu'à plusieurs milliers d'embryons asynchrones (van den Biggelaar, 1977). Après fécondation, les embryons se développent normalement durant 24 à 48 heures. Le taux de survie demeurant faible au-delà de ces deux premiers jours, nous avons pour l'instant restreint notre étude aux 36 premières heures du développement de l'embryon de Patelle (Figure 41).

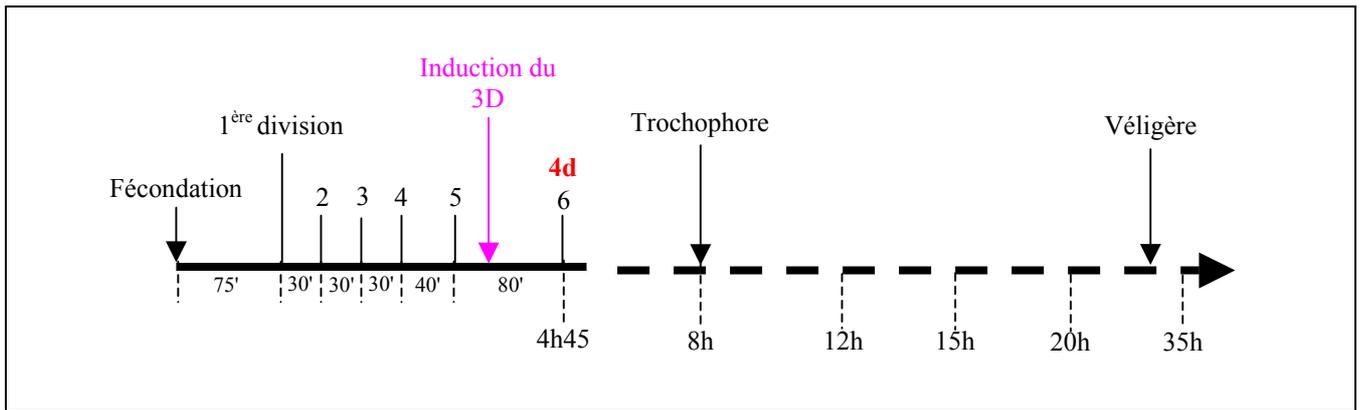


Figure 41: Table du développement précoce de la Patelle, à 19°C.

3. Gros plan sur le gène *Snail*

Ce paragraphe constitue l'introduction d'un projet d'article intitulé "Hypothetical ancestral function of the *Snail*-related genes in *Bilateria*" (Annexes) et qui doit reprendre une partie des résultats exposés dans ce chapitre.

A differentiated third germ layer, the mesoderm, is a characteristic of all bilaterally symmetrical animals (*Bilateria*). Two major lines of bilaterians, protostomes and deuterostomes, appear, however, on a purely descriptive basis, to specify their mesoderm during early development through quite different mechanisms.

Recent molecular phylogenies (Halanych et al., 1995; Aguinaldo et al., 1997), as well as a reanalysis of morphological characters, have shown that bilaterians are subdivided in three major clades: deuterostomes, ecdysozoans and lophotrochozoans. Of the three clades, only two comprise "model" organisms who have been subjected to intensive molecular embryological approaches. We have set out to analyse the mechanisms of mesoderm specification in the third clade, lophotrochozoans and have focussed on the mollusc *Patella vulgata* since there was a wealth of descriptive and experimental embryology carried out on this genus.

Our approach consisted in identifying a number of genes known or thought to be intimately involved in mesoderm specification in model organisms, specially *Drosophila*, and studying their time and pattern of expression in early *Patella* embryogenesis. Here, we report the analysis of the *Patella* homologue of the *Snail* gene.

The *snail* gene was first isolated as a zygotic lethal mutation in *Drosophila melanogaster*, responsible for a partial dorsalization of the embryo (Simpson, 1983; Nüsslein-Volhard et al., 1984). In these

mutants, no ventral furrow is seen at gastrulation, and no or very few mesodermal tissues are formed (Simpson, 1983; Grau et al., 1984). This gene encodes a transcription factor (Boulay et al., 1987; Leptin, 1991; Kasai et al., 1992) that possesses a characteristic domain composed by 4 canonical C-X₂-C-X₁₂-H-X₃-H motives and one variant C-X₂-C-X₁₂-H-X₄-C motif in its amino terminus (Boulay et al., 1987; Klug and Schwabe, 1995). This “*snail*-box” (Whiteley et al., 1992) domain binds to the same canonical E-box sites (CAGGTG), as do bHLH transcription factors (Mauhin et al., 1993).

In *Drosophila*, *Snail* is first expressed at gastrulation in the presumptive mesoderm (at the ventral side of the blastoderm embryo) (Alberga et al., 1991; Leptin, 1991; Reuter and Leptin, 1994) where it represses ventrolateral neurogenic genes like *rhomboid* or *single-minded* (Leptin and Grunewald, 1990; Kosman et al., 1991; Leptin, 1991; Ip et al., 1992; Kasai et al., 1992; Hemavathy et al., 1997; Nibu et al., 1998) and activates genes like *zfh1* or *heartless* (Lai et al., 1991; Casal and Leptin, 1996). Later in development, *snail* also appears in the midgut (endodermal derivative), in part of the Central Nervous System (CNS) and Peripheral Nervous System (PNS) (neuroblasts) (Ip et al., 1994), and in presumptive wing and haltere disc precursors (Alberga et al., 1991; Leptin, 1991).

Based on the presence of the “*snail*-box”, at least 5 other *snail*-related genes have been identified in *Drosophila melanogaster*: *escargot* (Whiteley et al., 1992), *scratch* (Roark et al., 1995), *worniu* (Ashraf et al., 1999), and *CG12605*, *CG17181*, two more divergent putative neural genes identified through the *Drosophila* genome project (Adams et al., 2000).

Escargot expression is mainly ectodermal and has been found in neurogenic and/or neural tissues (ventral ectoderm, developing PNS, and CNS), in imaginal cells (eye-antennal, leg, wing, haltere and genital discs, abdominal segment histoblasts, and optic lobe), and in trachea (Whiteley et al., 1992; Hayashi et al., 1993). *Escargot* has been shown to bind to the same E-box sequence as *snail* (Fuse et al., 1994; Fuse et al., 1996), and to be involved in regulation of diploidy in imaginal cells by inhibiting endoreplication (Hayashi et al., 1993; Fuse et al., 1994). It also controls tracheal fusion by activating the expression of epithelial tube fusion genes like DE-cadherin (Samakovlis et al., 1996; Tanaka-Matakatsu et al., 1996).

Worniu is expressed in precursor cells of the developing brain, in cells in the head region, and in the delaminating neuroblasts (Ashraf et al., 1999). *Scratch*, the last one for which expression data are available, has been detected in neuronal precursor cells (CNS and PNS) where it is assumed to be a pan-neural gene (Emery and Bier, 1995; Roark et al., 1995).

In *Drosophila*, the genes of this family have partial overlapping expression patterns and share the same binding sites. Moreover, three of them (*snail*, *escargot* and *worniu*) have the ability to compensate for the two others at least in the CNS (Ashraf et al., 1999) and two (*snail* and *escargot*) have the same

target genes in the wing cells (Fuse et al., 1996). When we consider the different functions of the *snail*-related genes, these genes have at least four distinct functions in *Drosophila melanogaster*. They are involved in (i) mesoderm formation, (ii) gastrulation processes (ventral furrow formation), (iii) the control of imaginal cell endoreplication and (iv) the induction of neural cell fate (neuroblasts).

Members of the *snail* family have been identified in other ecdyozoan protostomes, i.e in arthropods (Sommer et al., 1992), and nematodes (Metzstein and Horvitz, 1999), and in deuterostomes, i.e. in echinoderms and chordates (Sargent and Bennett, 1990; Nieto et al., 1992; Smith et al., 1992; Sommer et al., 1992; Hammerschmidt and Nusslein-Volhard, 1993; Thisse et al., 1993), although they are more closely related to *escargot* than to *snail*.

Despite the fact that partial or complete *snail* related genes have been cloned in almost ten other arthropods, expression data are available only for the short germ band insect *Tribolium castaneum* in which species it is very similar to that observed in *Drosophila* (Sommer and Tautz, 1994). In *Caenorhabditis elegans* as in *Caenorhabditis briggsae*, the function of the the *snail*- related *ces-1* is quite different, indeed it is an apoptosis inhibitor of specific neural cells (Metzstein and Horvitz, 1999).

To our knowledge no expression data are available for the echinoderms to date. In urochordates, a *snail* homologue has been isolated in two different ascidian species (*Halocynthia roretzi* (Wada and Saiga, 1999) and *Ciona intestinalis* (Corbo et al., 1997)). In both cases *snail* is expressed in muscle (tail bud) and trunk mesenchyme precursors as well as in CNS precursors (lateral ependymal cells and anterior cerebral vesicle) (Corbo et al., 1997; Erives et al., 1998; Fujiwara et al., 1998; Wada and Saiga, 1999).

A *snail* homologue in a Cephalocordate (*Branchiostoma floridae*) is expressed in presomitic and somatic mesoderm, in lateral neural plate, along the lateral edge of the neural plate, and in a mass of cells in the tail bud (Langeland et al., 1998).

In vertebrates, the *snail*-related genes are split in two subfamilies, the *snail* and the *slug* subfamilies respectively. Each species studied to date possesses at least one copy of each subfamily (except zebrafish where no *slug* homologue has been found so far).

In vertebrates, *snail* is also expressed in migrating neural crest cells, but expression was also detected in undifferentiated and migrating mesoderm, in somites and limb bud progress zone (Sargent and Bennett, 1990; Nieto et al., 1992; Smith et al., 1992; Mayor et al., 1993; Buxton et al., 1997; Isaac et al., 1997; Ros et al., 1997; Linker et al., 2000). *Snail* was also shown to be involved in left-right

asymmetry in chicken heart (Isaac et al., 1997) and control of endoreplication in trophoblast giant cells of the rodent placenta (Nakayama et al., 1998). A recent key finding about the function of *snail* in vertebrates is that it plays a role in the control of Epithelial-Mesenchymal Transitions (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Veltmaat et al., 2000) and was shown to act by repressing E-cadherin expression through the E-box in the mouse and human E-cadherin promoter (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000).

As mentioned above, there is no *slug* gene homologue in *Brachydanio rerio*, but the zebrafish does have two *snail* genes (Hammerschmidt and Nusslein-Volhard, 1993; Thisse et al., 1993; Thisse et al., 1995). They are both expressed in mesoderm (involuting cells, cephalic and axial), adaxial cells, in somites, in prospective tail bud, in neural crest and neural crest derivatives. Their expression patterns are however not completely identical. Both are suspected to control cell adhesivity and/or cell mobility (Hammerschmidt and Nusslein-Volhard, 1993; Thisse et al., 1993; Thisse et al., 1995).

Only one member of the *slug* subfamily has been isolated in *Xenopus*, chicken, mouse and human (Nieto et al., 1994; Mayor et al., 1995; Savagner et al., 1997; Cohen et al., 1998) as is also the case for the *snail* sub-family in *Xenopus* and Chicken (Sargent and Bennett, 1990; Isaac et al., 1997), but two distinct *snail* homologues have been characterized in mouse and human (Nieto et al., 1992; Paznekas et al., 1999; Kataoka et al., 2000).

In all vertebrates for which data are available, the *slug* genes are expressed in migrating neural crest cells and neural crest derivatives (Nieto et al., 1994; Mayor et al., 1995; Jiang et al., 1998; Sefton et al., 1998; Linker et al., 2000) where they act as a transcriptional activator (LaBonne and Bronner-Fraser, 1998; LaBonne and Bronner-Fraser, 2000) and play a role in cell migration (Carl et al., 1999). Antisense injection experiments suggest that *slug* plays a role in Epithelio-Mesenchymal Transitions (EMTs) in this process (Nieto et al., 1994; Romano and Runyan, 1999; Romano and Runyan, 2000).

Smuc, the second *snail* member in mouse is expressed in skeletal muscle cells and thymus, it also binds to E-box sequences and seems to be involved in the control of myoblasts terminal differentiation (Kataoka et al., 2000).

In summary the *Snail*-related genes in vertebrates are involved in (i) Epithelio-Mesenchymal Transitions (ii) in control of endoreplication and (iii) are expressed in mesoderm (somites, neural crest).

Because only two major metazoan group (ectdysozoan and deuterostomes) were studied until now, all these data however do not allow any conclusion about the ancestral function (expression) of the *snail*

gene. Before being able to conclude, we need indeed to study the expression of the *snail*-related genes in the third and last metazoan group, namely the lophotrochozoans.

Here we present the characterization of two new members of *Snail*-related genes from the Gastropod Mollusc *Patella vulgata*. We cloned both genes, examined their sequence and showed their spatio-temporal expression patterns through whole-mount *in situ* hybridisation. To date, they are the first representatives of this gene family in any lophotrochozoan, and their expression pattern authorises speculations about the ancestral function of the *snail* gene in *Bilateria*. Where a mesodermal precursor function was previously evoked, and suggest that their ancestral function is more probably related to EMT and neural specification.

4. Recherche de gènes homologues de *Snail*

La recherche de gènes homologues chez une nouvelle espèce peut s'effectuer de plusieurs façons: recherche *in silico* dans les banques de données du type Genbank, crible à base stringence de banques d'ADN génomique ou d'ADN complémentaires à l'aide de sondes hétéro-spécifiques déjà disponibles, recherche par PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques ou "dégénérés".

Ne disposant pas de banques d'ADN génomiques ou d'ADN complémentaires de Patelle lorsque j'ai débuté mon travail de thèse, j'ai donc privilégié la recherche d'homologues par PCR.

4.1. L'approche par PCR

Désormais universellement utilisée dans tous les laboratoires de biologie moléculaire, la "Polymerisation Chain Reaction" (PCR) est une méthode rapide et sensible qui donne de bons résultats.

Rapide, la mise en œuvre de cette technique permet généralement d'obtenir un résultat en quelques heures. Extrêmement sensible, elle permet en outre de travailler sur du matériel peu abondant (moins de 50 ng de matrice suffisent pour une réaction de PCR). Elle est également peu sensible au protocole d'extraction d'acides nucléiques employé et permet l'amplification de matériel partiellement dégradé.

La PCR présente cependant plusieurs difficultés ou limitations qu'il est utile de connaître pour éviter certaines déconvenues.

Un certain nombre sont d'ordre purement technique. Notons par exemple l'existence de substances inhibitrices. L'ADN de certaines espèces se montre en effet parfois réfractaire aux premiers essais d'amplification, il est alors nécessaire de réaliser une purification de la matrice utilisée (phénol/chloroforme, colonnes de purification, chlorure de césium, *etc.*). Il faut signaler également qu'en raison même de son extrême sensibilité, la réaction de PCR est sujette aux contaminations de toutes sortes. L'adoption de méthodes de travail appropriées permet toutefois de limiter ces artéfacts: utilisation de cônes à filtres réduisant les effets "aérosols" lors des pipetages, manipulation dans un environnement stérile, *etc.*

Il existe également des limitations conceptuelles à la PCR, du moins pour l'usage qui est le notre, à savoir la recherche de gènes homologues chez une nouvelle espèce. Il faut par exemple que les séquences des gènes homologues connus possèdent des régions conservées suffisamment étendues (de l'ordre d'une dizaine d'acides aminés) pour nous permettre de concevoir les oligonucléotides utilisés pour l'amplification.

Lorsque l'on étudie des espèces phylogénétiquement éloignées les régions conservées correspondent souvent aux motifs fonctionnels les plus fortement contraints. Les zones susceptibles d'être amplifiées se limitent donc aux régions encadrées par deux motifs conservés. Ceci nous conduit souvent à n'amplifier que de courts fragments.

La recherche par PCR n'est pas une méthode exhaustive et n'offre pas la certitude d'amplifier toutes les séquences recherchées. Certaines séquences peuvent en effet avoir trop divergé pour être amplifiées à l'aide des oligonucléotides choisis.

Il existe de plus des effets de sélection et de dérive qui peuvent être importants lorsque l'on essaie d'amplifier des régions conservées par des familles multigéniques. Il s'agit là d'un effet stochastique qui privilégie l'amplification de certains gènes (Wagner et al., 1994). Pour limiter cet effet, nous réaliserons donc systématiquement plusieurs PCR indépendantes.

4.2. L'alignement des séquences disponibles en 1996

Afin de rechercher les zones conservées nous permettant de concevoir des oligonucléotides susceptibles d'amplifier des gènes homologues de *Snail* chez de nouvelles espèces, les séquences disponibles lorsque j'ai commencé ce travail ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalX (Figure 42) (Thompson et al., 1994).

Ces neuf gènes appartiennent à 5 espèces différentes: la Drosophile (*Snail*, *Escargot* et *Scratch*) (Boulay et al., 1987; Whiteley et al., 1992; Roark et al., 1995), le Danio (*zSnail1* et *zSnail2*)

Figure 42: Alignement des gènes de la famille *Snail*. Les quatre régions ayant servi à concevoir les oligonucléotides "dégénérés" utilisés pour l'amplification par PCR sont encadrées et l'orientation 5'-3' des l'oligonucléotides (page suivante) est représentée par une flèche. Les résidus caractéristiques des motifs à doigts de zinc (C et H), ainsi que les motifs SNAG et SLUG sont surlignés. La taille des protéines (nombre d'acides-amino) est indiquée du côté carboxy terminal.

```

Snail -----
Escargot MHTVEDMLVEKNYSKCPLKKRPVNYQFEAPQNHSNTPNEPQDLCVKKMEILEENPSEELIN-----
Scratch MPRCLIAKKWKAYPWLDRTEDTCNQQQQEQSAPNSPRELEELHLKSRRSTLDDDEEIDVVGDKFLIKLE
zSnail1 -----
zSnail2 -----
M_Sna -----
X_Sna -----
X_Slug -----
cSlug -----

```

```

Snail -----MAANY
Escargot -----VSDCCEDEGVDVDHTDDE
Scratch KQRTTADAAAAAATSSEAATSHSSNSSNMEASATTTTSCKCGPSSPTAGTTAPSPPPHSPEAATRVAGNV
zSnail1 -----
zSnail2 -----
M_Sna -----
X_Sna -----
X_Slug -----
cSlug -----

```

```

Snail KSCPLKKRPIVFVEERLPQTEALALTKDSQFAQDQPDLSLKRGRDEETQDYQQPEPKRDYVLNLSKTPE
Escargot HIEEDEDVDVDSDPNQTQAAALAAAAAVAAAAASVVVPTPTYPKYPWNNFHMSPTYAEFYRTINQP
Scratch YNGYTRELSPLHYTAYLPRMSEITVIRAAATALVAARTSGNGSGDQHLAVYQTPPSSTTSSPSCSPSGA
zSnail1 -----
zSnail2 -----
M_Sna -----
X_Sna -----
cSlug -----
X_Slug -----

```

```

Snail RNSSSS---NSCLLSPVETQD-----YLPTEIHMRLTAGTT--GYTTATPTTI
Escargot GHQILPL---RGDLIAPSSPDSLSGS-----LSPPPHYHLHGRASSVSPPMRSEMIHRPI
Scratch GDRYSPLSSGQTSSERKCFSSGTATLSLPPKKKDIYRPYSLDDKPAHGYRRRVPAEEDLHAAHAILDLSA
zSnail1 MP---RSFLVKKYFTS-----KRPNYSELECNQDTS--PDRYPLAELPA
zSnail2 MP---RSFLVKKYFTN-----KRPNYSELESQTDR----RYAVVPQCF
M_Sna MP---RSFLVRKPSDPR-----RKPNYSELQDACVEFTFQQPYDQAHLLA
X_Sna MP---RSFLVKKHFSAS-----KRPNYSELESQTVYIIS-PFIYDKFPV--
X_Slug MP---RSFLVKKHFNESA-----KRPNYGELDNHTVYIIS-PFLYERYPVSV
cSlug MP---RSFLVKKHFNSS-----KRPNYSELDNHTVYIIS-PYLYESYPVPI

```

SNAG

```

Snail N----PFQSAFVMAAG-----CNPISALWSSYQPHLAAFPSPASSMAS----
Escargot G----VRQHRFLPYPM-----PGYPSLGGYTHTHHHHAPISPAYSENS----
Scratch STAFHPPTQPHLQQQQQQQQHQQHHSQQQLAPQQHHYLPQQQQQQAHHTHLPTELAHAHLRSTS
zSnail1 -----VSNDFPVT-----CLTTGLVWD-----VSLLPSTL-----
zSnail2 -----PLDDPLVP-----KYPSTMLVWS-----SSALP-----
M_Sna A----IPPPEVLNP-----AASLPTLIWDS-----
X_Sna -----IPQPEILST-----GAYYTPLVWDT-GLLTFFFTSE-----
X_Slug -----LPQPDYSS-----VAYSPIVWT--GLLHPPLPSDLSPL-----
cSlug -----IPQPEILSS-----VAYNPITVWTTTGLLPSPLPNDLSPL-----

```


(Hammerschmidt and Nusslein-Volhard, 1993; Thisse et al., 1993; Thisse et al., 1995), le Xénope (*Xsna* et *Xslug*) (Sargent and Bennett, 1990; Mayor et al., 1995), le Poulet (*cSlug*) (Nieto et al., 1994) et la Souris (*M_Sna*) (Nieto et al., 1992).

Trois de ces cinq espèces possèdent des *paralogues* du gène *Snail*, nous pouvons donc considérer que nous sommes en présence ici d'une famille multigénique. Je parlerai donc par la suite de la famille des gènes *Snail*.

Il existe en outre une grande variabilité de taille entre les gènes d'arthropodes et de vertébrés. Les trois gènes de *Drosophile* sont, par exemple, en moyenne deux fois plus long que ceux des vertébrés (508 a.a. vs 262 a.a.). On note également que la région carboxy terminale de fixation à l'ADN (longue de 106 à 148 a.a. selon les espèces) est la seule qui soit réellement conservée entre toutes ces protéines. Cette conservation existe principalement pour les quatre motifs à doigts de zinc situés le plus en aval (n° 2,3,4 et 5, Figure 42) et qui constituent un motif spécifique de la famille *Snail*. Le premier motif n'est en effet pas conservé dans le gène de Souris (*M_Sna*) et dans l'un des deux gènes de *Danio* (*zSnail1*). Le reste de la séquence s'aligne très mal, voire pas du tout.

Plutôt que d'une famille de gènes homologues il est alors sans doute plus exact de parler de gènes d'un groupe de gènes possédant un motif homologue de fixation à l'ADN, le motif *Snail* (Whiteley et al., 1992).

Il existe également deux autres régions remarquables situées en amont de ce motif. Tout d'abord un petit peptide long d'une vingtaine d'acides-amino, situé dans la région amino terminale, le motif SNAG (*SNAIL/Gfi-1*) qui est conservé chez tous les gènes de vertébrés. Ce motif est également présent dans les protéines proto-oncogène de type *Gfi-1* et pourrait médier l'activité répresseur de transcription de ces protéines (Grimes et al., 1996). Enfin, une région de 29 résidus située immédiatement en amont du premier motif à doigt de zinc constitue une signature caractéristique des gènes *Slug* de vertébrés (Sefton et al., 1998).

4.3. Conception d'oligonucléotides spécifiques de *Snail*.

L'analyse de cet alignement (Figure 42) nous a permis de concevoir quatre familles d'oligonucléotides dégénérés: *Sna1W*, *Sna2W*, *Sna3C* et *Sna4C* (Tableau 1), correspondant aux séquences protéiques consensus des régions les plus conservées (Figure 42). Le site *Bgl II* a été ajouté en 5' pour faciliter le clonage des fragments amplifiés.

<u>Nom</u>	<u>Séquence (5' → 3')</u>	<u>Taille</u>	<u>N. Dég.</u>
Sna 1W	GA AGATCT GGN GCN YTN AAR ATG CAY AT G A L K M H	28	512
Sna 2W	GA AGATCT AAR GCN TTY WSN MGN CCN TGG K A F S R P W	29	8192
Sna 3C	GA AGATCT RAA NGG YTT YTC NCC NGT RTG [F P K E G T H]	29	1024
Sna 4C	GA AGATCT RTG NGC NCK NAR RTT NSW NCK RTC [H A R L N S R D]	32	262144

Tableau 1: Les oligonucléotides *Snail*. Sna3C et Sna4C sont sur le brin non codant.

Du fait de la dégénérescence du code génétique chaque oligonucléotide est en réalité constitué d'un mélange d'espèces différentes. Le niveau de dégénérescence (N. Dég.) indique le nombre d'espèces présentes dans le mélange. Par exemple Sna1W est constitué de l'ensemble des 512 oligonucléotides qui correspondent à la séquence protéique "GALKMH".

Pour un gène donné, on considère qu'une famille d'oligonucléotide est constituée d'espèces "utiles" qui vont permettre l'amplification et d'espèces "neutres", qui en raison de leur divergence avec la séquence cible, ne serviront pas lors de l'amplification. Bien évidemment, et c'est là l'intérêt de la PCR dégénérée, les espèces "utiles" et "neutres" sont différentes d'une séquence cible à l'autre. On considère généralement que plus le niveau de dégénérescence est élevé et plus le nombre d'espèces utiles, c'est à dire l'efficacité de l'amplification, diminue. On essaie donc de limiter au maximum le niveau de dégénérescence (Balavoine, 1996).

Dans les faits, j'ai observé que des oligonucléotides très dégénérés comme Sna 4C fonctionnent également très bien. On peut donc imaginer que dans ce cas, le faible nombre d'espèces utiles lors des tous premiers cycles d'amplification est compensé par la faible stringence des conditions d'hybridation des oligonucléotides (Annexes). Ainsi, ce n'est pas une espèce unique, celle dont la séquence est identique à 100 % à la région d'hybridation qui va permettre l'amplification lors du premier cycle, mais plutôt une petite sous population d'espèces. De même, lors des quatre cycles suivants et du fait des faibles conditions de stringence dans lesquelles nous nous plaçons, le nombre d'espèces utiles va croître progressivement par recrutement de nouvelles espèces qui peuvent à leur tour s'hybrider avec les molécules synthétisées lors des cycles précédents. On atteint donc finalement un niveau d'amplification tout à fait comparable à celui que l'on aurait pu obtenir avec des oligonucléotides dont le niveau de dégénérescence serait moindre.

Une réaction d'amplification dont la stringence est faible au cours des premiers cycles maximise donc la probabilité de réaliser une amplification exhaustive mais également celle d'obtenir de faux positifs.

une sonde un peu plus grande et avons criblé pour cela plusieurs banques d'ADN complémentaire d'embryons de différents stades (40 cellules et 16 heures après la première division) qui nous ont été fournies par André van Loon (Loon et al., 1993). Le criblage de 10^6 plages de lyse de la banque, réalisée à partir d'embryon de 16 heures, à l'aide du fragment de 196 bp préalablement obtenu par PCR m'a permis d'isoler un cDNA d'environ 1.6kb qui possède une phase ouverte de lecture de 393 amino acides (Figure 44) et qui code théoriquement pour une protéine de 45.1 Kd. Ce cDNA possède également des régions 5' et 3' UTR relativement courte (58 et 328 nt).

Il s'agit là du premier membre de la famille *Snail* isolé chez une espèce appartenant au groupe des lophotrochozoaires. Ce gène a été appelé *pv-Slak1* (Slak signifiant escargot en hollandais).

L'analyse de la séquence de cette protéine à l'aide du logiciel SAPS (Brendel et al., 1992) ne révèle aucun biais de composition ou de distribution qui soit significatif.

La recherche de motifs à l'aide du logiciel SMART³¹ (Schultz et al., 1998; Schultz et al., 2000) n'a permis de révéler aucun motif connu à l'exception des cinq doigts de zinc de la boîte *Snail*. De même, la recherche dans les banques par Blast 2.0, PSI-Blast (Altschul et al., 1997) ou FASTA³² ne nous a permis d'identifier que des protéines de la familles *Snail* déjà connues, ainsi que quelques protéines à doigt de zinc dont la fonction demeure inconnue. L'inspection visuelle de ses alignements nous conduit cependant à ne considérer comme significatif que les alignements des protéines *Snail*. Les protéines à doigts zinc identifiés n'étant majoritairement que de séquences putatives ou des séquences dont la fonction demeure inconnue. En outre ces alignements n'excèdent pas en général un ou deux doigts de zinc.

La même recherche en utilisant uniquement la région située en amont (253 a.a.) de la boîte *Snail* n'a permis d'obtenir aucun alignement significatif (inspection visuelle et "E-values" supérieures à 0,041).

³¹ Les banques criblées sont: Genbank, PDB, SwissProt, PIR, PRF et PROSITE.

³² J'utilise la matrice BLOSUM62 (Henikoff and Henikoff, 1992) avec une pénalité création de gap de 11 et d'extension de 1

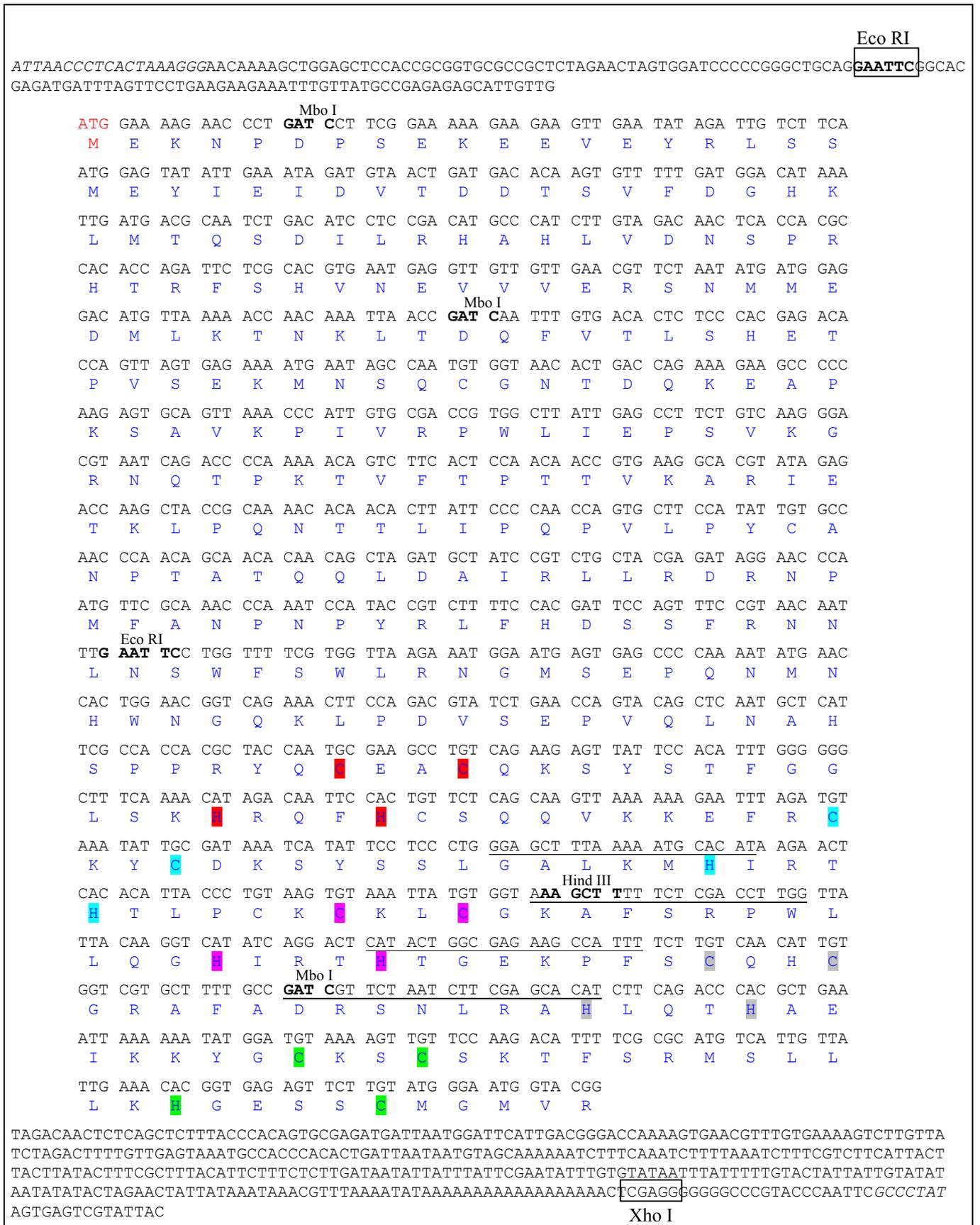


Figure 44: cDNA pv-*Slak1* isolé à partir d'une banque d'embryons de 16H. Les régions d'hybridation des oligonucléotides Sna1W, Sna2W, Sna3C, Sna 4C sont soulignées, les résidus les plus caractéristiques des doigts de Zinc sont surlignés en couleur. Les sites de clonage sont encadrés et les sites de restrictions Eco RI, Hind III et Mbo I sont représentés en gras.

6. Recherche de paralogues par Southern Blot

Comme je l'ai déjà mentionné, il existe de nombreux paralogues chez les métazoaires pour lesquels des membres de la famille *Snail* ont déjà été isolés (*Drosophile*, *Danio*, *Fugu*, *Homme*, *Poulet*, *Souris* et *Xénope*). J'ai donc réalisé une analyse par Southern Blot pour essayer de détecter chez la Patelle des paralogues qui auraient pu échapper à une amplification par PCR.

6.1. Analyse par Southern Blot: conditions expérimentales

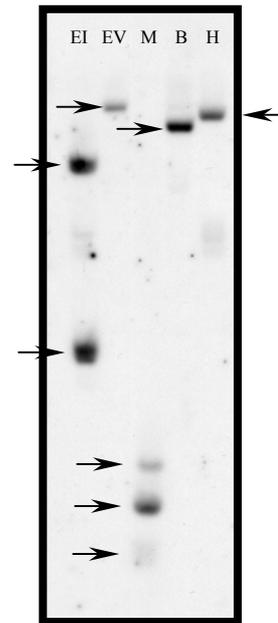
L'ADN génomique provenant d'un individu unique (Sambrook et al., 1989) a été digéré à l'aide des endonucléases de restriction: Bgl II, Eco RI, Eco RV, Hind III et Mbo I (NE Biolabs). Afin d'éviter les digestions partielles, la digestion a été poursuivie durant 24 à 37°C dans un volume de 500 µl, avec un nouvel ajout d'enzyme à l'issue des 12 premières heures de digestion. L'ADN a ensuite été dialysé 45 min sur filtre millipore (0,025 µm) contre du TBE 1X pour éliminer les sels des tampons de digestion qui pourraient perturber la migration électrophorétique des échantillons. Les produits de digestion ont alors été lyophilisés avant d'être repris dans un volume de 50 µl, déposés sur gel d'agarose 0.8% et enfin soumis à migration électrophorétique durant 16 heures (30 V/ A). Les échantillons ont ensuite été transférés sur membrane Hybond N+ (Amersham) (Sambrook et al., 1989). Les membranes ont été hybridées en tampon Church (Church and Gilbert, 1984) à 55°C, puis lavées (3x 15 min) à 60°C avant d'être mise en exposition.

La sonde utilisée correspondait à la totalité du fragment de 1.6 Kb du cDNA *Slak1*. Pour cela ce cDNA a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides T3 et T7 (en italique sur la figure) et le fragment ainsi obtenu a été marqué au P³² (Nanoprimer kit / Invitrogen).

6.2. Analyse par Southern Blot: Résultats

Si la Patelle ne possède aucun analogue de *Slak1* dont la séquence soit suffisamment identique pour permettre l'hybridation de la sonde utilisée (Cf. 5.1) on s'attend normalement à obtenir 1 seule bande de plus de 1.6 Kb dans le cas des digestions Bgl II et Eco RV, deux bandes pour Hind III (plus de 600 pb et plus de 1Kb) et Eco RI (plus de 700 pb et plus de 900 bp) et 3 bandes pour Mbo I (240 pb, 790 pb et plus de 400 pb).

Figure 45: Southern Blot. La séquence du cDNA *Slak1* a été utilisée comme sonde (1.6 Kb). Les enzymes utilisées sont Eco RI (EI), Eco RV (EV), Mbo I (M), Bgl II (B) et Hind III (H). 15 µg d'ADN a été déposé dans chacun des puits.



L'analyse du profil de restriction obtenu (nombre de bandes) suggère que chez *Patella vulgata*, le gène *pv-Slak1* ne possède pas de paralogues ou que leur séquence est suffisamment divergente pour ne pas être détectée dans ces conditions.

7. Criblage d'une banque d'ADN génomique et caractérisation d'un second gène *Snail*.

Une banque d'ADN génomique de Patelle (Loon et al., 1993) a également été criblée en parallèle à la banque de cDNA. Le criblage de 2.10^5 clones a été réalisé en utilisant le fragment de 196 bp amplifié par PCR.

Nous avons ainsi isolé un clone possédant un fragment qui a été sous-cloné par PCR à l'aide des oligonucléotides Nr1³³ et Nslong2³⁴. La séquence de ce fragment d'un peu moins de 5 Kb a été déterminée. Il possède une phase ouverte de lecture de 444 a.a. interrompue par un intron de 2 kb environ (Figure 46) et code pour une protéine de 50,4 Kd. Il s'agit de toute évidence d'un second membre de la famille *Snail*, qui a été baptisé *pv-Slak2*. Comme pour *pv-Slak1*, l'analyse de la séquence de cette protéine et la recherche dans les banques n'a pas permis de mettre en évidence d'élément significatif, à l'exception des cinq doigts de zinc carboxy-terminaux. Enfin, un cDNA correspondant à ce second gène a depuis été isolé par Lex Nederbragt (Université d'Utrecht), ce qui nous a permis de déterminer la séquence située en aval de l'oligonucléotide Nslong2 (Annexes).

³³ Situé dans le bras droit du phage λ (5' TAAAAGCAGAAGTCCAACCCAGATAACGAT 3')

³⁴ Chevauche en partie Sna2W (5' AGCTTTACCGCATAATTTACACTTACAGG 3')

CTAGAGGCGTGGCCTAATCCTTAACAGCTGCGTGTGATTGGCTAACAGGATGAAAGGAACCTTAGTAGCATTGCTGATTG		
GCTAGATCGGACATGAATGATATGGTTAAATAGAATAGTTAAATAAAGAGGTGGTATTTATAACTAACAGTTATACATGG		
TTTAGTGTGTGGATATCCTTCTACAGAGTCACATGTTTTCTACTATTGATACATGTTGAGCCCGTATAAAAATCAGGTC		
ATATAACGAACGCAGTCACCTTGTGAAACGCTAGGATATATAGGATAA	CTG TTT AAC CCT GAC AAG ATG	310
	* l f n p d k M	1
CCT CGC GCT TTC TTA ATC AAG AAA CGC GAT AAA AGT GAG TCG GAA ACG CAA ATC TTC AAT		370
P R A F L I K K R D K S E S E T Q I F N		21
CCA AGA TCG GAT AAT CCT CCG GCA GCA GCG GAT GTG GAA GAA GAT GAA GAA ACT ATT AAT		430
P R S D N P P A A A D V E E D E E T I N		41
GTT ACC GAT ACT GAT GAC ACG CCG ATG GAA GTT ACG GAA TCT AAC TTA AAA TCA AAT GAG		490
V T D T D D T P M E V T E S N L K S N E		61
GCA ACT TTA TCT CCT AAA GTT TTG GTG GAA GAG ATG CCG AAA CCT GTG GTG ACC CCG GTG		550
A T L S P K V L V E E M P K P V V T P V		81
CCA CGC TTG TCA CCC ATA CAA CAG AAG AGA GAT ATG TAT TTG A	ACA GG	615
P R L S P I Q Q K R D M Y L T	g m *	96
GTGCCTTGGTCTACAACAACAACCTATTTTGAAGATTTGGATCTCAGAATCGCCTTTAATTTATTAGACCGGTGTTAA		695
ATAGTTTCGGAAATATCGCAGTTGGTAATTTGACAAATGCAAAATGTTTATCGGGATTGCTGATGGCCATTGCTGTGTG		775
AATTACTATTCACATAATGATTAATTTCTAGATACCATTTGTGAATTTAGATAACAATTTCTAGATACCAACTTATTTATTC		855
TACAAACTCATTCATGTATTTACACACTAATTTATGTATTCTAGATATCAATTTATTTATTCTAGACACCAATTTATGTA		935
TTCTAGATATCAGTTACTGGATTCTAGATAACAAATCATGTATTTTAGGCCCAAATATATGCCCAATGTATGTATTC		1015
TAGACTCCACGTTATGTATTTCTAGACATCAGTTTTGATTCTAGATATCAATTAATCAATTAATGTATTTCTAGATATCAG		1095
TGTATGTATTTCTAGATGTAAACTATAACTATGTATATATAGGTATTACCTGTGTGTCACCTAACAAATTTTCATTCAGGT		1175
ATAATTTATGTAGGATATTTATGTATTATTATGGAGTCCTTTATAAAAATCAAATTAATAAAATGATAAAATATGAAATTA		1255
TAATTTTCTAAAAATTTAAATACCTTTCTTAAATTTATATTTATCTGACTACATACTTGTATAAACAGAAAAGCGCGC		1335
GATATTTATTTTCTCAGCAATTTAATCTGCTGCTCAACTAAATCTACTGTCATACTGTTAGTAATTTGTTTAGGTTTC		1415
TCCCTATTGAATCCATCCCCATCGTTATGAAGAACGGTGTCTTTGTTGCCCTCGAATGATAGGATTAATGAAAACACACA		1495
AGAACAACAATCAATTTTCATGGGTCCTCATCTCTATGCTATTTAGAATGACCTTTGTCCAGCTAATAGTCTTAGTATTC		1575
AGTGGTCAGTATCTTGTTCATTACAAATGTTACCTGTCTTCGGTCACGTGCCAAATGTTTCTCAAAAACCACCTGT		1655
CAGCTTCATGAGGGCTTTTTGTATAATTTTTGACCTGGCAGCGACCCAACAAGTTCAAATTTCAACCCCTCAAGA		1735
ATAATTAGATACGCGCCACTTGTGAAAACCCCTTCATCGGGAGATTTTTTCTCTCTCTGGCGCGTGTGAAAATGACAA		1815
ATAAATTTAAAGGTATTCAGTACTGGAATCTATCACATGCTGTTCAATATTTTTTCTAAAAAGTCATTGTTGTAAC		1895
AAAGTAAACCTGAGACTTCGTACATTTTTTTTGATAATTTATTTAACAATATAAAAATTAACCACGAATTTATCAAAATATA		1975
GAGGATATTTGTCGTTTTAGAGTGAATAACATATTTTATTTTCTCGAGAAAAATATAACGTTTTCTTGCTTAGAGATGAA		2055
ATAAATATGTTATTTCCCGACAAAACGACAAAAGTTCTATTTATTTATGATTTTACAATCATTTTAGGTAAAAACAAC		2135
ATCCAGTGGAAATACACTTTTTTACTGATAAAAACGCAGTATCCACTACTGATCATAAAAATAGTTTTTTTTTATAGT		2215
TCGATAATACTTACCTATCTTCAAAAATAAAATATTA AAAAAGATATCCTATTTTATAATGTTCTATGTTTCATATTAC		2295
CATTCTCCCTATTTAACTAATGAAAATACCAGAAATGTTAAAACGGTTGGAAGCTCAAGGAATGTTAAATGGATTTCA		2375
TATTTTATGTTTTTTTCATTTTAAAAATCTTTTTCGTTAATAACTAATAAAAACACGCGGAATGTCAAAACATATGAAAT		2455
TATTGAGGAATGCTAAAAAAATTTCTTACAAAATATTACTTGAAGTGAGCATTTCACACATAAAAATCTCAAAAAGAAATG		2535
CGCAATGTGTAATGTACACGCTTTATTAATTTACTAATTTATATGCACGTGCGTGAATCGATTTGGAATTAATGCAAG		2615
TGCTTAGAAGTCTCAAAGGGAATTGATGAAATAACATAAAAATTAATTTGGGCATATAATAACTAAAACCAACAAGTG		2690
CCGTGATTAATAATAGATCTTTAATATGTGAACGTAATGATTAATTAACCATCAAATTAATCAAAGATTTCTGCTCTTAAAA		2770
	* k	
AATACCTTTTAAATATAAATATCAGACCTGTTGCTATAGTTATTGTTTTCTATGTTA	CA GG CGA TCG ATG GAA	2845
i p f n i n i r p v a i v i v f y v t	G R S M E	101
GGA ATA ATA AAA CAG ACT ATA GTA AAA CCC ATA CCA GAG CGA CCA ATG ATT CCA GTG TCA		2905
G I I K Q T I V K P I P E R P M I P V S		121
CTT CAT CTC CCG CCA ACA CCA GAT TGT CAC AGA AGA CTC TCA CCG CAT TCA CCT GCT GAT		2965
L H L P P T P D C H R R L S P H S P A D		141
CTA GAT CGT AGA ACC GGA AGT CTG AGT CCT GTC GAC AGT CCC AGT TGT AGT CCA CCA GAG		3025
L D R R T G S L S P V D S P S C S P P E		161
CCT GCT CGA TTC CAC GAT CCA TTC CCA TGG CAA CCT CCA CTT ATC TCT AAT TTG CAC AGT		3085
P A R F H D P F P W Q P P L I S N L H S		181

Figure 46: Séquence de *pv-Slak2* déterminée à partir du clone génomique sous cloné par PCR et d'un cDNA isolé par Lex Nederbragt. Les bornes de l'intron putatif sont surlignées en vert.

CAC	CCA	TTT	TTA	CCG	TTC	CGC	TTC	TTC	AGT	GGA	TTC	CCA	TCA	CCC	CCA	TTG	CCA	AGA	AAC	3145
H	P	F	L	P	F	R	F	F	S	G	F	P	S	P	P	L	P	R	N	201
CTC	AAC	GAT	TCA	ACG	CTG	GGA	TTT	AGG	CCA	TAT	GCA	GAA	GTC	TCG	TCA	GCT	TTC	AAA	GGA	3205
L	N	D	S	T	L	G	F	R	P	Y	A	E	V	S	S	A	F	K	G	221
CCA	CAA	CTC	TTG	CCA	CCG	CCA	ACG	TAT	CTT	CCG	GCG	GGA	ATG	CGT	TAT	CCA	ATG	AAC	TTT	3265
P	Q	L	L	P	P	P	T	Y	L	P	A	G	M	R	Y	P	M	N	F	241
CCC	CAG	TCT	CCT	AAT	GAC	ACT	CGA	AAA	CTT	TTC	GAC	GAT	AGA	CGA	ATG	GAC	TTA	GAT	TTC	3325
P	Q	S	P	N	D	T	R	K	L	F	D	D	R	R	M	D	L	D	F	261
AGT	GTT	AAA	ATG	GCT	AAA	GCA	CCA	TTT	GAT	AAC	GTT	TTG	AAC	TAT	TCC	GTG	GTG	ACA	GAA	3385
S	V	K	M	A	K	A	P	F	D	N	V	L	N	Y	S	V	V	T	E	281
CGC	CCC	GTT	CCG	GAA	TTA	GAA	CTT	ACG	GAG	AAA	AAG	AAA	AGT	AAA	GAA	AAC	GAA	CCT	ATT	3445
R	P	V	P	E	L	E	L	T	E	K	K	K	S	K	E	N	E	P	I	301
CGA	TAT	CAG	TGC	GAT	TCT	TGT	AAA	AAG	AGC	TAC	TCG	ACG	TTT	AGC	GGT	TTA	TCT	AAA	CAC	3505
R	Y	Q	R	D	S	R	K	K	S	Y	S	T	F	S	G	L	S	K	R	321
AAA	CAA	TTT	CAT	TGT	GCC	TCG	CAG	ATT	AAG	AAA	GAA	TTC	AAC	TGT	AAA	TAC	TGT	GAT	AAG	3565
K	Q	F	R	C	A	S	Q	I	K	K	E	F	N	C	K	Y	C	D	K	341
ACG	TAC	GTG	TCT	CTG	<u>GGA</u>	<u>GCT</u>	<u>TTA</u>	<u>AAA</u>	<u>ATG</u>	<u>CAC</u>	<u>ATA</u>	AGA	ACT	CAC	ACA	TTA	CCC	TGT	AAG	3625
T	Y	V	S	L	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	<u>I</u>	R	T	<u>H</u>	T	L	P	C	K	361
TGT	AAA	TTA	TGC	GGT	<u>AAA</u>	<u>GCT</u>	<u>TTT</u>	<u>TCT</u>	<u>CGA</u>	<u>CCT</u>	<u>TGG</u>	TTA	TTA	CAA	GGT	CAT	ATC	AGG	ACT	3685
C	K	L	C	G	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>W</u>	L	L	Q	G	H	I	R	T	381
CAT	ACT	<u>GGC</u>	<u>GAG</u>	<u>AAG</u>	<u>CCA</u>	<u>TTT</u>	<u>TCT</u>	<u>TGT</u>	CAA	CAT	TGT	GGT	CGT	GCT	TTT	GCT	<u>GAC</u>	<u>CGC</u>	<u>TCC</u>	3745
H	T	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	C	Q	H	C	G	R	A	F	A	<u>D</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	401
AAT	CTA	<u>AGA</u>	<u>GCA</u>	<u>CAT</u>	CTT	CAG	ACC	CAT	TCA	GAT	GTT	AAG	AAA	TAC	AGT	TGT	CGA	AGC	TGC	3805
N	L	<u>R</u>	<u>A</u>	H	L	Q	T	H	S	D	V	K	K	Y	S	C	R	S	C	421
AGC	AAA	ACC	TTT	TCC	AGA	ATG	TCG	TTA	TTA	TTG	AAA	CAT	GAA	GAT	GGT	TGT	TGT	GGC	ACA	3865
S	K	T	F	S	R	M	S	L	L	L	K	H	E	D	G	C	C	G	T	441
GTT	GTT	CAT	TAA	AACTTTAAACGTGATCAAACATTATTGTGAAGAACATAAACTAGACATGACTACAATTAAT															3940	
V	V	H	*																444	
ATATCAAATTTAAATTTGAAATCGAAGGACACAACCTTATATATTTATTTAGGTGTTAGTTTTTTGTAAGGTGCCATTTTAA																				4020
AAGAAACAGTCATATTGTTATTTATTTTTATTTCCCAATTTTTATTTATTTTTATGTGTGTTCTTGTCAAATCAGTATTC																				4100
AACATTTCTGTCTCTTGTCCATTTAATTAATGTTATTTGTGATATTATACTTATGATTTGAGTAACGTTTAGCTTTTCT																				4180
ATACCGTTACTCATTTTAAACGAATTTAGTCAATACTTTAATTCGTACCATTGGAACCTTACATTGCTCTACTATTACAG																				4260
AGACTGTTTCAATTTGTTATTTATGAATTATACTTCTAATCTGAGTAACGTTTAGTCCCTTTCTATACCGTTACACATTTTA																				4340
GACTACTTCAATTTGTTATTTATGAATTATACTTCTAATCTGAGTAACGTTTAGCCTTTTCTATACCGTTACTCATTTTAA																				4420
CGAATTTAGTTCCCTGCCCCCCCCCCCCCAATTTATTTGTGCCATTGGAACCTTACTTGTCTCTACTATTACAGAGACTG																				4500
TTTGAATTTGTTTATGAATTATACTTATAGTCTGAGTAACGTTTACTTTTATATATATACACCGTTACTCATTTTAAA																				4580
ATGAATTTAGTCGCCCCACCCCATTAATTCGTGCCATTGGAACAACCATTTCTCTACTATTACAGAGACTGTTTCAA																				4660
TTTGATATTGTAATTATACTTCTAATCTGATTAAAGTTTAGCCATTTCTATACCGTTACTCATTTTAACGAATTTAGTC																				4740
CCCCACCCCTCCCATTAATTTGTGCCATTGGAACATAGATACTATCACAGAGACTGTTTCAAATTTGTTGTTATGAAAAC																				4820
TTCCCCTTTTGTCTTTATACATATATTGAAACTATTTTCAATTTGTTATTAATCAATATTTTGTGAATCAGTGATGAATA																				4900
CTCTAAATATTTATTTATGTATATTTAAAGACTTACATTAGAAAAA																				4957

Figure 46 (suite): Les résidus caractéristiques des doigts de zinc sont surlignés en couleur. Les oligonucléotides SnalW, Sna2W, Sna3C et Sna4C sont soulignés.

8. La famille des gènes *Snail*: un premier bilan

8.1. Chez *Patella vulgata*

Deux membres de la famille *Snail* ont été isolés à ce jour chez ce mollusque. Les techniques utilisées (PCR, crible de banques, Southern Blot) ne nous permettent pas de conclure avec certitude sur le nombre de représentants de cette famille chez la Patelle. Il peut donc y avoir d'autres gènes de cette famille dont les séquences seraient trop divergentes pour permettre leur détection par les techniques utilisées ici.

Lorsqu'ils sont alignés sur toute leur longueur à l'aide du programme ALIGN qui utilise l'algorithme de Wunsch et Needleman (Needleman and Wunsch, 1970), les séquences protéiques des gènes pv-*Slak1* et pv-*Slak2* présentent un peu moins de 40% d'identité. En réalité, seule la boîte *Snail* (136 a.a.) est hautement conservée entre ces deux séquences et présente 86% d'identité (Figure 47).

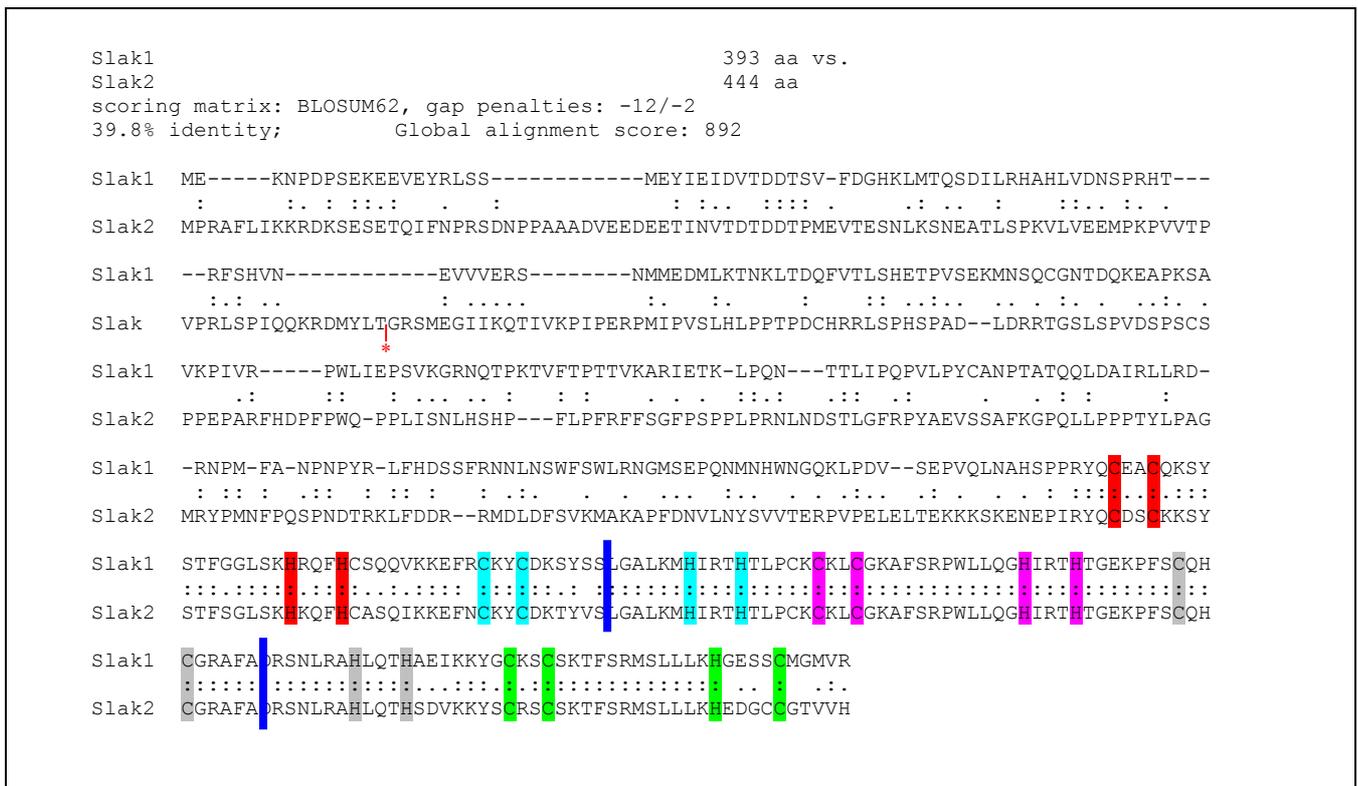


Figure 47: Alignement des séquences protéiques des gènes pv-*Slak1* et pv-*Slak2* à l'aide du programme ALIGN. Les doigts de zinc sont surlignés. La région conservée est délimitée par deux barres verticales. La position de l'intron du gène pv-*Slak2* est repérée par une astérisque rouge

Afin de vérifier que les petits alignements locaux (Smith and Waterman, 1981) obtenus en dehors de la boîte *Snail* étaient bien dû au hasard, j'ai estimé leur vraisemblance en utilisant la technique d'alignement après re-shuffling de ces fragments protéiques (logiciel PRSS). Si l'on applique cette méthode aux protéines pv-*Slak1* et pv-*Slak2* déléetées de la boîte *Snail*, on obtient cent quarante cinq fois sur 200 un score qui pour les séquences générées aléatoirement est au moins aussi bon que celui obtenu à partir des séquences natives. Ceci nous permet donc de conclure sans ambiguïté qu'à l'exception du motif *Snail*, il n'y a aucune conservation significative entre ces deux protéines.

Si l'on observe désormais un peu plus en détail les boîtes *Snail* de ces deux gènes, on remarque qu'elles possèdent une région de 53 amino-acides (Figure 48) pour laquelle l'identité est de 100%. Cette même région présente en outre 98,7% d'identité au niveau nucléotidique, soit 2 différences sur 159 nucléotides. La seule hypothèse qui nous permette d'expliquer un tel niveau de conservation nucléotidique entre les deux gènes de Patelle est celle d'une conversion génique (Szostak et al., 1983).

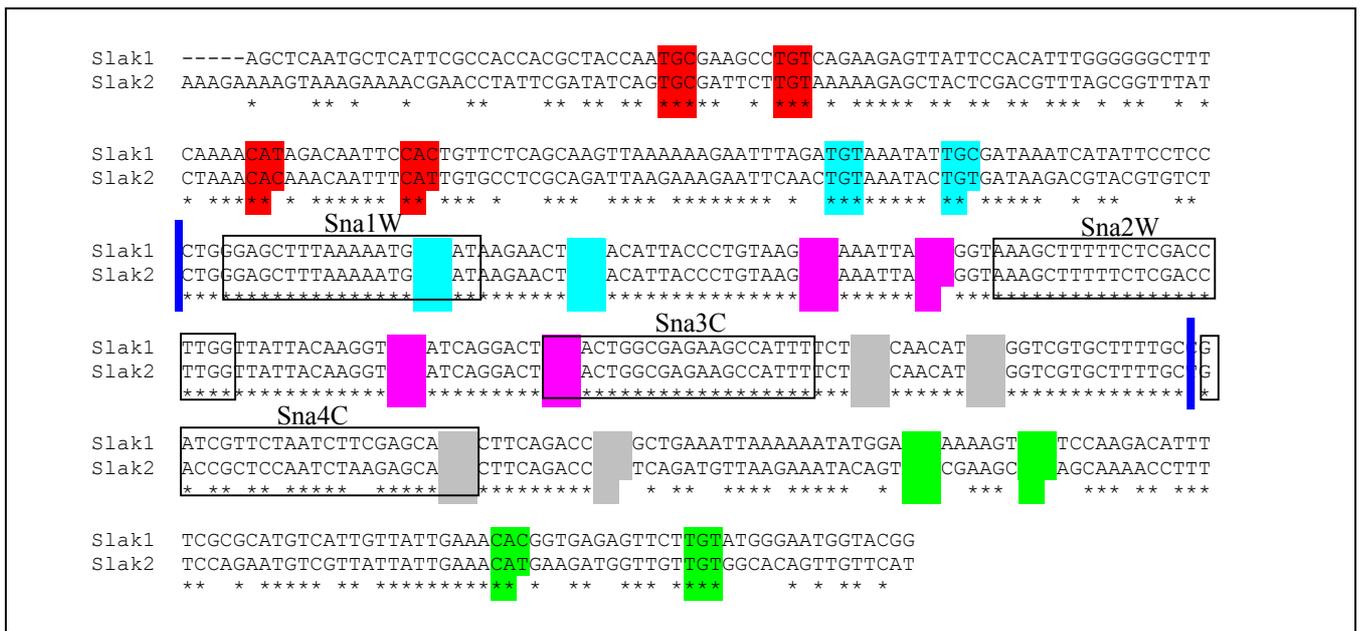


Figure 48: Alignement de la partie la plus conservée des gènes *pv-Slak1* et *pv-Slak2*.

Les oligonucléotides utilisés pour amplifier la boîte *Snail* par PCR ayant été choisis dans cette région extrêmement conservée, tous les clones séquencés présentaient donc la même séquence unique (Figure 43) alors qu'il y avait bien en réalité deux gènes cibles distincts.

On notera au passage que les premier et cinquième doigt de zinc sont exclus de la zone de conversion génique. Si l'on admet que la conversion n'a été rendue possible qu'en raison d'un niveau de conservation élevé maintenu par pression de sélection, on peut émettre l'hypothèse que cette pression

de sélection est moins forte au niveau des premier et dernier doigts de zinc (n°1 et 5). Cette constatation peut être mise en relation avec le fait que le premier doigt de zinc est absent du gène *Snail* de Souris, d'un des deux gènes de Danio et de Fugu, ainsi que chez les deux gènes *Snail* humains. Bien qu'il soit indirect, cet argument tendrait à indiquer que le premier doigt de zinc est dispensable pour le fonctionnement de la boîte *Snail*.

8.2. Chez les Métazoaires

Depuis le début de mon travail de thèse, de nombreux homologues du gène *Snail* ont été caractérisés chez les deuterostomiens et les ecdysozoaires. Si l'on ajoute les deux gènes de Patelle, la famille comporte désormais pas moins de 28 membres dont la séquence a été déterminée dans sa totalité³⁵ (Tableau 2).

Nom d'espèce	Nombre de paralogues	Nom des gènes clonés et références bibliographiques
<i>Drosophila melanogaster</i>	6	<i>Snail</i> (Boulay et al., 1987), <i>Escargot</i> (Whiteley et al., 1992), <i>Scratch</i> (Roark et al., 1995), <i>Worniu</i> (Ashraf et al., 1999), <i>CG12605</i> , <i>CG17181</i> (Adams et al., 2000)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	1	<i>Ces-1</i> (Metzstein and Horvitz, 1999)
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	1	<i>Ces-1</i> (Metzstein and Horvitz, 1999)
<i>Patella vulgata</i>	2	<i>Slak1</i> , <i>Slak2</i> (Lespinet et al., <i>in prep.</i>)
<i>Lytechinus variegatus</i>	1	<i>LV-Snail</i> (Illingworth et al., <i>submitted</i>)
<i>Ciona intestinalis</i>	1	<i>Ci-Snail</i> (Corbo et al., 1997)
<i>Halocynthia roretzi</i>	1	<i>Hrsna</i> (Wada and Saiga, 1999)
<i>Branchistoma floridae</i>	1	<i>BF-Snail</i> (Langeland et al., 1998)
<i>Danio rerio</i>	2	<i>zSnail1</i> (Hammerschmidt and Nusslein-Volhard, 1993; Thisse et al., 1993), <i>zSnail2</i> (Thisse et al., 1995)
<i>Fugu rubripes</i>	2	<i>Fugu-Snail1</i> , <i>Fugu-Snail2</i> (Smith et al., <i>submitted</i>)
<i>Xenopus laevis</i>	2	<i>X_Sna</i> (Sargent and Bennett, 1990), <i>X_Slug</i> (Mayor et al., 1995)
<i>Gallus gallus</i>	2	<i>cSnR</i> (Isaac et al., 1997), <i>cSlug</i> (Nieto et al., 1994)
<i>Mus musculus</i>	3	<i>M_Sna</i> (Nieto et al., 1992), <i>M_Slugh</i> (Jiang et al., 1998; Savagner et al., 1997; Sefton et al., 1998), <i>M_Smuc</i> (Kataoka et al., 2000)
<i>Homo sapiens</i>	3	<i>H_Snail</i> (Paznekas et al., 1999), <i>H_Snail1P</i> (Paznekas et al., 1999), <i>H_Slug</i> (Cohen et al., 1998)

Tableau 2: Les membres de la famille *Snail* dont la séquence a été déterminée dans sa totalité.

³⁵ Les fragments partiels obtenus par PCR chez une petite dizaine d'arthropodes (Sommer et al., 1992), le rat (Savagner et al., 1997) et quelques annélides (résultats préliminaires) ne sont pas présentés ici.

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	Y00288	<i>Snail</i>		77	79	59	59	58	51	51	77	75	78	69	75	78	76	72	76	73	74	76	74	76	74	77	73	76	70	77
2	M83207	<i>Escargot</i>	34		90	62	63	64	57	56	88	91	87	73	78	90	81	80	81	79	86	86	85	86	83	87	79	83	76	87
3	AF118857	<i>wormiu</i>	31	31		63	64	63	57	56	85	87	85	73	77	87	82	80	80	80	84	86	84	86	83	87	80	82	75	87
4	Q24140	<i>scratch</i>	19	17	15		92	63	71	70	63	62	63	55	59	64	56	51	57	56	62	64	62	63	61	64	59	62	58	64
5	AE003479	<i>CG12605</i>	17	17	13	22		63	71	71	63	63	63	56	60	64	57	51	58	56	62	64	62	63	61	64	61	61	58	64
6	AE003468	<i>CG17181</i>	17	18	16	20	21		62	62	64	65	68	58	61	67	58	52	58	60	65	67	65	65	63	66	64	63	57	66
7	AF169201	<i>Ces-1</i>	20	27	27	41	37	32		98	55	57	57	50	52	57	53	51	53	51	56	56	56	56	55	56	55	54	52	56
8	AF176377	<i>Briggsae</i>	21	27	29	37	38	33	74		54	57	56	51	53	57	52	50	52	51	56	55	55	55	55	56	55	54	50	56
9		<i>Slak1</i>	27	31	29	21	20	21	27	26		91	89	73	76	88	81	81	81	80	86	87	85	87	82	88	81	82	77	88
10		<i>Slak2</i>	27	29	27	19	18	19	28	28	33		89	74	75	90	79	80	78	78	87	88	87	88	83	89	80	83	76	89
11	AF013243	<i>LV-Snail</i>	31	35	35	29	24	27	27	27	35	35		74	79	92	82	84	83	81	90	92	89	92	86	92	83	88	80	92
12	AF002987	<i>Ci-Snail</i>	22	17	15	13	12	17	24	25	23	20	28		83	74	71	63	70	70	74	74	74	73	73	74	73	72	70	74
13	AB019043	<i>Hrsna</i>	21	21	18	14	14	17	24	25	24	21	31	21		77	73	73	73	76	77	78	76	77	76	78	75	75	69	78
14	AF081809	<i>BF-Snail</i>	41	48	44	32	32	34	29	29	46	48	53	35	37		82	81	81	79	89	93	89	93	84	94	84	86	79	94
15	X74790	<i>zSnail1</i>	32	34	35	24	24	24	22	22	34	33	35	29	31	36		93	94	90	87	87	87	86	86	87	79	87	80	87
16	U24225	<i>zSnail2</i>	36	38	39	25	25	26	22	24	38	38	40	29	35	39	59		94	93	88	87	87	86	88	87	77	88	81	87
17	AJ238206	<i>Fugu_1</i>	32	35	34	24	24	25	22	22	34	34	36	30	31	36	71	60		91	86	86	86	86	87	86	79	87	80	86
18	AJ238207	<i>Fugu_2</i>	30	37	39	25	27	29	21	21	37	36	36	29	32	39	56	58	55		86	85	85	84	86	85	76	86	80	85
19	X53450	<i>X_Sna</i>	39	46	44	32	30	31	28	28	45	46	47	35	37	47	52	51	50	47		97	99	95	92	96	84	91	85	96
20	X80269	<i>X_Slug</i>	38	47	42	32	30	32	27	27	43	44	51	35	37	52	46	49	42	42	69		96	99	91	99	85	91	83	99
21	Y09905	<i>cSnR</i>	40	46	45	33	31	32	28	28	45	46	48	36	38	48	49	55	50	46	79	65		94	92	95	84	91	85	95
22	X77572	<i>cSlug</i>	38	46	42	32	30	31	26	27	42	44	47	34	36	52	49	50	45	42	69	93	65		90	99	85	91	82	99
23	X67253	<i>M_Sna</i>	32	38	36	26	25	27	23	23	35	36	42	32	33	37	41	37	41	40	53	48	58	49		91	82	96	89	91
24	U97059	<i>M_Slugh</i>	38	43	42	32	30	31	27	27	43	44	47	35	37	52	49	50	45	41	71	91	67	93	49		86	91	83	100
25	AF133714	<i>M_Smuc</i>	31	35	34	22	26	27	25	26	34	34	38	30	32	41	40	42	39	40	45	44	46	43	35	44		82	77	86
26	AF155233	<i>H_SNAIL</i>	32	38	35	26	26	27	23	22	36	36	43	31	31	38	41	37	42	39	51	49	56	52	89	50	35		90	91
27	AF153502	<i>H_SNAI1P</i>	32	35	33	25	25	25	22	21	34	34	40	30	30	35	38	32	38	35	47	46	49	45	73	46	34	77		83
28	AF042001	<i>H_Slug</i>	42	44	42	32	30	31	27	27	43	44	47	35	37	52	49	50	45	44	71	91	67	94	49	96	44	49	46	

Tableau 3: Scores de similarité SSPA (Significant Segment Pair Alignment) obtenus en comparant les protéines de la famille *Snail*

Les scores sont exprimés en %. Les cases des scores les plus faibles sont bleues, celles des scores les plus élevés sont rouges

Les scores obtenus à partir des séquences situées en amont des quatres doigts de zinc les plus conservés sont en-dessous de la diagonale

Les scores obtenus à partir des séquences des doigts de zinc n° 2, 3, 4 et 5 sont au-dessus de la diagonale

(La matrice utilisée est la Blosum62, avec des seuils de probabilité d'alignement de 0.01 et 0.5)

8.2.1. Niveau de similitude

Bien que son utilisation soit d'un usage courant, le pourcentage d'identité ou de similitude global entre deux protéines est une valeur qui peut parfois présenter un biais important. La comparaison de protéines de même taille fournit par exemple un pourcentage d'identité ou de similitude plus élevé que celle de protéines de tailles très différentes. Pour une comparaison directe des protéines de la famille *Snail*, j'utiliserai donc plutôt le score d'identité normalisé obtenu par SSPA³⁶, fourni par le logiciel ITERALIGN (Brocchieri and Karlin, 1998).

Ce logiciel réalise un alignement par bloc dépourvu de "gaps" et ne considère comme significatifs que les blocs de plus de trois acides aminés dont la probabilité d'obtention au hasard est inférieure à un seuil de probabilité fixé par défaut à 0,01. Les blocs retenus sont ensuite étendus jusqu'à ce que la probabilité d'obtention due au hasard atteigne le seuil de 0,5. Le score d'identité brut est alors calculé en sommant les scores de tous les blocs ainsi obtenus. Puis, ce score est normalisé par le score maximal obtenu en alignant chaque protéine contre elle-même. Ces scores SSPA, exprimés en pourcentage, permettent donc des comparaisons directes entre protéines de tailles très différentes, comme c'est le cas pour les protéines de la famille *Snail*.

Les comparaisons deux à deux des 28 protéines de la famille *snail* (Tableau 3) ont été réalisées en découpant chacune de ces protéines en deux fragments. Le premier fragment contient la séquence située en amont du deuxième doigt de zinc. Le second contient la séquence du second doigt de zinc ainsi que celle située en aval. Cette division nous permet de distinguer la similitude du domaine *Snail* délégué du premier doigt de zinc³⁷, de celle du reste de la protéine.

On constate qu'à l'exception des protéines du type *Slug*, les scores d'identité obtenus pour le fragment situé en amont de la boîte *Snail*, sont extrêmement faibles. Une exception notable concerne le score obtenu par les deux gènes de nématode qui est supérieur à 50%. On notera également la plus grande similarité entre les gènes *Snail1* de *Danio* et de *Fugu* qu'entre les deux gènes de *Danio* ou de *Fugu*. Enfin les gènes *Snail* d'Homme et de Souris présentent également une forte similarité. De la même façon, les gènes *Slug* de vertébrés présentent tous une très grande similarité de séquence (plus de 84%).

Le contraste entre la conservation de cette région chez les gènes *Slug* et sa non conservation chez les gènes *Snail* me conduit à formuler l'hypothèse d'une contrainte bien plus importante sur l'ensemble de la séquence des gènes *Slug*. Tout se passe comme si, pour les gènes *Snail*, seule la région de fixation à

³⁶ Significant Segment Pair Alignment score identity (exprimé en %)

³⁷ Ce doigt de zinc n'est pas conservé dans cinq des 28 protéines: zSnail1, Fugu-Snail1, M_Sna, H_SNAIL et H_SNAI1P

l'ADN était contrainte, alors que l'acquisition d'une nouvelle fonction imposerait aux gènes *Slug* une contrainte sur l'ensemble de leur séquence.

L'étude du niveau de similitude du fragment *Snail* (doigts de zinc n° 2,3,4 et 5) nous indique que cette conservation est plus élevée chez les deutérostomiens et plus particulièrement chez les vertébrés. Seul le gène *Smuc* de Souris a un niveau de similitude atypique (inférieur à 80%). Chez les deutérostomiens on notera également que les deux gènes d'ascidie ont un niveau de similitude faible, ce qui suggère que ces deux séquences ont particulièrement divergé. Chez les protostomiens, on retrouve le même type de divergence pour les deux gènes de nématodes. On notera enfin pour finir que la plupart de ces gènes présentent un niveau de similitude plus élevé avec les gènes *Escargot* et *Worniu* de *Drosophile*, qu'avec le gène *Snail* !

8.2.2. Phylogénie de la famille des gènes *Snail*

L'alignement des 105 amino acides correspondant à la région des quatre doigts de zinc les plus conservés de la boîte *Snail* (Figure 49) m'a permis de réaliser une étude phylogénétique de cette famille de gènes. Plus qu'une phylogénie des espèces, mon objectif était d'essayer de définir les différentes relations d'orthologies qui peuvent exister entre ces 28 gènes.

La reconstruction phylogénétique proprement dite a été réalisée à l'aide du logiciel PAUP (Swofford, 1998), en utilisant aussi bien les méthodes de parcimonie que de distance (Neighbor Joining). Les deux méthodes donnant des résultats sensiblement identiques, seul l'arbre de distance est présenté ici (Figure 50). Les valeurs de bootstrap³⁸ obtenues après mille répliques et supérieures à 5% ont été reportées sur chacun des nœuds de l'arbre de distance.

L'arbre obtenu présente la caractéristique de regrouper tous les gènes de vertébrés (à l'exception du gène *Smuc* de souris) en un ensemble qui n'est cependant soutenu que par une valeur de bootstrap assez faible (48%). Bien que les séquences d'amphioxus (lancelet) et d'oursin (*lytechinus*) se placent à la base de cet ensemble, leur placement est faiblement soutenu par la qualité du signal (bootstrap inférieur à 5%) et semble plutôt résulter d'un phénomène d'exclusion des longues branches.

A l'intérieur des gènes de vertébrés, on distingue deux ensembles clairement différenciés. Si celui des gènes *Slug* est relativement bien soutenu (87%), la situation est plus contrastée en ce qui concerne les

³⁸ Re-échantillonnage par tirage aléatoire avec remise de chacun des 105 sites. Il s'agit donc d'un estimateur assez grossier de l'homogénéité du signal et non pas d'un test statistique.

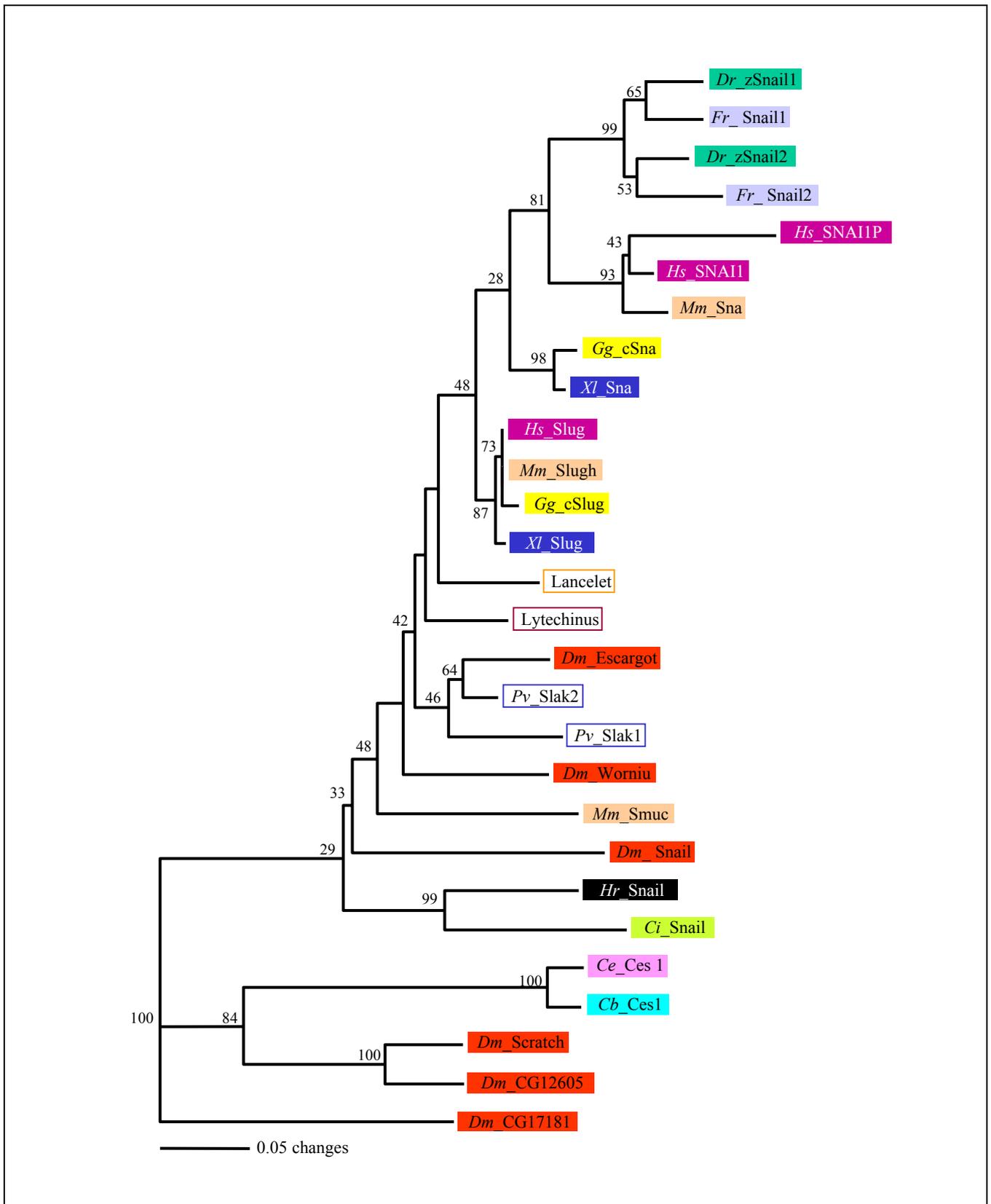


Figure 50: Arbre de distance (Neighbour-Joining NJ) obtenu par PAUP à partir de l'alignement des quatre doigts de zinc les plus conservés. Les valeurs de bootstrap figurant sur les branches ont été obtenues après 1000 répliquions. Les gènes paralogues sont surlignés de la même couleur.

gènes *Snail* et ce groupe est faiblement soutenu (28%). A l'intérieur de ce dernier la monophylie des gènes de poisson (99%) et de mammifères (93%) est relativement bien soutenue, ainsi que celle de l'ensemble mammifère + poisson (81%). Reste enfin le problème du placement des gènes *Snail* de Poulet et de Xénope (98%), puisque leur rattachement à l'ensemble des gènes *Snail* ne semble soutenu que par une faible valeur de bootstrap (28%).

Quoi qu'il en soit, le scénario le plus parcimonieux qui résulte de l'ensemble de ces données est celui d'un gène ancestral présent en une seule copie chez l'ancêtre des deutérostomiens et qui aurait subi une première duplication *Slug/Snail*. Le gènes *Snail* auraient ultérieurement subi des duplications indépendantes chez les mammifères et les poissons.

La situation est beaucoup plus confuse en ce qui concerne les gènes de protostomiens et les relations d'orthologie entre les différents gènes restent pour les moins obscures en raison du phénomène d'attraction des longues branches. Toutes les séquences anormalement divergentes se regroupent en effet à la base de l'arbre, ce qui donne un groupe hétérogène faiblement soutenu (inférieur à 5%) et constitué des gènes de *Drosophile* (*Worniu*, *Snail*, *Scratch*, *CG12605* et *CG17181*), de Nématodes (*Ce_Ces1* et *Cb_Ces1*), d'Ascidies (*Hr_Snail* et *Ci_Snail*) ainsi que d'un gène atypique de Souris (*Smuc*). A l'intérieur de cet ensemble, seuls les groupes (*Scratch*, *CGM12605*), (*Ce_Ces1*, *Cb_Ces1*) et (*Hr_Snail*, *Ci_Snail*) semblent correspondre à des réunions raisonnables et fortement supportées (supérieur à 99%). On peut cependant s'interroger sur la signification du regroupement des deux gènes de nématodes avec le groupe du gène *Scratch* (84%), doit on en effet y voir un artéfact de longue branche ou une trace de l'existence du clade des ecdysozoaires ?

Reste enfin pour finir le cas des deux gènes de Patelle. Malgré l'existence supposée d'une conversion génique sur une séquence correspondant à 53 acides aminés, ces deux gènes qui sont d'évidents paralogues sont regroupés avec le gène *Escargot* de *Drosophile*. A l'inverse de ce que l'observe ici, ces deux gènes sont regroupés ensemble sur l'arbre de parcimonie (non présenté ici) et le gène escargot ressort alors à la base de cet ensemble.

Il semble évident que la duplication des gènes de Patelle est spécifique de cette espèce et est indépendante des duplications survenues chez la *Drosophile* ou les vertébrés.

8.3. Conclusions

La famille des gènes *Snail* semble être constituée de membres qui à l'exception des gènes *Slug* de vertébrés semblent peu contraints (séquence peu conservée). Elle se caractérise en outre par l'existence de nombreuses duplications indépendantes.

Ces deux phénomènes agissant de concert pour brouiller les relations d'orthologie entre les différents membres de cette famille de gènes, il nous est alors particulièrement difficile de déterminer le scénario retraçant leur évolution.

On peut néanmoins s'interroger sur les raisons de la plasticité génique de la famille *Snail*.

Si l'on s'intéresse tout d'abord à chacun de ces gènes, on remarque que la région qui semble le moins contrainte est celle qui est supposée contenir les régions régulatrices de la transcription. Les modifications dans cette région peuvent donc permettre des interactions avec de nouveaux partenaires, il faut également supposer dans ce cas une co-évolution des partenaires initiaux si l'on veut maintenir la fonction originelle du gène.

Si l'on s'intéresse désormais aux gènes dans leur globalité et à leur duplication. On peut s'interroger sur les raisons de ces nombreuses duplications indépendantes (Drosophile, Patelle, Vertébrés, Poissons). Parmi les différents modèles qui proposent des hypothèses sur le rôle évolutif des duplications de gènes, je n'en retiendrai que deux. Le plus classique est celui d'une duplication suivie d'une dégénération d'une des deux copies (modèle DD) et l'acquisition, puis la fixation dans de rares cas d'une nouvelle fonction (Ohno, 1970). Un modèle légèrement différent propose que la dégénérescence aboutisse non pas à l'acquisition d'une nouvelle fonction, mais plutôt à une complémentation des deux copies du gènes (modèle DDC) (Force et al., 1999). On observe alors une répartition des fonctions du gène ancestral entre chacune des deux copies. Selon les auteurs du modèle DDC, la spécialisation des deux paralogues se fait essentiellement par modification de leur régions régulatrices. Dans le cas de la famille *Snail*, la spécialisation pourrait également impliquer la modification de la région régulatrice située en amont de la boîte *Snail*, chaque copie ne maintenant des interactions qu'avec un nombre restreint de partenaires.

Pour cette famille de gènes, je propose donc une évolution principalement basée sur le modèle DDC avec un cas un peu particulier qui pourrait être celui de la duplication *Snail/Slug* des vertébrés. Dans ce cas en effet on peut admettre que l'acquisition d'une nouvelle fonction ou du moins d'une spécialisation indispensable ait imposé de telles contraintes sur ce nouveau gène que les séquences des différents orthologues soient conservées.

9. Détermination des profils d'expression des gènes *pv-Slak*

Afin de vérifier si les gènes *pv-Slak1* et *pv-Slak2* s'exprimaient dans le mésoderme chez la Patelle, le profil d'expression de leurs ARN messagers a été déterminé *in toto* par hybridation *in situ* sur des embryons âgés de 0 à 36 heures.

9.1. Mise au point du protocole d'Hybridation *in situ* chez *Patella vulgata*

Les gènes de la famille *Snail* sont des facteurs de transcriptions dont le niveau d'expression, supposé, doit être relativement faible, si on le compare à celui de gènes codant pour des protéines de structure comme par exemple l'actine ou la tubuline. Le protocole d'hybridation *in situ* utilisé pour déterminer le profil d'expression de la tubuline (Damen et al., 1994) n'ayant pas permis de révéler ceux de *pv-Slak1* et *pv-Slak2*, une partie importante de mon travail de thèse a consisté à adapter différents protocoles avant d'en retenir un dont le niveau de sensibilité soit plus grand que celui utilisé par Wim Damen (Damen et al., 1994). Plusieurs étapes critiques du protocole ont ainsi été progressivement améliorées parmi lesquelles: la fixation des embryons, leur perméation à la sonde ainsi que la révélation du signal (Annexes). Ce long travail de mise au point a été le fruit d'une étroite collaboration de deux années avec Nicolas Lartillot (CGM, Gif-sur-Yvette) et Lex Nederbragt (Université d'Utrecht) et nous a permis d'obtenir les profils d'expression des ARN messagers de *pv-Slak1* et *pv-Slak2*.

9.2. Profil d'expression de *pv-Slak1*

La totalité du fragment isolé lors du criblage de la banque d'ADN complémentaire (1,6 kb) a été utilisée pour déterminer le profil d'expression du gène *pv-Slak1*. La synthèse des sondes sens et anti-sens a été réalisée à l'aide des kits Dig RNA Labeling kit (Boehringer Mannheim), Maxiscript T7 et Maxiscript Sp6 (Ambion).

La première expression visible de l'expression de *Slak1* est relativement tardive. Elle apparaît en effet à l'issue de la seizième heure de développement (stade larve trochophore). C'est à dire environ une dizaine d'heures après la formation du mésentoblaste 4d (Figure 41). L'embryon est alors constitué de plusieurs centaines de cellules dont la nature est extrêmement difficile à déterminer.

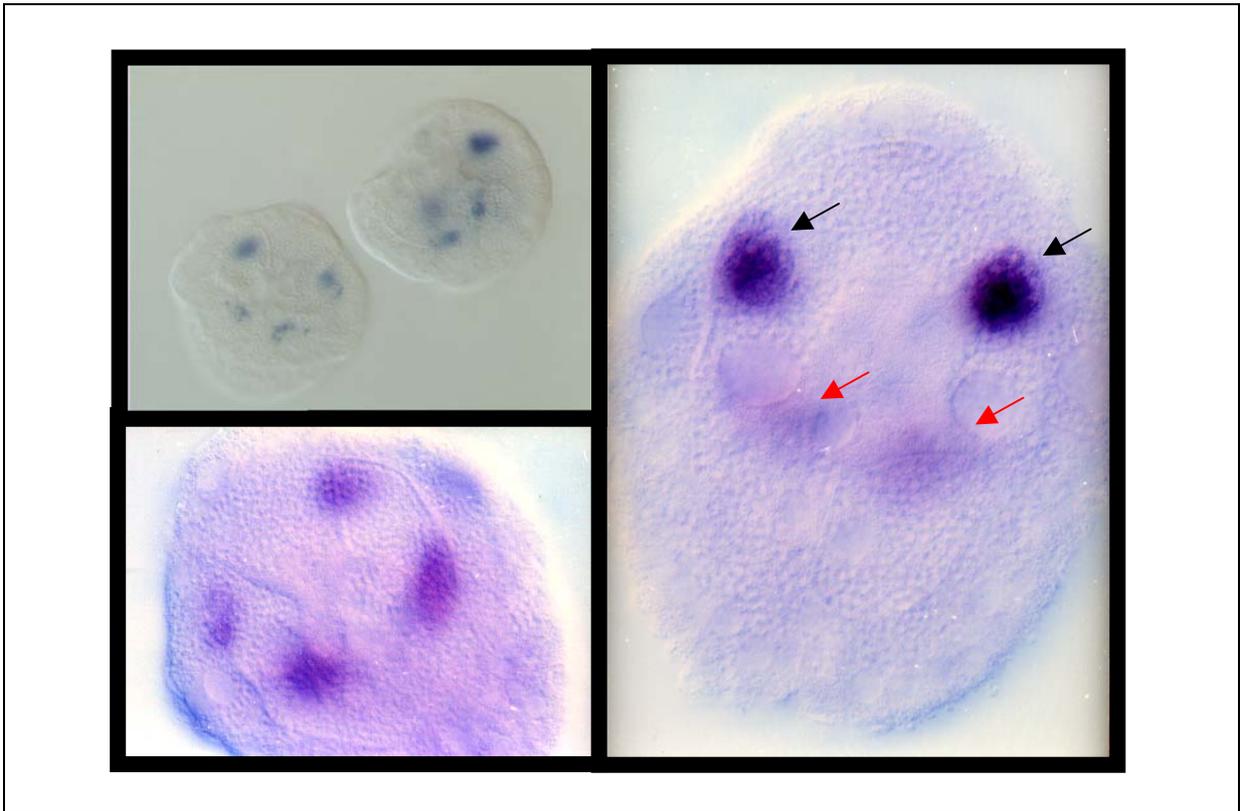


Figure 51: Expression de *pv-Slak1*, stade larves trochophores (16 h). Expression antéro-ventrale, flèches noires - Expression postéro-dorsale, flèches rouges

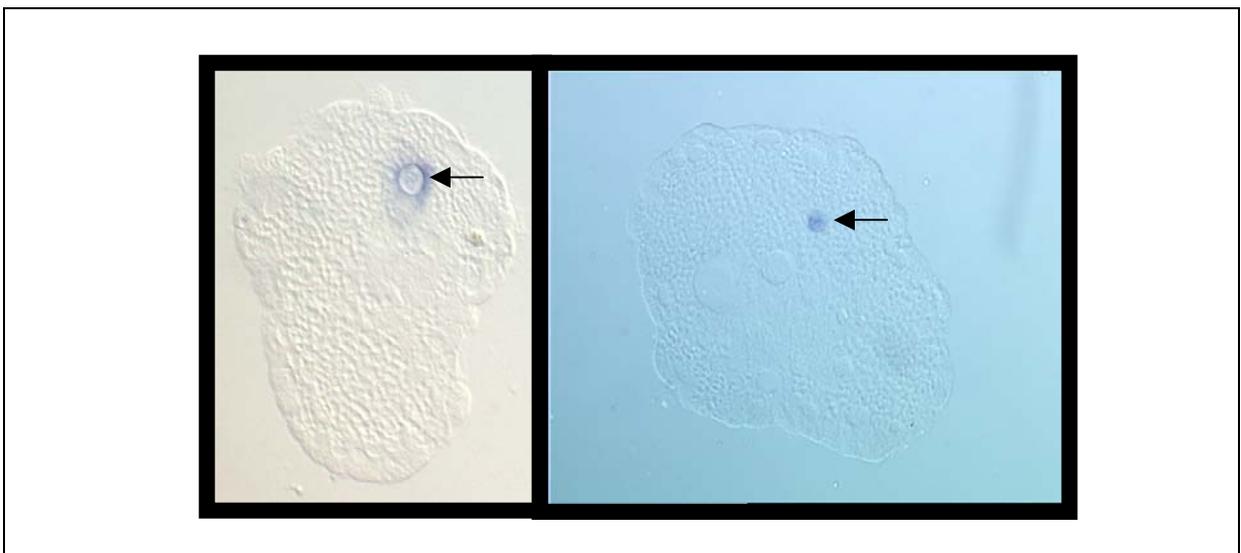


Figure 52: Section (5 µm) de larves trochophores après hybridation *in situ* *pv-Slak1*

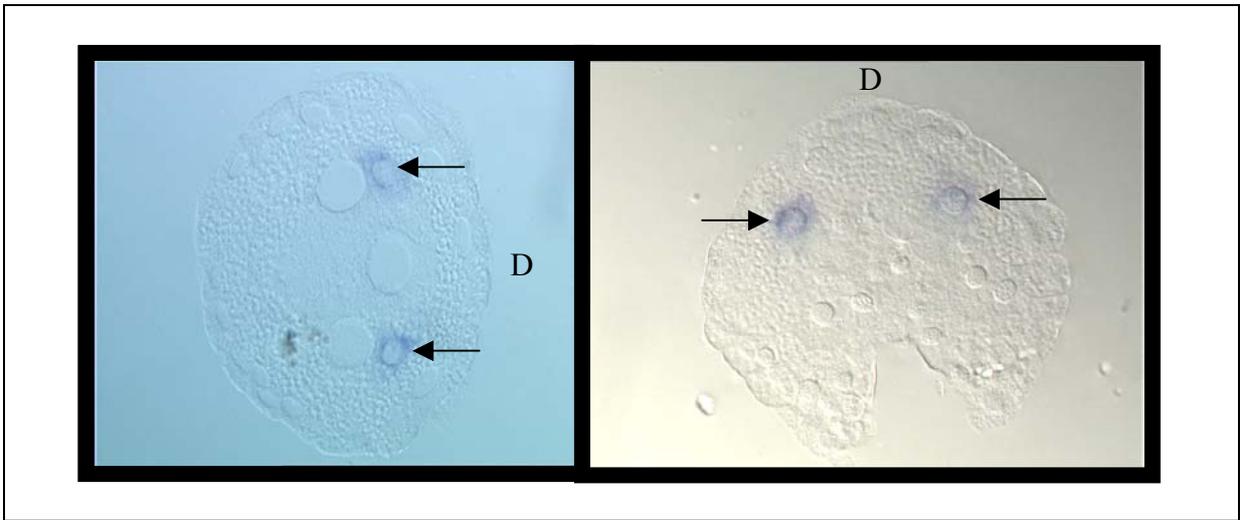


Figure 53: Section de larves trochophores après hybridation *in situ* pv-*Slak1* (stade 16 h)
D: face dorsale

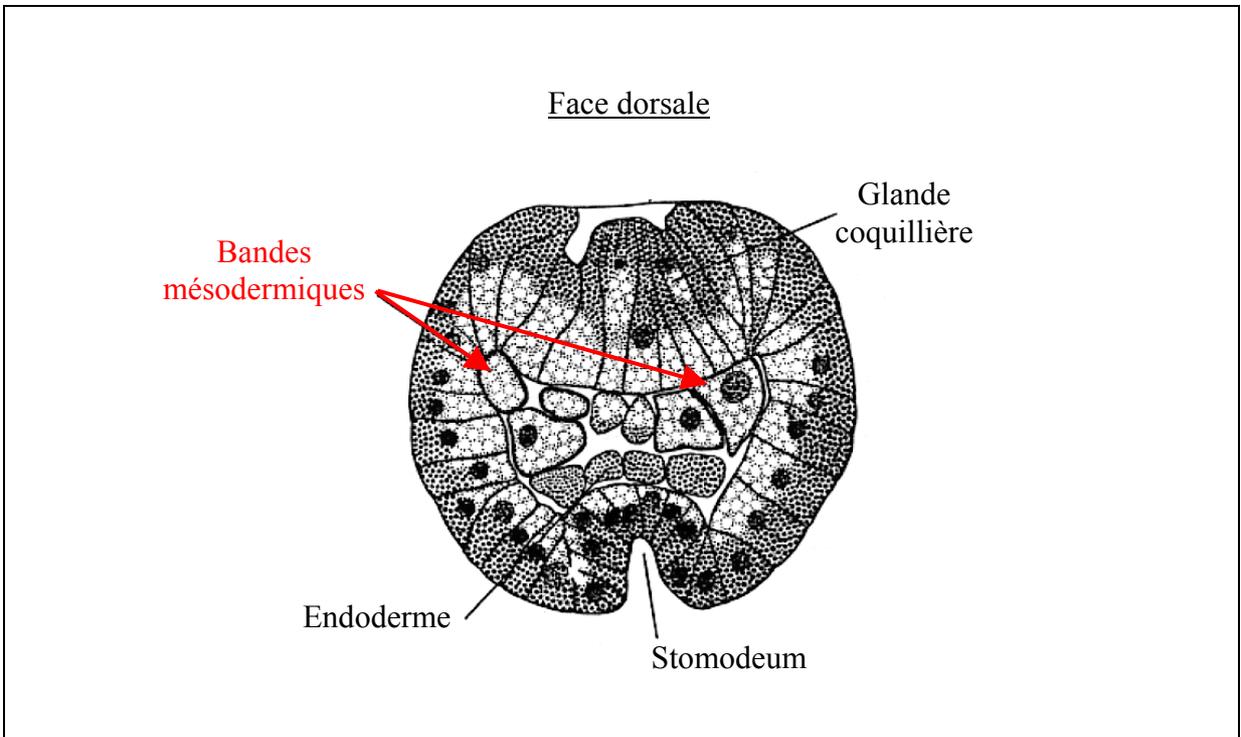


Figure 54: Coupe de larve trochophore de Patelle. Vue du pôle animal. (d'après Smith, 1935)

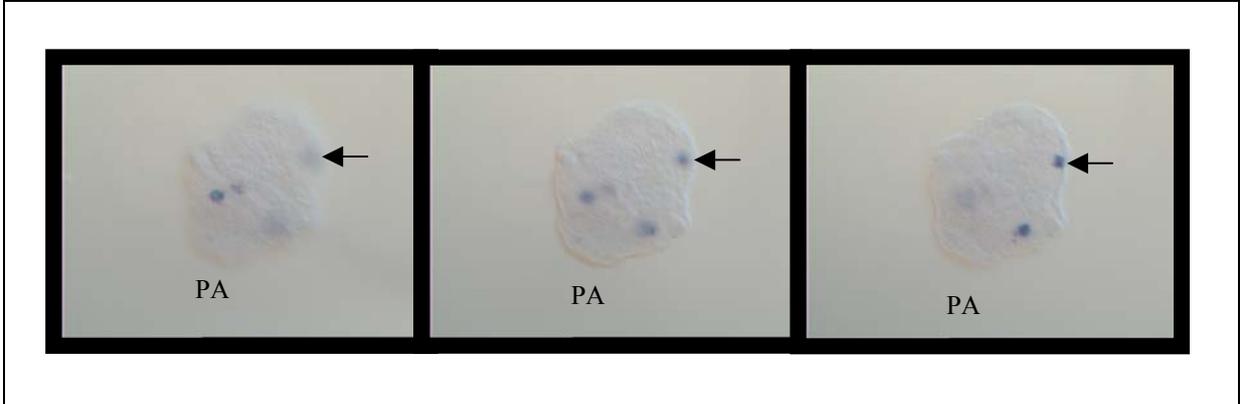


Figure 55: Expression de pv-*Slak1*, stade larves trochophores (24 h). PA: Pôle animal. L'expression au niveau du pied est repérée par une flèche.

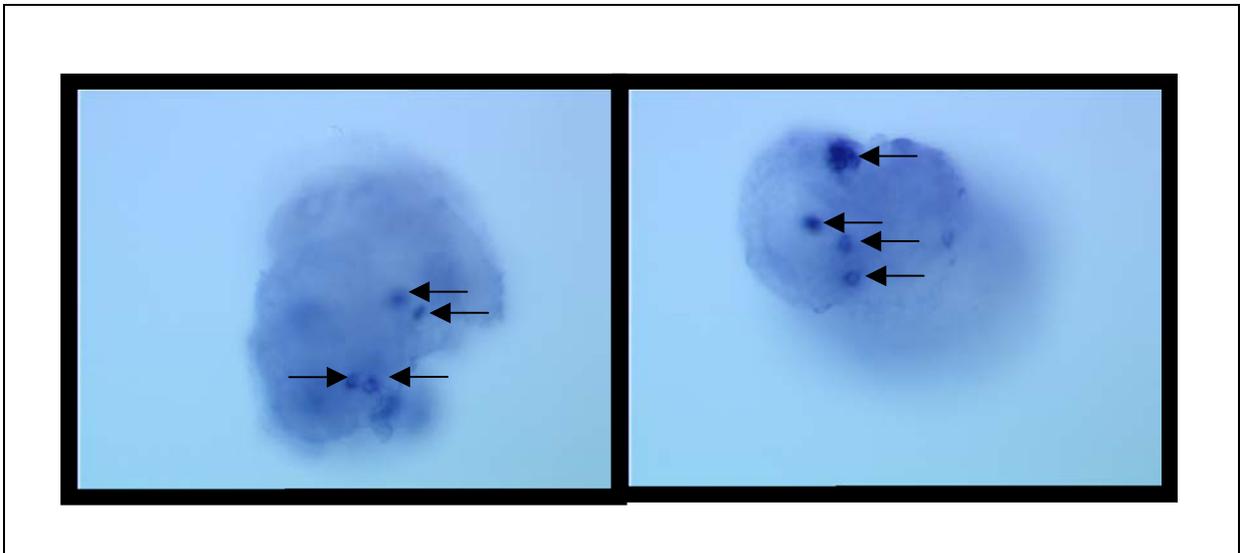


Figure 56: Expression de pv-*Slak1*, stade larves trochophores (36 h)

A ce stade, l'expression des messagers de *pv-Slak1* est restreinte à quatre régions (Figure 51). Des coupes fines ont montrés que le marquage de ces régions correspondait en réalité à quatre cellules (Figure 52 et 53). Deux de ces cellules sont situées ventralement dans la région trochale, les deux autres étant situées dorsalement dans la région post-trochale.

A partir de la vingt quatrième heure de développement, une seconde zone d'expression intense apparaît au niveau du pied bilobé de la larve trochophore. Ce nouveau signal est exprimé de façon asymétrique et ne s'observe qu'au niveau de la partie droite du pied.

A partir de la trente sixième heure de développement, l'expression de *pv-Slak1* apparaît en de nombreux points que nous n'avons pas réussi à assigner à un type cellulaire de la larve ou une structure spécifique de la larve de Patelle (Figure 56). Il est cependant tout à fait envisageable qu'il ne s'agisse ici que d'un maintien de l'expression observée à 16 et 24 heures. Le profil d'expression résultant dans ce cas de migrations et de divisions des cellules préalablement marquées.

A ce jour, l'expression tardive (36 heures) ainsi que celle localisée dans la partie droite du pied ne font pas vraiment sens pour nous. Il semble cependant quasiment certain qu'il ne s'agit en aucun cas de cellules mésodermiques.

Les quatre cellules marquées à partir du stade seize heures semblent en revanche correspondre à l'emplacement des bandes mésodermiques (Figure 53 et 54). Le marquage n'est cependant pas présent dans la totalité de la bande mésodermique et semble uniquement restreint à ses extrémités. Il pourrait s'agir là en l'occurrence des zones de croissance des bandes mésodermiques.

9.3. Profil d'expression de *pv-Slak2*

La sonde utilisée pour la détecter l'expression de *pv-Slak2* correspond à un fragment de 1 kb borné en 3' par la boîte *Snail* de fixation à l'ADN. La synthèse a été réalisée dans les mêmes conditions que pour *pv-Slak1*.

Les premiers messagers de *pv-Slak2* sont détectés dès la huitième heure du développement, au niveau de la plaque apicale (Figure 57). Le premier signe visible d'expression est donc de nouveau nettement postérieur à la formation du mésentoblaste. L'origine ectodermique de ces cellules, ainsi que leur

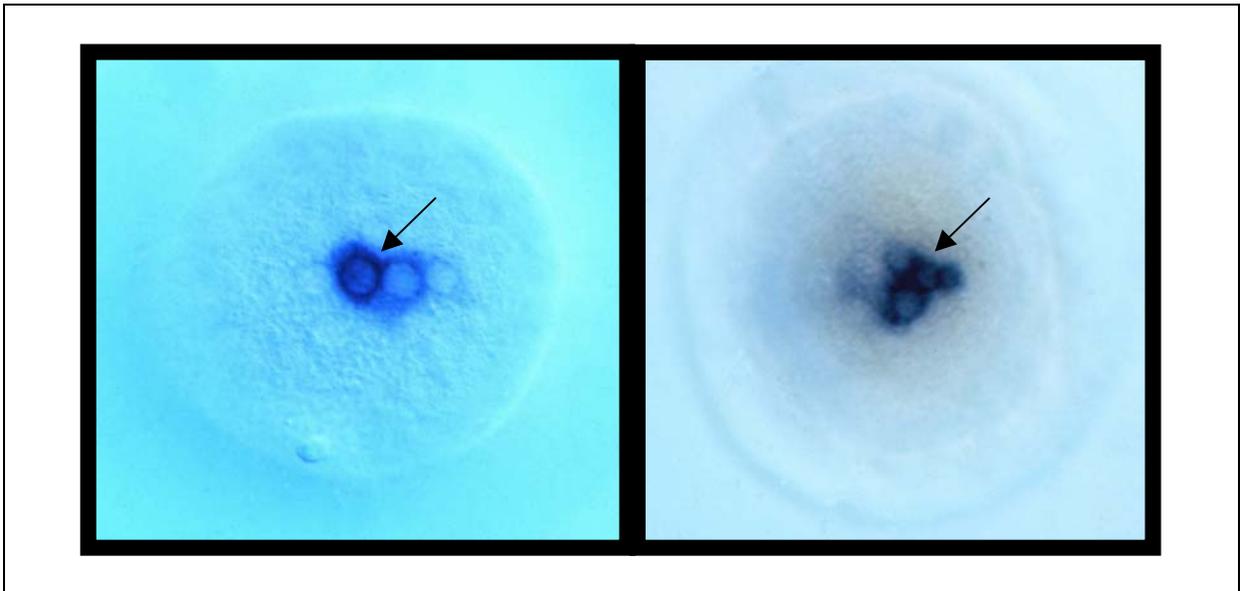


Figure 57: Expression de pv-*Slak2*, stade larve trochophore (8 h à gauche et 11 h à droite), vue apicale.

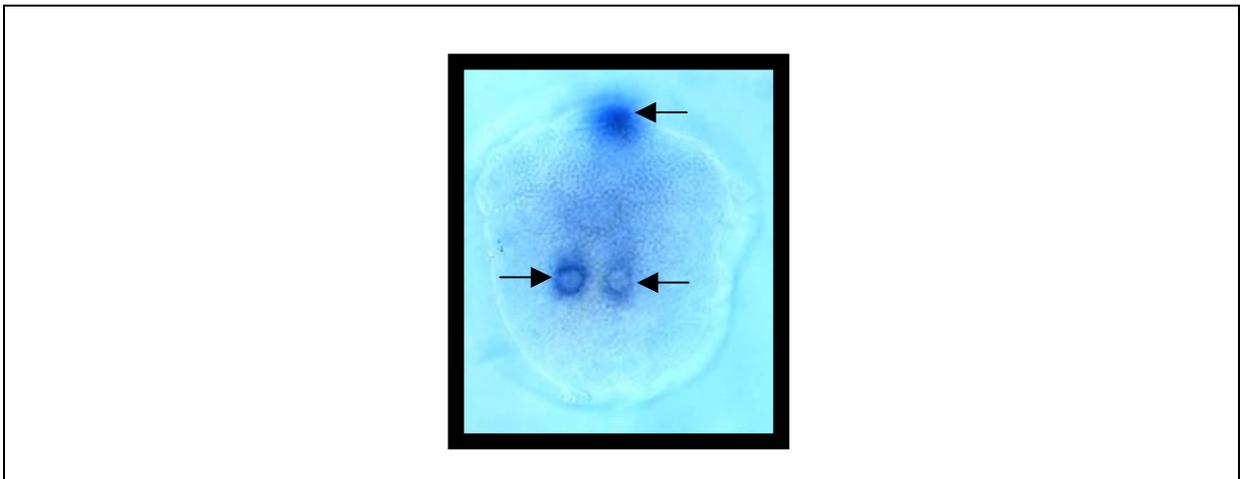


Figure 58: Expression de pv-*Slak2*, stade larve trochophore (11 h), vue ventrale

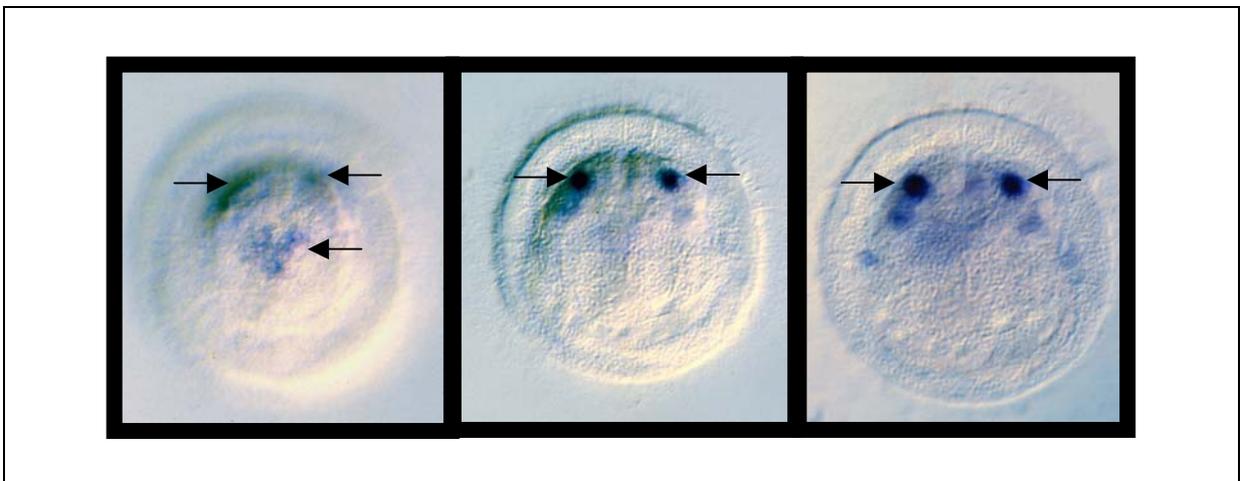


Figure 59: Expression de pv-*Slak2*, stade larve trochophore (11 h), vue du pôle animal.

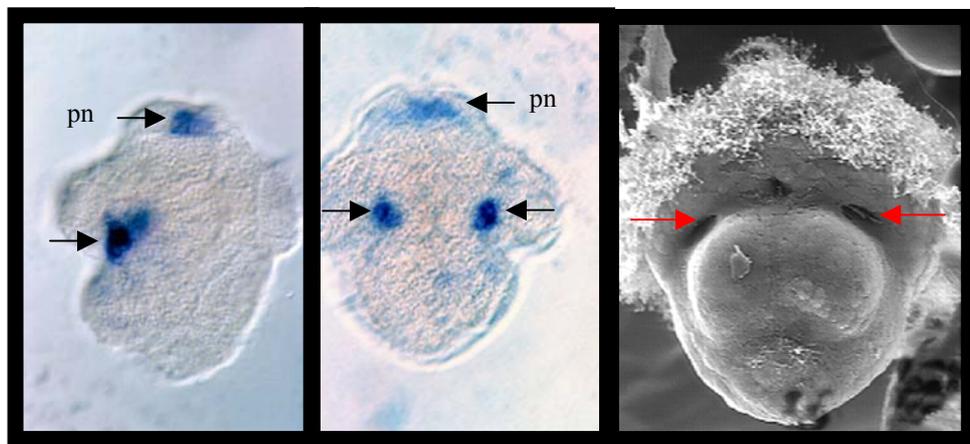


Figure 60: Expression de pv-Slak2 au stade larve trochophore (11 h). Vue du côté gauche (à gauche), vue ventrale (au centre). Cônes d'invagination du manteau repérés par les flèches rouges (à droite). pn: plaque neurale.

localisation, nous incite à penser qu'il s'agit là d'un groupe de cellules nerveuses situées à la base du toupet apical.

Si l'expression apicale de *pv-Slak2* se maintient jusqu'au stade 24 heures, une seconde zone d'expression apparaît néanmoins dès la onzième heure du développement (Figures 58, 59 et 60). Localisée dans la région pré-trochale, cette expression est symétrique et située de part et d'autre du pied. Elle se concentre dans un petit groupe de cellules et semble correspondre à la zone d'invagination du manteau (Figure 60). Cette région d'origine ectodermique correspond donc à une région où de nombreuses migrations cellulaires sont supposées se produire.

9.4. L'approche par anti-corps

La synthèse d'anti-corps polyclonaux dirigés contre la totalité de la séquence protéine de *pv-Slak1* a été réalisée dans notre équipe par Martine Le Gouar. Les essais d'immuno détection *in situ* n'ont cependant donner aucun résultat positif à ce jour.

9.5. Conclusions

Les gènes *pv-Slak1* et *pv-Slak2* présentent tous les deux des profils d'expressions différents et extrêmement dynamiques qui ne s'accordent pas avec l'hypothèse d'un rôle clé dans la formation précoce du mésoderme chez la Patelle.

Si le gène *pv-Slak1* semble s'exprimer dans certaines cellules mésodermiques (extrémité des bandes mésodermiques), il est malgré tout difficile d'imaginer qu'il ait à ce stade un rôle de gène spécificateur du mésoderme.

L'expression de *pv-Slak2* dans les cônes d'invagination du manteau est plus certainement en relation avec les processus de motilité et d'adhésion cellulaire. On retrouve d'ailleurs là une des fonctions connues pour certains des membres des gènes de la famille *Snail* (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Hemavathy et al., 2000).

La fonction ancestrale des gènes de la famille *Snail* pourrait donc être de permettre les Transitions Epthélio-Mésenchymateuses (TEM). Leur expression serait alors plus spécifique du mésenchyme que

du mésoderme. Ces transitions constituant un des moyens principaux de migration cellulaire au cours de l'embryologie (Hay, 1995) il n'est donc par étonnant de retrouver l'expression des gènes de la famille *Snail* dans les régions qui subissent de nombreux mouvements cellulaires au cours de l'ontogenèse des métazoaires et plus particulièrement lors de la gastrulation: différenciation du mésoderme, délamination des neuroblastes, migration des cellules de la crête neurale, etc.

Les cadhérines et les caténines sont des protéines transmembranaires connues pour interagir avec les protéines du cytosquelette et contrôler la formation des jonctions adhérentes des épithéliums (Yagi and Takeichi, 2000). Ces molécules jouent donc un rôle central dans les processus d'adhésion (Hynes, 1992; Gumbiner, 1996; Garcia-Castro et al., 2000) et de migration cellulaire (Burdsal et al., 1993). On sait depuis peu, qu'en se fixant sur les E-box situées en amont des E-cadhérines (Batlle et al., 2000), les gènes de la famille *Snail* contribuent à réguler négativement l'expression de ces molécules (Giroldi et al., 1997; Cano et al., 2000) et favorisent ainsi les processus de migration cellulaire qui interviennent lors du développement précoce des métazoaires (Hemavathy et al., 2000).

L'expression de *pv-Slak1* dans les zones de croissance des bandes mésodermiques, ainsi que celle de *pv-Slak2* dans les cônes d'invagination du manteau, pourrait être révélatrice des régions subissant des transitions épithélio-mésenchymateuses lors du développement précoce de la Patelle. En outre, l'expression de *pv-Slak2* dans la plaque neurale ainsi que le rôle de certains membres de la famille *Snail* lors de la neurogenèse (en particulier chez la *Drosophile*) pourrait d'ailleurs également s'expliquer par l'importance de la régulation des cadhérines dans l'établissement et le fonctionnement du système nerveux (Yagi and Takeichi, 2000).

Le rôle des gènes *Snail* dans le contrôle de l'endo-réplication (*Souris* et *Drosophile*) et de l'apoptose (*Nématode*) ne semble pas être conservé chez la Patelle. Il s'agit donc vraisemblablement de fonctions dérivées spécifiques (apoptose) ou acquises par convergence (endo-réplication).

Conclusions

La découverte, au cours des vingt dernières années, de gènes contrôlant la formation du feuillet mésodermique chez la *Drosophile* (ecdysozoaire) et le Xénope (deutérostomiens) nous a progressivement permis de passer d'une définition topologique et fonctionnelle à une définition génétique du mésoderme. En effet, malgré des modalités de formation différentes entre deutérostomiens et ecdysozoaires, un petit nombre de gènes conservés entre ces deux groupes semble jouer un rôle majeur dans la formation du mésoderme. La recherche, chez une espèce appartenant au groupe sous-étudié des lophotrochozoaires, de gènes homologues de ces gènes clés pourrait nous permettre aujourd'hui de vérifier s'il existe un fondement génétique à l'hypothèse de l'homologie du mésoderme chez tous les *Bilateria* (Haeckel, 1874).

Le mollusque *Patella vulgata* possède en outre un mode de développement de type spiral dont l'une des principales caractéristiques embryologiques est que le mésoderme dérive, pour l'essentiel, d'une cellule souche unique: le mésentoblaste (4d). L'expression de gènes connus pour leur fonction mésodermique dans ce blastomère constituerait donc un argument fort en faveur de l'homologie du mésoderme chez les trois grands groupes de métazoaires (ecdysozoaires, lophotrochozoaires et deutérostomiens).

Parmi la dizaine de gènes qui semblent intervenir dans la formation du mésoderme et qui sont conservés chez la *Drosophile* et le Xénope, je me suis particulièrement attaché au cours de mon travail de thèse à la recherche d'homologues du gène *Snail*. Ce facteur de transcription à doigt de zinc est en effet connu pour son rôle essentiel au cours de la gastrulation et plus particulièrement lors de la formation du mésoderme chez la *Drosophile*.

La caractérisation de deux paralogues du gène *Snail* (*pv-Slak1* et *pv-Slak2*) chez la Patelle nous indique que ce gène est également conservé chez les lophotrochozoaires. L'étude de la similarité de tous les membres de la famille *Snail* identifiés à ce jour nous indique de plus qu'en dehors du motif *Snail* de fixation à l'ADN, il n'existe pas de conservation de séquence significative entre ces gènes. Les régions régulatrices "putatives" semblent donc spécifiques de chacun des membres de cette famille. Si l'utilisation des domaines *Snail* ne nous suffit pas à définir sans ambiguïté les relations d'orthologie qui peuvent exister entre ces gènes, l'approche phylogénétique nous permet néanmoins d'établir l'existence de plusieurs duplications survenues de manière indépendante au cours de l'évolution de ces gènes.

Les profils d'expression obtenus chez la Patelle pour ces deux gènes nous conduisent aujourd'hui à formuler de nouvelles hypothèses sur la fonction du gène ancestral. Ils nous mènent en effet à rejeter l'hypothèse d'une fonction ancestrale de type "spécificateur du mésoderme", car seul l'un des deux gènes (*pv-Slak1*) semble s'exprimer dans un petit nombre de cellules d'origine mésodermique. Cette expression mésodermique est cependant très postérieure à la formation du mésentoblaste et présente vraisemblablement une spécificité mésenchymateuse plutôt qu'une spécificité mésodermique. On retrouve également ce type de spécificité chez le second gène (*pv-Slak2*) puisqu'il s'exprime dans les cellules des cônes d'invagination du manteau (ectoderme).

Des données obtenues récemment chez la souris (Cano et al., 2000) et l'homme (Batlle et al., 2000) ont montré que chez ces organismes, les gènes *Snail* régulaient négativement l'expression de molécules connues pour leur rôle central dans les processus d'adhésion et de mobilité cellulaire: les E-cadhérines. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives en qui concerne l'interprétation de nos observations. L'expression des gènes *pv-Slak1* et *pv-Slak2* dans les zones de croissance des bandes mésodermiques d'une part, dans les cônes d'invagination du manteau d'autre part, ainsi que dans les cellules de la plaque neurale peut en effet s'accorder avec l'idée d'une action de ces gènes dans la régulation de l'expression des cadhérines et le contrôle des transitions épithélio-mésenchymateuses. De la même façon, le rôle des gènes de la famille *Snail* chez la Drosophile, au cours de la gastrulation, lors de la délamination des neuroblastes, ou bien encore lors de la formation du mésoderme, peuvent tout à fait être ré-interprétés en terme de régulateur des transitions épithélio-mésenchymateuses. Le phénotype des mutants pouvant alors s'expliquer en partie par des défauts de migrations cellulaires.

Nos observations chez la Patelle nous conduisent aujourd'hui à émettre l'hypothèse d'une fonction ancestrale du gène *Snail* dans le contrôle des transitions épithélio-mésenchymateuses.

L'existence de nombreuses duplications indépendantes au sein de la famille des gènes *Snail*, conjuguée à une très faible conservation des séquences régulatrices de ces protéines nous conduisent à proposer, pour cette famille de gènes, un scénario d'évolution par duplication/dégénération/complémentation (DDC) basé sur le modèle de Force (Force et al., 1999). La variabilité des séquences régulatrices jouerait alors un rôle essentiel dans la sélection des partenaires et la sousfonctionalisation de la fonction initiale de ce facteur de transcription. Ainsi, les fonctions spécifiques des différents gènes *Snail* auraient été acquises par répartition des fonctions du gène ancestral entre les différents paralogues. On assisterait donc, après duplication, à une spécialisation de chacune des copies de ce gène.

Faute de temps, j'ai dû restreindre mon travail à une étude purement descriptive qui devra être complétée par une approche fonctionnelle, seule susceptible de confirmer notre hypothèse. Ce type d'approche reste cependant aujourd'hui encore difficile à réaliser *in vivo* chez la Patelle. Il nous faudra donc à l'avenir développer de nouvelles techniques d'études (injection de construction et d'ARN anti-sens) pour nous permettre de progresser dans l'étude de la fonction du gène *Snail* chez cet organisme. Une approche *in vitro* (recherche de séquences cibles, étude des promoteurs) pourrait cependant dans un premier temps constituer une alternative efficace aux carences actuelles de ce modèle. La recherche des partenaires de *Snail* chez la Patelle devrait ainsi nous permettre de vérifier et d'affiner à notre hypothèse de l'implication de ce gènes dans les transitions épithélio-mésenchymateuses.

L'ensemble de nos résultats, ne nous permet pas à ce jour de répondre à la question de l'homologie du mésoderme chez les *Bilateria*. La recherche d'homologues d'autres gènes responsables de la formation et de la spécificité du mésoderme est poursuivie donc actuellement chez la Patelle et des homologues de *Twist* et de *decapentaplegic* ont déjà été isolés. La détermination de leurs profils d'expression est en cours de caractérisation et devrait nous apporter des réponses quant au rôle de ces gènes dans la formation du mésoderme chez *Patella vulgata*.

Bibliographie

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor Miklos, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferreira, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-95.

Agius, E., Oelgeschläger, M., Wessely, O., Kemp, C., and De Robertis, E. M. (2000). Endodermal Nodal-related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. *Development* 127, 1173-1183.

Aguiñaldo, A. M., Turbeville, J. M., Linford, L. S., Rivera, M. C., Garey, J. R., Raff, R. A., and Lake, J. A. (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387, 489-93.

Akimaru, H., Hou, D. X., and Ishii, S. (1997). *Drosophila* CBP is required for dorsal-dependent twist gene expression. *Nat Genet* 17, 211-4.

Alberga, A., Boulay, J. L., Kempe, E., Dennefeld, C., and Haenlin, M. (1991). The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development* 111, 983-92.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.

Anderson, K. V., and Nusslein-Volhard, C. (1984). Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 311, 223-7.

Araujo, H., and Bier, E. (2000). *sog* and *dpp* exert opposing maternal functions to modify Toll signaling and pattern the dorsoventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 127, 3631-3644.

Arendt, D., and Nübler-Jung, K. (1997). Dorsal or ventral: similarities in fate maps and gastrulation patterns in annelids, arthropods and chordates. *Mech Dev* 61, 7-21.

Arendt, D., and Nübler-Jung, K. (1994). Inversion of dorsoventral axis? *Nature* 371, 371.

Arendt, D., and Nübler-Jung, K. (1999). Rearranging gastrulation in the name of yolk: evolution of gastrulation in yolk-rich amniote eggs. *Mechanisms of Development* 81, 3-22.

Ashraf, S. I., Hu, X., Roote, J., and Ip, Y. T. (1999). The mesoderm determinant snail collaborates with related zinc-finger proteins to control *Drosophila* neurogenesis. *Embo J* 18, 6426-38.

Azpiazu, N., and Frasch, M. (1993). *tinman* and *bagpipe*: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev* 7, 1325-40.

Azpiazu, N., Lawrence, P. A., Vincent, J. P., and Frasch, M. (1996). Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev* 10, 3183-94.

Balavoine, G. (1996). Origine et diversification des complexes de gènes Hox: inventaire de ces gènes chez la planaire *Polycelis nigra* (Orsay: Université de Paris XI), pp. 317.

- Batlle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-9.
- Bauer, H., Meier, A., Hild, M., Stachel, S., Economides, A., Hazelett, D., Harland, R. M., and Hammerschmidt, M. (1998). Follistatin and Noggin Are Excluded from the Zebrafish Organizer. *Developmental Biology* 204, 488-507.
- Baylies, M. K., and Bate, M. (1996). twist: a myogenic switch in *Drosophila* [see comments]. *Science* 272, 1481-4.
- Beddington, R. S. P., and Robertson, E. J. (1999). Axis Development and Early Asymmetry in Mammals. *Cell* 96, 195-209.
- Beer, J. G., Technau, G., and Campos Ortega, J. (1987). Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. IV. Commitment and proliferative capabilities of individual mesodermal cells. *Roux's Archive of Developmental Biology* 196, 222-230.
- Bodmer, R., and Venkatesh, T. V. (1998). Heart Development in *Drosophila* and Vertebrates: Conservation of Molecular Mechanisms. *Developmental Genetics* 22, 181-186.
- Boulay, J. L., Dennefeld, C., and Alberga, A. (1987). The *Drosophila* developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers. *Nature* 330, 395-8.
- Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R. T., and Kimelman, D. (1997). A b-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes & Development* 11, 2359-2370.
- Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I., Blaisdell, B. E., and Karlin, S. (1992). Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2002-2006.
- Brocchieri, L., and Karlin, S. (1998). A Symmetric-iterated Multiple Alignment of Protein Sequences. *J. Mol. Biol.* 276, 249-264.
- Bucher, E. A., and Seydoux, G. (1994). Gastrulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Seminars in Developmental Biology* 5, 121-130.
- Burdsal, C. A., Damsky, C. H., and Pedersen, R. A. (1993). The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. *Development* 118, 829-44.
- Buxton, P. G., Kostakopoulou, K., Brickell, P., Thorogood, P., and Ferretti, P. (1997). Expression of the transcription factor slug correlates with growth of the limb bud and is regulated by FGF-4 and retinoic acid. *Int J Dev Biol* 41, 559-68.
- Campos-Ortega, J. A., and Hartenstein, V. (1997). *The embryonic Development of Drosophila melanogaster*, 2^d Edition (Berlin: Springer).
- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.
- Carl, T. F., Dufton, C., Hanken, J., and Klymkowsky, M. W. (1999). Inhibition of neural crest migration in *Xenopus* using antisense Slug RNA. *Developmental Biology* 213, 101-115.
- Casal, J., and Leptin, M. (1996). Identification of novel genes in *Drosophila* reveals the complex regulation of early gene activity in the mesoderm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10327-32.
- Chasan, R., and Anderson, K. V. (1993). Maternal control of Dorsal-Ventral polarity and pattern in the embryo. In *The development of Drosophila melanogaster*, M. Bate and A. Martinez Arias, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 387-424.

- Chasan, R., Jin, Y., and Anderson, K. V. (1992). Activation of the easter zymogen is regulated by five other genes to define dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Development* *115*, 607-616.
- Christian, J. L., and Moon, R. T. (1993). Interactions between Xwnt-8 and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of *Xenopus*. *Genes & Development* *7*, 13-28.
- Church, G. M., and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *81*, 1991-1995.
- Clements, D., Friday, R. V., and Woodland, H. R. (1999). Mode of action of VegT in mesoderm and endoderm formation. *Development* *126*, 4903-4911.
- Cohen, M. E., Yin, M., Paznekas, W. A., Schertzer, M., Wood, S., and Jabs, E. W. (1998). Human SLUG gene organization, expression, and chromosome map location on 8q. *Genomics* *51*, 468-71.
- Conklin, E. G. (1897). The embryology of *Crepidula*. *J. Morph.*, 1-226.
- Conklin, E. G. (1905). The organisation and cell lineage of the ascidian egg. *J. Acad. Nat. Sci. Philadelphia* *13*, 1-119.
- Connors, S. A., Trout, J., Ekker, M., and Mullins, M. C. (1999). The role of tolloid/mini fin in dorsoventral pattern formation of the zebrafish embryo. *Development* *126*, 3119-30.
- Corbo, J. C., Erives, A., Di Gregorio, A., Chang, A., and Levine, M. (1997). Dorsoventral patterning of the vertebrate neural tube is conserved in a protochordate. *Development* *124*, 2335-44.
- Costa, M., Sweeton, D., and Wieschaus, E. (1993). Gastrulation in *Drosophila*: cellular mechanisms of morphogenetic movements. In *The development of Drosophila melanogaster*, M. Bate and A. Martinez Arias, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 425-466.
- Costa, M., Wilson, E. T., and Wieschaus, E. (1994). A Putative Cell Signal Encoded by the folded gastrulation Gene Coordinates Cell Shape Changes during *Drosophila* Gastrulation. *Cell* *76*, 1075-1089.
- Costello, D. P., and Henley, C. (1976). Spiralian Development: A Perspective. *American Zoologist* *16*, 277-291.
- Cuvier, G. (1817). *Le Règne Animal Distribué Selon son Organisation* (Paris: Deterville).
- Damen, P. (1994). Cell-lineage, and specification of developmental fate and dorsoventral organisation in the mollusc *Patella vulgata* (Utrecht: Utrecht University), pp. 147.
- Damen, P., and Dictus, W. J. A. G. (1994a). Cell lineage of the prototroch of *Patella vulgata* (Gastropoda, Mollusca). *Dev Biol* *162*, 364-83.
- Damen, P., and Dictus, W. J. A. G. (1994b). Cell-lineage analysis of the prototroch of the gastropod mollusc *Patella vulgata* shows conditional specification of some trochoblasts. *Roux's Archives of Developmental Biology* *203*, 187-198.
- Damen, W. G. M., van Grunsven, L. A., and van Loon, A. E. (1994). Transcriptional regulation of tubulin gene expression in differentiating trochoblasts during early development of *Patella vulgata*. *Development* *120*, 2835-45.
- Damen, W. G. M., Klerkx, A. H., and van Loon, A. E. (1996). Micromere formation at third cleavage is decisive for trochoblast specification in the embryogenesis of *Patella vulgata*. *Developmental biology* *178*(2), 238-250
- de Rosa, R., Grenier, J. K., Andreeva, T., Cook, C. E., Adoutte, A., Akam, M., Carroll, S. B., and Balavoine, G. (1999). Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature* *399*, 772-6.
- Denis, H. (1997). L'origine de la gastrulation. *Médecine/Sciences* *13*, 1503-1515.

- DeRobertis, E. M., and Sasai, Y. (1996). A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* *380*, 37-40.
- Dictus, W. J. A. G., and Damen, P. (1997). Cell-lineage and clonal-contribution map of the trochophore larva of *Patella vulgata* (Mollusca). *Mech Dev* *62*, 213-26.
- Dirksen, M. L., and Jamrich, M. (1995). Differential Expression of fork head Genes During Early *Xenopus* and Zebrafish Development. *Developmental Genetics* *17*, 107-116.
- Drier, E. A., Huang, L. H., and Steward, R. (1999). Nuclear import of the *Drosophila* Rel protein Dorsal is regulated by phosphorylation. *Genes & Development* *13*, 556-568.
- Emery, J. F., and Bier, E. (1995). Specificity of CNS and PNS regulatory subelements comprising pan-neural enhancers of the deadpan and scratch genes is achieved by repression. *Development* *121*, 3549-3560.
- Erives, A., Corbo, J. C., and Levine, M. (1998). Lineage-specific regulation of the *Ciona* snail gene in the embryonic mesoderm and neuroectoderm. *Dev Biol* *194*, 213-25.
- Essex, L. J., Mayor, R., and Sargent, M. G. (1993). Expression of *Xenopus* Snail in Mesoderm and Prospective Neural Fold Ectoderm. *Developmental Dynamics* *198*, 108-122.
- Ettensohn, C. A. (1999). Cell movements in the sea urchin embryo. *Current Opinion in Genetics & Development* *1999*, 461-465.
- Evans, S. M. (1999). Vertebrate tinman homologues and cardiac differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *10*, 73-83.
- Eyal-Giladi, H. (1997). Establishment of the axis in chordates: facts and speculations. *Development* *124*, 2285-96.
- Farr, G. H., Ferkey, D. M., Yost, C., Pierce, S. B., Weaver, C., and Kimelman, D. (2000). Interaction among GSK3, GBP, Axin, and APC in *Xenopus* Axis Specification. *The Journal of Cell Biology* *148*, 691-701.
- Ferguson, E. L. (1996). Conservation of dorsal-ventral patterning in arthropods and chordates. *Current Opinion in Genetics & Development* *6*, 424-431.
- Fitch, W. M. (1970). Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst. Zool.* *19*, 99-110.
- Fitch, W. M. (2000). Homology, a personal view on some of the problems. *Trends in Genetics* *16*, 227-231.
- Foe, V. E., Odell, G. M., and Edgar, B. A. (1993). Mitosis and morphogenesis in the *drosophila* embryo: point and counterpoint. In *The development of Drosophila melanogaster*, M. Bate and A. Martinez Arias, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 149-300.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L., and Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* *151*, 1531-45.
- François, V., Solloway, M., O'Neill, J. W., Emery, J., and Bier, E. (1994). Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by short gastrulation gene. *Genes & Development* *8*, 2602-2616.
- Franquinet, R., and Foucrier, J. (1998). *Embryologie descriptive* (Paris: Dunod).
- Frasch, M. (1995). Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* *374*, 464-467.
- Fujiwara, S., Corbo, J. C., and Levine, M. (1998). The snail repressor establishes a muscle/notochord boundary in the *Ciona* embryo. *Development* *125*, 2511-20.

- Fuse, N., Hirose, S., and Hayashi, S. (1996). Determination of wing cell fate by the escargot and snail genes in *Drosophila*. *Development* *122*, 1059-67.
- Fuse, N., Hirose, S., and Hayashi, S. (1994). Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by escargot. *Genes Dev* *8*, 2270-81.
- Galindo, R. L., Edwards, D. N., Gillespie, S. K. H., and Wasserman, S. A. (1995). Interaction of the pelle kinase with the membrane-associated protein tube is required for transduction of the dorsoventral signal in *Drosophila* embryos. *Development* *121*, 2209-2218.
- Gallien, L. (1979). *L'oeuf et les stades initiaux de l'ontogenèse* (Paris: PUF).
- Gallien, L. (1958). *Problèmes et concepts de l'embryologie expérimentale*, 2^e édition Edition, J. Rostand, ed.: Gallimard).
- Garcia-Castro, M. I., Vielmetter, E., and Bronner-Fraser, M. (2000). N-Cadherin, a cell adhesion molecule involved in establishment of embryonic left-right asymmetry. *Science* *288*, 1047-1051.
- Geoffroy Saint-Hilaire, E. (1822). *Considérations générales sur la vertèbre*. *Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle* *9*, 89-119.
- Gerhart, J. (2000). Special feature: inversion of the chordate body axis: are there alternatives? [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 4445-8.
- Gilbert, S. F. (1997). *Developmental Biology*, Fifth edition Edition (Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.).
- Giroldi, L. A., Bringuier, P. P., de Weijert, M., Jansen, C., van Bokhoven, A., and Schalken, J. A. (1997). Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun* *241*, 453-8.
- Goodman, S. A., Albano, R., Wardle, F. C., Matthews, G., Tannahill, D., and Dale, L. (1998). BMP1-Related Metalloproteinases Promote the Development of Ventral Mesoderm in Early *Xenopus* Embryos. *Developmental Biology* *195*, 144-157.
- Goriely, A., Stella, M., Coffinier, C., Kessler, D., Mailhos, C., Dessain, S., and Desplan, C. (1996). A functional homologue of goosecoid in *Drosophila*. *Development* *122*, 1641-1650.
- Grau, Y., Carteret, C., and Simpson, P. (1984). Mutations and chromosomal rearrangement affecting the expression of Snail, a gene involved in embryonic patterning in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *108*, 347-360.
- Grimes, H. L., Chan, T. O., Zweidler-McKay, P. A., Tong, B., and Tschlis, P. N. (1996). The Gfi-1 Proto-Oncoprotein Contains a Novel Transcriptional Repressor Domain, SNAG, and Inhibits G1 Arrest Induced by Interleukin-2 Withdrawal. *Molecular and Cellular Biology* *16*, 6263-6272.
- Großhans, J., Bergmann, A., Haffter, P., and Nüsslein-Volhard, C. (1994). Activation of the kinase Pelle by Tube in the dorsoventral signal transduction pathway of *Drosophila* embryo. *Nature* *372*, 563-566.
- Guerrier, P. (1970). Les caractères de la segmentation et de la détermination de la polarité dorsoventrale dans le développement de quelques Spiralia. I. Les formes à clivage égal. *J Embryol Exp Morphol* *23*, 611-37.
- Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* *84*, 345-57.
- Haeckel, E. (1874). Die Gastrea-Theorie, die phylogenetische Classification des Thier-reichs und die Homologie der Keimblätter. *Jenaische Z Naturwiss* *8*, 1-55.
- Haeckel, E. (1866). *Generelle Morphologie der Organismen* (Berlin: Georg Reimer).
- Halanych, K. M., Bacheller, J. D., Aguinaldo, A. M. A., Liva, S. M., Hillis, D. M., and Lake, J. A. (1995). 18S rDNA evidence that the lophophorates are protostome animals. *Science* *267*, 1641-1643.

- Hall, B. K. (2000). The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadrolastic not triploblastic. *Evolution & Development* 2, 3-5.
- Hammerschmidt, M., and Nusslein-Volhard, C. (1993). The expression of a zebrafish gene homologous to *Drosophila* *snail* suggests a conserved function in invertebrate and vertebrate gastrulation. *Development* 119, 1107-18.
- Han, J. H., Lee, S. H., LeMosy, E. K., and Hashimoto, C. (2000). Gastrulation Defective is a serine protease involved in activating the receptor Toll to polarize the *Drosophila* embryo. *P.N.A.S. USA* 97, 9093-9097.
- Harland, R., and Gerhart, J. (1997). Formation and function of spemann's organizer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13, 611-667.
- Hashimoto, C., Gerttula, S., and Anderson, K. V. (1991). Plasma membrane localization of the Toll protein in the syncytial *Drosophila* embryo: importance of transmembrane signaling for dorsal-ventral pattern formation. *Development* 111, 1021-1028.
- Hay, E. D. (1995). An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Acta Anat* 154, 8-20.
- Hayashi, S., Hirose, S., Metcalfe, T., and Shirras, A. D. (1993). Control of imaginal cell development by the *escargot* gene of *Drosophila*. *Development* 118, 105-15.
- Heasman, J. (1997). Patterning the *Xenopus* blastula. *Development* 124, 4179-4191.
- Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kintner, C., Noro, C. Y., and Wylie, C. (1994). Overexpression of Cadherins and Underexpression of b-Catenin Inhibit Dorsal Mesoderm Induction in Early *Xenopus* Embryos. *Cell* 79, 791-803.
- Hemavathy, K., Ashraf, S. I., and Ip, Y. T. (2000). Snail/Slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257, 1-12.
- Hemavathy, K., Meng, X., and Ip, Y. T. (1997). Differential regulation of gastrulation and neuroectodermal gene expression by Snail in the *Drosophila* embryo. *Development* 124, 3683-91.
- Henikoff, S., and Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 10915-10919.
- Holland, P. W., Koschorz, B., Holland, L. Z., and Herrmann, B. G. (1995). Conservation of Brachyury (T) genes in amphioxus and vertebrates: developmental and evolutionary implications. *Development* 121, 4283-91.
- Hong, C. C., and Hashimoto, C. (1995). An Unusual Mosaic Protein with a Protease Domain, Encoded by the *nudel* gene, Is Involved in Defining Embryonic Dorsoventral Polarity in *Drosophila*. *Cell* 82, 785-794.
- Hoppler, S., and Moon, R. T. (1998). BMP-2/-4 and Wnt-8 cooperatively pattern the *Xenopus* mesoderm. *Mechanisms of Development* 71, 119-129.
- Hopwood, N. D., Pluck, A., and Gurdon, J. B. (1989). A *Xenopus* mRNA related to *Drosophila* *twist* is expressed in response to induction in the mesoderm and the neural crest. *Cell* 59, 893-903.
- Houillon, C. (1967). *Embryologie* (Paris: Hermann).
- Hyde, C. E., and Old, R. W. (2000). Regulation of the early expression of the *Xenopus* nodal-related 1 gene, *Xnr1*. *Development* 127, 1221-1229.
- Hynes, R. O. (1992). Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. *Current Opinion in Genetics and Development* 2, 621-624.

- Iemura, S. I., Yamamoto, T., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., Sugino, H., and Ueno, N. (1998). Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 9337-9342.
- Ip, Y. T. (1995). Converting an activator into a repressor. *Current Biology* *5*, 1-3.
- Ip, Y. T., Levine, M., and Bier, E. (1994). Neurogenic expression of snail is controlled by separable CNS and PNS promoter elements. *Development* *120*, 199-207.
- Ip, Y. T., Maggert, K., and Levine, M. (1994). Uncoupling gastrulation and mesoderm differentiation in the *Drosophila* embryo. *Embo J* *13*, 5826-34.
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Bier, E., and Levine, M. (1992). The dorsal gradient morphogen regulates stripes of rhomboid expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* *6*, 1728-39.
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K., and Levine, M. (1992). dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* *6*, 1518-30.
- Isaac, A., Sargent, M. G., and Cooke, J. (1997). Control of vertebrate left-right asymmetry by a snail-related zinc finger gene [see comments]. *Science* *275*, 1301-4.
- Jeffery, W. R., and Swalla, B. J. (1997). Tunicates. In *Embryology: Constructing the Organism*, S. C. Gilbert and A. M. Raunio, eds. (Sunderland, M.A.: Sinauer Associates, Inc.).
- Jiang, R., Lan, Y., Norton, C. R., Sundberg, J. P., and Gridley, T. (1998). The *Slug* gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice. *Dev Biol* *198*, 277-85.
- Jones, C. M., Dale, L., Hogan, B. L. M., Wright, C. V. E., and Smith, J. C. (1996). Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) acts during gastrula stages to cause ventralization of *Xenopus* embryos. *Development* *122*, 1545-1554.
- Jones, C. M., Lyons, K. M., Lapan, P. M., Wright, C. V. E., and Hogan, B. L. M. (1992). DVR-4 (Bone Morphogenetic Protein-4) as a posterior-ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. *Developmental* *115*, 639-647.
- Kasai, J., Nambu, J. R., Lieberman, P. M., and Crews, S. T. (1992). Dorsal-ventral patterning in *Drosophila*: DNA binding of snail protein to the single-minded gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 3414-3418.
- Kataoka, H., Murayama, T., Yokode, M., Mori, S., Sano, H., Ozaki, H., Yokota, Y., Nishikawa, S. I., and Kita, T. (2000). A novel Snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Research* *28*, 626-633.
- Kelly, C., Chin, A. J., Leatherman, J. L., Kozlowski, D. J., and Weinberg, E. S. (2000). Maternally controlled β -catenin signaling is required for organizer formation in the zebrafish. *Development* *127*, 3899-3911.
- Kidd, S. (1992). Characterization of the *Drosophila* cactus Locus and Analysis of Interactions between cactus and dorsal Proteins. *Cell* *71*, 623-635.
- Kimelman, D., and Griffin, K. J. P. (1998). Mesodermal Induction: A Postmodern View. *Cell* *94*, 419-421.
- Kimelman, D., and Griffin, K. J. P. (2000). Vertebrate mesendoderm induction and patterning. *Current opinion in Genetics & Development* *10*, 350-356.
- Klug, A., and Schwabe, J. W. R. (1995). Zinc fingers. *FASEB J.* *9*, 597-604.
- Kofoid, C. A. (1894). One some laws of cleavage in *Limax*. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* *29*, 180-203.

- Kofron, M., Demel, T., Xanthos, J., Lohr, J., Sun, B., Sive, H., Osada, S. I., Wright, C., Wylie, C., and Heasman, J. (1999). Mesoderm induction in *Xenopus* is a zygotic event regulated by maternal vegT via TGF β growth factors. *Development* *126*, 5759-5770.
- Kosman, D., Ip, Y. T., Levine, M., and Arora, K. (1991). Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo. *Science* *254*, 118-22.
- Kusch, T., and Reuter, R. (1999). Functions for *Drosophila* brachyenteron and forkhead in mesoderm specification and cell signalling. *Development* *126*, 3991-4003.
- LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (1998). Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development*, 2403-2414.
- LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (2000). Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev Biol* *221*, 195-205.
- Labonne, C., Burke, B., and Whitman, M. (1995). Role of MAP kinase in mesoderm induction and axial patterning during *Xenopus* development. *Development* *121*, 1475-1486.
- Lacalli, T. C. (1995). Dorsoventral axis inversion [letter; comment]. *Nature* *373*, 110-1.
- Lai, Z., Fortini, M. E., and Rubin, G. M. (1991). The embryonic expression patterns of *zfh-1* and *zfh-2*, two *Drosophila* genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins. *Mechanisms of Development* *34*, 123-134.
- Langeland, J. A., and Kimmel, C. B. (1997). Fishes. In *Embryology: Constructing the organism*, S. C. Gilbert and A. M. Raunio, eds. (Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.).
- Langeland, J. A., Tomsa, J. M., Jackman, W. R., Jr., and Kimmel, C. B. (1998). An amphioxus snail gene: expression in paraxial mesoderm and neural plate suggests a conserved role in patterning the chordate embryo. *Dev Genes Evol* *208*, 569-77.
- Lankester, R. E. (1877). Notes on the anatomy and classification of the animal kingdom: comprising a revision of speculations relative to the origin and significance of the germ-layers. *Quart. J. Microsc. Soc.* *17*, 399-454.
- Larabell, C. A., Torres, M., Rowning, B. A., Yost, C., Miller, J. R., Wu, M., Kimelman, D., and Moon, R. T. (1997). Establishment of the Dorso-ventral Axis in *Xenopus* Embryos Is Presaged by Early Asymmetries in b-Catenin That Are Modulated by the Wnt Signaling Pathway. *The Journal of Cell Biology* *136*, 1123-1136.
- Lehming, N., Thanos, D., Brickman, J. M., Ma, J., Maniatis, T., and Ptashne, M. (1994). An HMG-like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor. *Nature* *371*, 175-179.
- Lemaire, P., and Kodjabachian, L. (1996). The vertebrate organizer: structure and molecules. *Trends in Genetics* *12*, 525-531.
- Leptin, M. (1995). *Drosophila* gastrulation: from pattern formation to morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* *11*, 189-212.
- Leptin, M. (1999). Gastrulation in *Drosophila*: the logic and the cellular mechanisms. *Embo J* *18*, 3187-92.
- Leptin, M. (1991). twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev* *5*, 1568-76.
- Leptin, M., Casal, J., Grunewald, B., and Reuter, R. (1992). Mechanisms of early *Drosophila* mesoderm formation. *Dev Suppl*, 23-31.
- Leptin, M., and Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* *110*, 73-84.
- Leptin, M., and Roth, S. (1994). Autonomy and non-autonomy in *Drosophila* mesoderm determination and morphogenesis. *Development* *120*, 853-9.

- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-70.
- Linker, C., Bronner-Fraser, M., and Mayor, R. (2000). Relationship between Gene Expression Domains of Xsnail, Xslug, and Xtwist and Cell Movement in the Prospective Neural Crest of *Xenopus*. *Developmental Biology* 224, 215-225.
- Loon, A. v., Goedemans, H., Daemen, A., Kamp, A. v. d., and Biggelaar, J. v. d. (1993). Actin genes expressed during early development of *Patella vulgata*. *Roux's Archives of Developmental Biology* 203, 77-84.
- Magnuson, T., and Faust, C. J. (1995). Vertebrate Gastrulation and Axial Patterning: Editorial Overview, Part 2. *Developmental Genetics* 17, 103-106.
- Mannervik, M., Nibu, Y., Zhang, H., and Levine, M. (1999). Transcriptional Coregulators in Development. *Science* 284, 606-609.
- Massagué, J. (1998). TGF β Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry* 67, 753-791.
- Massagué, J. (1996). TGF β Signaling: Receptors, Transducers, and Mad Proteins. *Cell* 85, 947-950.
- Mauhin, V., Lutz, Y., Dennefeld, C., and Alberga, A. (1993). Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res* 21, 3951-7.
- Mayor, R., Essex, L. J., Bennett, M. F., and Sargent, M. G. (1993). Distinct elements of the xсна promoter are required for mesodermal and ectodermal expression. *Development* 119, 661-71.
- Mayor, R., Morgan, R., and Sargent, M. G. (1995). Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121, 767-777.
- Metzstein, M. M., and Horvitz, H. R. (1999). The *C. elegans* cell death specification gene *ces-1* encodes a snail family zinc finger protein. *Mol Cell* 4, 309-19.
- Miller, J. R., and Moon, R. T. (1996). Signal transduction through β -catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes & Development* 10, 2527-2539.
- Miller, J. R., Rowning, B. A., Larabell, C. A., Yang-Snyder, J. A., Bates, R. L., and Moon, R. T. (1999). Establishment of the Dorsal-Ventral Axis in *Xenopus* Embryos Coincides with the Dorsal Enrichment of Dishevelled That Is Dependent on Cortical Rotation. *The Journal of Cell Biology* 146, 427-437.
- Morisato, D., and Anderson, K. V. (1995). Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Annu Rev Genet* 29, 371-99.
- Morisato, D., and Anderson, K. V. (1994). The *spätzle* Gene Encodes a Component of the Extracellular Signaling Pathway Establishing the Dorsal-Ventral Pattern of the *Drosophila* Embryo. *Cell* 76, 677-688.
- Morrill, J. B. (1997). Cellular patterns and morphogenesis in early development of freshwater pulmonate snails, *Lymnaea* and *Physa* (Gastropoda, Mollusca). In *Reproductive Biology of invertebrates*, K. G. Adiyodi and R. G. Adiyodi, eds., pp. 70-107.
- Mullins, M. C. (1998). Holy Tolloido: Tolloid cleaves SOG/Chordin to free DPP/BMPs. *Trends in Genetics* 14.
- Nakayama, H., Scott, I. C., and Cross, J. C. (1998). The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol* 199, 150-63.
- Needleman, S., B., Wunsch, C., D. (1970). A General Method Applicable to the Search for Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins. *J. Mol. Biol.* 48, 443-453
- Nguyen, H. T., and Xu, X. (1998). *Drosophila* *mef-2* expression during mesoderm development is controlled by a complex array of cis-acting regulatory modules. *Developmental Biology* 204, 550-566.

- Nibu, Y., Zhang, H., Bajor, E., Barolo, S., Small, S., and Levine, M. (1998). dCtBP mediates transcriptional repression by knirps, Kruppel and snail in the drosophila embryo [In Process Citation]. *Embo J* 17, 7009-20.
- Niehrs, C., and De Robertis, E. M. (1992). Vertebrate axis formation. *Current Opinion in Genetics and Development* 2, 550-555.
- Nielsen, C. (1995). *Animal evolution: interrelationships of the living phyla* (New York: Oxford University Press, Inc.).
- Nieto, M. A. (1999). Reorganizing the Organizer 75 Years On. *Cell* 98, 417-425.
- Nieto, M. A., Bennett, M. F., Sargent, M. G., and Wilkinson, D. G. (1992). Cloning and developmental expression of Sna, a murine homologue of the Drosophila snail gene. *Development* 116, 227-37.
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G., and Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264, 835-9.
- Nieuwkoop, P. D. (1969). The formation of mesoderm in Urodelean amphibians. I. Induction by the endoderm. *Wilhelm Roux ' Arch. f. Entw. Mech.* 162, 341-373.
- Nishida, H. (1994). Localization of determinants for formation of the anterior-posterior axis in eggs of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development* 120, 3093-3104.
- Nübler-Jung, K., and Arendt, D. (1994). Is ventral in insects dorsal in vertebrates. *Roux's Arch Dev Biol* 203, 357-366.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., and Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Rou'x Archives of Developmental Biology* 193, 267-282.
- Oelgeschläger, M., Larrain, J., Geissert, D., and De Robertis, E. M. (2000). The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 405, 757-763.
- Ohno, S. (1970). *Evolution of gene duplication* (Heidelberg: Springer-Verlag).
- O'Reilly, M. A. J., Smith, J. C., and Cunliffe, V. (1995). Patterning of the mesoderm in *Xenopus*: dose-dependent and synergistic effects of Brachyury and Pintallavis. *Development* 121, 1351-1359.
- Osada, S. I., and Wright, C. V. E. (1999). *Xenopus* nodal-related signaling is essential for mesendodermal patterning during early embryogenesis. *Development* 126, 3229-3240.
- Pan, D. J., Huang, J. D., and Courey, A. J. (1991). Functional analysis of the *Drosophila* twist promoter reveals a dorsal-binding ventral activator region. *Genes Dev* 5, 1892-901.
- Papayioannou, V. E., and Silver, L. M. (1998). The T-box gene family. *Bioessays* 20, 9-19.
- Patten, W. (1885). The embryology of *Patella*. *Arb. Zoöl. Inst. Wien* 6, 149-174.
- Paznekas, W. A., Okajima, K., Schertzer, M., Wood, S., and Jabs, E. W. (1999). Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAIL) and a related processed pseudogene (SNAILP). *Genomics* 62, 42-9.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E. M. (1996). Dorsoventral Patterning in *Xenopus*: Inhibition of Ventral Signals by Direct Binding of Chordin to BMP-4. *Cell* 86, 589-598.
- Raff, R. A. (1996). *The Shape of Life. Genes, Development, and the Evolution of Animal Form.* (Chicago: The University of Chicago Press).
- Ray, R. P., Arora, K., Nüsslein-Volhard, C., and Gelbart, W. M. (1991). The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 113, 35-54.

Reach, M., Galindo, R. L., Towb, P., Allen, J. L., Karin, M., and Wasserman, S. A. (1996). A Gradient of Cactus Protein Degradation Establishes Dorsoventral Polarity in the *Drosophila* Embryo. *Developmental Biology* 180, 353-364.

Reuter, R., and Leptin, M. (1994). Interacting functions of snail, twist and huckebein during the early development of germ layers in *Drosophila*. *Development* 120, 1137-50.

Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, R., and Leptin, M. (1997). Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development* 124, 2915-22.

Roark, M., Sturtevant, M. A., Emery, J., Vaessin, H., Grell, E., and Bier, E. (1995). scratch, a pan-neural gene encoding a zinc finger protein related to snail, promotes neuronal development. *Genes Dev* 9, 2384-98.

Rodaway, A., Takeda, H., Koshida, S., Broadbent, J., Price, B., Smith, J. C., Patient, R., and Holder, N. (1999). Induction of the mesendoderm in the zebrafish germ ring by yolk cell-derived TGF- β family signals and discrimination of mesoderm and endoderm by FGF. *Development* 126, 3067-3078.

Romano, L. A., and Runyan, R. B. (1999). Slug Is a Mediator of Epithelial-Mesenchymal Cell Transformation in the Developing Chicken Heart. *Developmental biology* 212, 243-254.

Romano, L. A., and Runyan, R. B. (2000). Slug is an Essential Target of TGFbeta2 Signaling in the Developing Chicken Heart. *Dev Biol* 223, 91-102.

Ros, M. A., Sefton, M., and Nieto, M. A. (1997). Slug, a zinc finger gene previously implicated in the early patterning of the mesoderm and the neural crest, is also involved in chick limb development. *Development* 124, 1821-9.

Roth, S., Jordan, P., and Karess, R. (1999). Binuclear *Drosophila* oocytes: consequences and implications for dorsal-ventral patterning in oogenesis and embryogenesis. *Development* 126, 927-34.

Roth, S., and Schupbach, T. (1994). The relationship between ovarian and embryonic dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development* 120, 2245-57.

Roth, S., Stein, D., and Nusslein-Volhard, C. (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* 59, 1189-202.

Roux, W. (1894). The problems, methods and scope of developmental mechanics. In *Biological Lectures of the Marine Biology Laboratory of Woods Hole* (Boston: Ginn and Company), pp. 149-190.

Rushlow, C. A., Han, K., Manley, J. L., and Levine, M. (1989). The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*. *Cell* 59, 1165-77.

Saint-Hilaire, G. (1822). *Mém. du Mus. Hist. Nat.* 9, 89-119.

Samakovlis, C., Manning, G., Steneberg, P., Hacoheh, N., Cantera, R., and Krasnow, M. A. (1996). Genetic control of epithelial tube fusion during *Drosophila* tracheal development. *Development* 122, 3531-6.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition Edition (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sargent, M. G., and Bennett, M. F. (1990). Identification in *Xenopus* of a structural homologue of the *Drosophila* gene snail. *Development* 109, 967-73.

Savagner, P., Yamada, K. M., and Thiery, J. P. (1997). The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 137, 1403-19.

Schier, A. F., and Shen, M. M. (2000). Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* 403, 385-389.

- Schier, A. F., and Talbot, W. S. (1998). The zebrafish organizer. *Current Opinion in Genetics & Development* 8, 464-471.
- Schierenberg, E. (1997). Nematodes, the Roundworms. In *Embryology: constructing the organism*, S. F. Gilbert and A. M. Raunio, eds. (Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.), pp. 131-148.
- Schierenberg, E., and Strome, S. (1992). The establishment of embryonic axes and determination of cell fates in embryos of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Seminars in Developmental Biology* 3, 22-33.
- Schneider, D. S., Jin, Y., Morisato, D., and Anderson, K. V. (1994). A processed form of the Spätzle protein defines dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Development* 120, 1243-1250.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P., and Bork, P. (2000). SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* 28, 231-234.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signalling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 5857-5864.
- Sefton, M., Sanchez, S., and Nieto, M. A. (1998). Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development* 125, 3111-21.
- Shelton, C. A., and Wasserman, S. A. (1993). pelle Encodes a Protein Kinase Required to Establish Dorsoventral Polarity in the *Drosophila* Embryo. *Cell* 72, 515-525.
- Simpson, P. (1983). Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *drosophila* embryos. *Genetics* 105, 615-632.
- Sive, H. L. (1993). The frog prince-ss: A molecular formula for dorsoventral patterning in *Xenopus*. *Genes & Development* 7, 1-12.
- Smith, D. E., Franco del Amo, F., and Gridley, T. (1992). Isolation of Sna, a mouse gene homologous to the *Drosophila* genes snail and escargot: its expression pattern suggests multiple roles during postimplantation development [published erratum appears in *Development* 1993 Mar;117(3):preceding table of contents]. *Development* 116, 1033-9.
- Smith, F. G. W. (1935). The Development of *Patella Vulgata*. *Phil. Trans. Roy. Soc. London B* 225, 95-125.
- Smith, J. C., Price, B. M., Green, J. B. A., Weigel, D., and Herrmann, B. G. (1991). Expression of a *Xenopus* Homolog of Brachyury (T) Is an Immediate-Early Response to Mesoderm Induction. *Cell* 67, 79-87.
- Smith, T. F., and Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J.Mol. Biol.* 147, 195-197.
- Sokol, S. Y. (1999). Wnt signaling and dorso-ventral axis specification in vertebrates. *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 405-410.
- Sommer, R. J., Retzlaff, M., Goerlich, K., Sander, K., and Tautz, D. (1992). Evolutionary conservation pattern of zinc-finger domains of *Drosophila* segmentation genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10782-6.
- Sommer, R. J., and Tautz, D. (1994). Expression patterns of twist and snail in *Tribolium* (Coleoptera) suggest a homologous formation of mesoderm in long and short germ band insects. *Dev Genet* 15, 32-7.
- Speeman, H., and Mangold, H. (1924). Uber Induktion von Embryonenanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Wilhelm Roux' Arch. f. EntwMech. Org.* 100, 599-638.
- St Johnston, D., and Nusslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68, 201-19.
- Staebling-Hampton, K., Hoffmann, F. M., Baylies, M. K., Rushton, E., and Bate, M. (1994). dpp induces mesodermal gene expression in *Drosophila*. *Nature* 372, 783-786.

- Stein, D., and Nüsslein-Volhard, C. (1992). Multiple Extracellular Activities in *Drosophila* Egg Perivitelline Fluid Are Required for Establishment of Embryonic Dorsal-Ventral Polarity. *Cell* 68, 429-440.
- Stein, D., Roth, S., Vogelsang, E., and Nüsslein-Volhard, C. (1991). The Polarity of the Dorsoventral Axis in the *Drosophila* Embryo Is Defined by an Extracellular Signal. *Cell* 65, 725-735.
- Stein, S., and Kessel, M. (1995). A homeobox gene involved in node, notochord and neural plate formation of chick embryos. *Mechanisms of Development* 49, 37-48.
- Stern, C. D. (1992). Vertebrate gastrulation. *Current Opinion in Genetics and Development* 2, 556-561.
- Steward, R. (1989). Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell* 59, 1179-88.
- Streit, A., and Stern, C. D. (1999). Mesoderm patterning and somite formation during node regression: differential effects of chordin and noggin [In Process Citation]. *Mech Dev* 85, 85-96.
- Sun, B. I., Bush, S. M., Collins-Racie, L. A., La Vallie, E. R., Di Blasio-Smith, E. A., Wolfman, N. M., McCoy, J. M., and Sive, H. L. (1999). *derrière*: a TGF- β family member required for posterior development in *Xenopus*. *Development*, 1467-1482.
- Swofford, D. L. (1998). PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), version 4 (Sunderland, MA: Sinauer).
- Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., and Rothstein, R. J. (1983). The Double-Strand-Break Repair Model for Recombination. *Cell* 33, 25-35.
- Talbot, W. S., Trevarrow, B., Halpern, M. E., Melby, A. E., Farr, G., Postlethwait, J. H., Jowett, T., Kimmel, C. B., and Kimelman, D. (1995). A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature* 378, 150-157.
- Tanaka, M., Kasahara, H., Bartunkova, S., Schinke, M., Komuro, I., Inagaki, H., Lee, Y., Lyons, G. E., and Izumo, S. (1998). Vertebrate Homologs of *tinman* and *bagpipe*: Roles of the Homeobox Genes in Cardiovascular Development. *Developmental Biology* 22, 239-249.
- Tanaka-Matakatsu, M., Uemura, T., Oda, H., Takeichi, M., and Hayashi, S. (1996). Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in *Drosophila* trachea regulated by the transcription factor *Escargot*. *Development* 122, 3697-705.
- Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C., and Perrin-Schmitt, F. (1988). Sequence of the *twist* gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *Embo J* 7, 2175-83.
- Thisse, C., Perrin-Schmitt, F., Stoetzel, C., and Thisse, B. (1991). Sequence-specific transactivation of the *Drosophila twist* gene by the dorsal gene product. *Cell* 65, 1191-201.
- Thisse, C., Thisse, B., and Postlethwait, J. H. (1995). Expression of *snail2*, a second member of the zebrafish *snail* family, in cephalic mesendoderm and presumptive neural crest of wild-type and *spadetail* mutant embryos. *Dev Biol* 172, 86-99.
- Thisse, C., Thisse, B., Schilling, T. F., and Postlethwait, J. H. (1993). Structure of the zebrafish *snail1* gene and its expression in wild-type, *spadetail* and *no tail* mutant embryos. *Development* 119, 1203-15.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-80.
- Umbauher, M., Marshall, C. J., Mason, C. S., Old, R. W., and Smith, J. C. (1995). Mesoderm induction in *Xenopus* caused by activation of MAP kinase. *Nature* 376, 58-62.

- van den Biggelaar, J. A. M. (1977). Development of dorsoventral polarity and mesentoblast determination in *Patella vulgata*. *J Morphol* 154, 157-86.
- van den Biggelaar, J. A. M., and Guerrier, P.. (1979). Dorsoventral polarity determination as concomittant results of cellular interactions in the mollusk *Patella vulgata*. *Developmental Biology* 68, 462-471.
- van den Biggelaar, J. A. M., Dictus, W. J. A. G., and van Loon, A. E. (1997). Cleavage patterns, cell-lineages and cell specification are clues to phyletic lineages in Spiralia. *Cell & Developmental Biology* 8, 367-378.
- van den Biggelaar, J. A. M., and Haszprunar, G. (1996). Cleavage patterns and mesentoblast formation in the gastropoda: an evolutionnary perspective. *Evolution* 50, 1520-1540.
- van den Biggelaar, J. A. M., van Loon, A. E., and Damen, W. G. M. (1996). Mesentoblast and trochoblast specification in species with spiral cleavage predict their phyletic relations. *Netherlands Journal of Zoology* 46, 8-21.
- van Eeden, F., and St Johnston, D. (1999). The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 9, 396-404.
- Veltmaat, J. M., Orelia, C. C., Ward-van Oostwaard, D., van Rooijen, M. A., Mummery, C. L., and Defize, L. H. K. (2000). Snail is an immediate early target gene of parathyroid hormone related peptide signaling in parietal endoderm formation. *International Journal of Developmental Biology* 44, 297-307.
- Verdonk, N. H., and van den Biggelaar, J. A. M. (1983). Early development and the formation of germ layers. In *The Mollusca: Development*, N. H. Verdonk and J. A. M. van den Biggelaar, eds. (New York: Academic Press), pp. 91-122.
- Wada, S., and Saiga, H. (1999). Cloning and embryonic expression of *Hrsna*, a snail family gene of the ascidian *Halocynthia roretzi*: implication in the origins of mechanisms for mesoderm specification and body axis formation in chordates. *Dev Growth Differ* 41, 9-18.
- Wagner, A., Blackstone, N., Cartwright, P., Dick, M., Misof, B., Snow, P., Wagner, G., Bartels, J., Murtha, M., and Pendleton, J. (1994). Surveys of genes families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift. *Systematic Biology* 43, 250-261.
- Whiteley, M., Noguchi, P. D., Sensabaugh, S. M., Odenwald, W. F., and Kassis, J. A. (1992). The *Drosophila* gene *escargot* encodes a zinc finger motif found in snail- related genes. *Mech Dev* 36, 117-27.
- Whitman, M. (1998). Smads and early developmental signaling by the TGFb superfamily. *Genes & Development* 12, 2445-2462.
- Whittaker, J. R. (1997). Cephalocordates, the Lancelets. In *Embryology: constructing the organism*, S. F. Gilbert and A. M. Raunio, eds. (Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.), pp. 365-381.
- Wiegner, O., and Schierenberg, E. (1999). *Regulative Development in a Nematode Embryo: A Hierarchy of Cell Fate Transformations*. *Developmental Biology* 215, 1-12.
- Wierzejski, A. (1905). *Embryologie von Physa fontinalis*. *L. Z. wiss. Zool.* 83, 502-706.
- Willmer, P. (1994). *Invertebrates relationships: patterns in animal evolution*: Cambridge University Press).
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P., and Meyerowitz, E. (1998). *Principles of Development* (London: Current Biology Ltd.).
- Wray, G. A. (1997). Echinoderms. In *Embryology: Constructing the Organism*, S. C. Gilbert and A. M. Raunio, eds. (Sunderland, M.A.: Sinauer Associates, Inc.).
- Wylie, C., Kofron, M., Payne, C., Anderson, R., Hosobuchi, M., Joseph, E., and Heasman, J. (1996). Maternal β -catenin establishes a 'dorsal signal' in early *Xenopus* embryos. *Development* 122, 2987-2996.

Yagi, T., and Takeichi, M. (2000). Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity [In Process Citation]. *Genes Dev* *14*, 1169-80.

Zhang, J., Houston, D. W., King, M. L., Payne, C., Wylie, C., and Heasman, J. (1998). The Role of Maternal VegT in Establishing the Primary Germ Layers in *Xenopus* Embryos. *Cell* *94*, 515-524.

Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J., and Harland, R. M. (1996). The Spemann Organizer Signal noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4. *Cell* *86*, 599-606.

Annexe

Projet d'article reprenant une partie des résultats présentés dans le chapitre 4 de ce manuscrit.

**Hypothetical ancestral function of the *Snail*-Related genes in *Bilateria*.
Characterization of two new members in the mollusc *Patella vulgata*.**

Olivier Lespinet^{*1}, Lex Nederbragt^{*2}, Nicolas Lartillot¹, Michel Cassan¹, André van Loon² and André Adoutte²

*: both authors contributed equally to this work

¹: Centre de Génétique Moléculaire, CNRS UPR 2167, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

²: Department of Experimental Zoology, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands

Corresponding author:

Pr. André ADOUTTE
Centre de Génétique Moléculaire
CNRS, UPR 2167
91198 Gif-sur-Yvette Cedex
France

Key words: mesoderm, *Snail/Slug* gene family, mollusc, *Patella vulgata*, epithelio-mesenchymal transitions

INTRODUCTION

A differentiated third germ layer, the mesoderm, is a characteristic of all bilaterally symmetrical animals (*Bilateria*). Two major lines of bilaterians, protostomes and deuterostomes, appear, however, on a purely descriptive basis, to specify their mesoderm during early development through quite different mechanisms. This raises the question of mesoderm homology across *Bilateria*. One possible approach to this question consists in studying genes known to be involved in mesoderm specification in an large group of animals, say protostomes, and establishing whether the same genes are involved in the same function in a phylogenetically very distant group, such as deuterostomes.

Recent molecular phylogenies (Halanych et al., 1995; Aguinaldo et al., 1997), as well as a reanalysis of morphological characters, have shown that bilaterians are in fact subdivided in three major clades: deuterostomes on one hand and protostomes on the other, themselves split into ecdysozoans and lophotrochozoans. Of the three clades, only two comprise "model" organisms that have been subjected to intensive molecular embryological approaches. We have set out to analyse the mechanisms of mesoderm specification in the third clade, lophotrochozoans and have focussed on the mollusc *Patella vulgata* since there was a wealth of descriptive and experimental embryology carried out on this genus. Our approach consisted in identifying a number of genes known or thought to be intimately involved in mesoderm specification in model organisms, specially *Drosophila*, and studying their time and pattern of expression in early *Patella* embryogenesis. Here, we report the analysis of the *Patella* homologue of the *Snail* gene.

The *snail* gene was first isolated as a zygotic lethal mutation in *Drosophila melanogaster*, responsible for a partial dorsalization of the embryo (Simpson, 1983; Nüsslein-Volhard et al., 1984). In these mutants, no ventral furrow is seen at gastrulation, and no or very few mesodermal tissues are formed (Simpson, 1983; Grau et al., 1984). This gene encodes a transcription factor (Boulay et al., 1987; Leptin, 1991; Kasai et al., 1992) that possesses a characteristic domain composed by 4 canonical **C-X₂-C-X₁₂-H-X₃-H** motives and one variant **C-X₂-C-X₁₂-H-X₄-C** motif in its amino terminus (Boulay et al., 1987; Klug and Schwabe, 1995). This "*snail*-box" (Whiteley et al., 1992) domain binds to the same canonical E-box sites (CAGGTG), as do bHLH transcription factors (Mauhin et al., 1993).

In *Drosophila*, *Snail* is first expressed at gastrulation in the presumptive mesoderm (at the ventral side of the blastoderm embryo) (Alberga et al., 1991; Leptin, 1991; Reuter and Leptin, 1994) where it represses ventrolateral neurogenic genes like *rhomboid* or *single-minded* (Leptin and Grunewald, 1990; Kosman et al., 1991; Leptin, 1991; Ip et al., 1992; Kasai et al., 1992; Hemavathy et al., 1997;

Nibu et al., 1998) and activates genes like *zfh1* or *heartless* (Lai et al., 1991; Casal and Leptin, 1996). Later in development, *snail* also appears in the midgut (endodermal derivative), in part of the Central Nervous System (CNS) and Peripheral Nervous System (PNS) (neuroblasts) (Ip et al., 1994), and in presumptive wing and haltere disc precursors (Alberga et al., 1991; Leptin, 1991).

Based on the presence of the “*snail*-box”, at least 5 other *snail*-related genes have been identified in *Drosophila melanogaster*: *escargot* (Whiteley et al., 1992), *scratch* (Roark et al., 1995), *worniu* (Ashraf et al., 1999), and *CG12605*, *CG17181*, two more divergent putative neural genes identified through the *Drosophila* genome project (Adams et al., 2000).

Escargot expression is mainly ectodermal and has been found in neurogenic and/or neural tissues (ventral ectoderm, developing PNS, and CNS), in imaginal cells (eye-antennal, leg, wing, haltere and genital discs, abdominal segment histoblasts, and optic lobe), and in trachea (Whiteley et al., 1992; Hayashi et al., 1993). *Escargot* has been shown to bind to the same E-box sequence as *snail* (Fuse et al., 1994; Fuse et al., 1996), and to be involved in regulation of diploidy in imaginal cells by inhibiting endoreplication (Hayashi et al., 1993; Fuse et al., 1994). It also controls tracheal fusion by activating the expression of epithelial tube fusion genes like DE-cadherin (Samakovlis et al., 1996; Tanaka-Matakatsu et al., 1996).

Worniu is expressed in precursor cells of the developing brain, in cells in the head region, and in the delaminating neuroblasts (Ashraf et al., 1999). *Scratch*, the last one for which expression data are available, has been detected in neuronal precursor cells (CNS and PNS) where it is assumed to be a pan-neural gene (Emery and Bier, 1995; Roark et al., 1995).

In *Drosophila*, the genes of this family have partial overlapping expression patterns and share the same binding sites. Moreover, three of them (*snail*, *escargot* and *worniu*) have the ability to compensate for the two others at least in the CNS (Ashraf et al., 1999) and two (*snail* and *escargot*) have the same target genes in the wing cells (Fuse et al., 1996). When we consider the different functions of the *snail*-related genes, these genes have at least four distinct functions in *Drosophila melanogaster*. They are involved in (i) mesoderm formation, (ii) gastrulation processes (ventral furrow formation), (iii) the control of imaginal cell endoreplication and (iv) the induction of neural cell fate (neuroblasts).

Members of the *snail* family have been identified in other ecdysozoan protostomes, i.e in arthropods (Sommer et al., 1992), and nematodes (Metzstein and Horvitz, 1999), and in deuterostomes, i.e. in echinoderms and chordates (Sargent and Bennett, 1990; Nieto et al., 1992; Smith et al., 1992; Sommer et al., 1992; Hammerschmidt and Nusslein-Volhard, 1993; Thisse et al., 1993), although they are more closely related to *escargot* than to *snail*.

Despite the fact that partial or complete *snail* related genes have been cloned in almost ten other arthropods, expression data are available only for the short germ band insect *Tribolium castaneum* in which species it is very similar to that observed in *Drosophila* (Sommer and Tautz, 1994). In *Caenorhabditis elegans* as in *Caenorhabditis briggsae*, the function of the the *snail*- related *ces-1* is quite different, indeed it is an apoptosis inhibitor of specific neural cells (Metzstein and Horvitz, 1999).

To our knowledge no expression data are available for the echinoderms to date. In urochordates, a *snail* homologue has been isolated in two different ascidian species (*Halocynthia roretzi* (Wada and Saiga, 1999) and *Ciona intestinalis* (Corbo et al., 1997)). In both cases *snail* is expressed in muscle (tail bud) and trunk mesenchyme precursors as well as in CNS precursors (lateral ependymal cells and anterior cerebral vesicle) (Corbo et al., 1997; Erives et al., 1998; Fujiwara et al., 1998; Wada and Saiga, 1999).

A *snail* homologue in a Cephalocordate (*Branchiostoma floridae*) is expressed in presomitic and somatic mesoderm, in lateral neural plate, along the lateral edge of the neural plate, and in a mass of cells in the tail bud (Langeland et al., 1998).

In vertebrates, the *snail*-related genes are split in two subfamilies, the *snail* and the *slug* subfamilies respectively. Each species studied to date possesses at least one copy of each subfamily (except zebrafish where no *slug* homologue has been found so far).

In vertebrates, *snail* is also expressed in migrating neural crest cells, but expression was also detected in undifferentiated and migrating mesoderm, in somites and limb bud progress zone (Sargent and Bennett, 1990; Nieto et al., 1992; Smith et al., 1992; Mayor et al., 1993; Buxton et al., 1997; Isaac et al., 1997; Ros et al., 1997; Linker et al., 2000). *Snail* was also shown to be involved in left-right asymmetry in chicken heart (Isaac et al., 1997) and control of endoreplication in trophoblast giant cells of the rodent placenta (Nakayama et al., 1998). A recent key finding about the function of *snail* in vertebrates is that it plays a role in the control of Epithelial-Mesenchymal Transitions (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Veltmaat et al., 2000) and was shown to act by repressing E-cadherin expression through the E-box in the mouse and human E-cadherin promoter (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000).

As mentioned above, there is no *slug* gene homologue in *Brachydanio rerio*, but the zebrafish does have two *snail* genes (Hammerschmidt and Nusslein-Volhard, 1993; Thisse et al., 1993; Thisse et al., 1995). They are both expressed in mesoderm (involuting cells, cephalic and axial), adaxial cells, in somites, in prospective tail bud, in neural crest and neural crest derivatives. Their expression patterns

are however not completely identical. Both are suspected to control cell adhesivity and/or cell mobility (Hammerschmidt and Nusslein-Volhard, 1993; Thisse et al., 1993; Thisse et al., 1995).

Only one member of the *slug* subfamily has been isolated in *Xenopus*, chicken, mouse and human (Nieto et al., 1994; Mayor et al., 1995; Savagner et al., 1997; Cohen et al., 1998) as is also the case for the *snail* sub-family in *Xenopus* and Chicken (Sargent and Bennett, 1990; Isaac et al., 1997), but two distinct *snail* homologues have been characterized in mouse and human (Nieto et al., 1992; Paznekas et al., 1999; Kataoka et al., 2000).

In all vertebrates for which data are available, the *slug* genes are expressed in migrating neural crest cells and neural crest derivatives (Nieto et al., 1994; Mayor et al., 1995; Jiang et al., 1998; Sefton et al., 1998; Linker et al., 2000) where they act as a transcriptional activator (LaBonne and Bronner-Fraser, 1998; LaBonne and Bronner-Fraser, 2000) and play a role in cell migration (Carl et al., 1999). Antisense injection experiments suggest that *slug* plays a role in Epithelio-Mesenchymal Transitions (EMTs) in this process (Nieto et al., 1994; Romano and Runyan, 1999; Romano and Runyan, 2000).

Smuc, the second *snail* member in mouse is expressed in skeletal muscle cells and thymus, it also binds to E-box sequences and seems to be involved in the control of myoblasts terminal differentiation (Kataoka et al., 2000).

In summary the *Snail*-related genes in vertebrates are involved in (i) Epithelio-Mesenchymal Transitions (ii) in control of endoreplication and (iii) are expressed in mesoderm (somites, neural crest).

Because only two major metazoan group (ectdysozoan and deuterostomes) were studied until now, all these data however do not allow any conclusion about the ancestral function (expression) of the *snail* gene. Before being able to conclude, we need indeed to study the expression of the *snail*-related genes in the third and last metazoan group, namely the lophotrochozoans.

Here we present the characterization of two new members of Snail-related genes from the Gastropod Mollusc *Patella vulgata*. We cloned both genes, examined their sequence and showed their spatio-temporal expression patterns through whole-mount *in situ* hybridisation. To date, they are the first representatives of this gene family in any lophotrochozoan, and their expression pattern authorises speculations about the ancestral function of the *snail* gene in *Bilateria*. Where a mesodermal precursor function was previously suggested for this gene, the results presented here do not fit with this idea but rather suggest that their ancestral function is more probably related to EMT and neural specification.

MATERIALS AND METHODS

PCR amplification:

PCR with degenerated primers Sna1W (GAAGATCTGGNGCNYTNAARATGCAYAT) and Sna4C (GAAGATCTRTGNGCNCKNARRTTNSWNCKRTC) was performed as follow: 50 ng of DNA from a unique individual were used as a template in a 30µl final volume reaction with 1µM of each primers, 10µM dNTP and 0.1 unit Taq polymerase with provided 1x buffer (Appligene). The PCR program was: 5 cycles (50 sec. 94°C, 1 min. 55°C (switch to 72°C by an increase of 1°C every 9 sec.), 2 min. 72°C,) followed by 30 cycles (50 sec. 94°C, 1 min. 30 sec. 55°C, 1min. 72°) and a final extension 10 min 72°C. Specificity of this first amplification has been controlled in the same conditions by a second PCR round using primers Sna2C (GAAGATCTAARGCNTTYWSNMGNCNTGG) and Sna3W (GAAGATCTRAANGGYTTYTCNCCNGTRTG) with the following program: 30 cycles (50 sec. 94°C, 1 min 30 55°C, 1 min. 72°C) and a final extension 10 min 72°C. Amplified fragments were cloned in TOPO-TA vector (Invitrogen).

cDNA and genomic library screening

Libraries construction was described previously (van Loon et al., 1993). cDNA and genomic libraries were screened according to Maniatis (Sambrook et al., 1989). We screened 10^6 plaques for the cDNA library (8.5×10^6 pfu) and 2×10^5 plaques for the genomic library.

3' race on plasmid library

From this cDNA library, plasmids were prepared by mass-excision according to the Stratagene protocol. To obtain the 3' part of the pv-*Slak2* gene, 1 ng of these plasmids was used in a PCR with a vector-specific primer pBS-E (TAACGCCAGGGTTTTCCAGT) directed at the 3' side of the insert and a primer Forw1 (AAGAACTCACACATTACCCTGT) specific for the 196 bp *snail*-like fragment. PCR conditions were: 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 3.0 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100 and 0.01% (w/v) gelatin, 0.2 mM dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech), 0.24 µM of each primer and 0.005 units/µl SuperTaq (HT Biotechnology), with cycle parameters 3 min. 94 °C; 20 cycles touchdown: 45 sec. 94 °C, 30 sec. at 72 °C with a 1 °C drop of temperature every other cycle, 1 min. 30 sec. 72 °C; followed by 20 cycles 30 sec. 94 °C, 30 sec. at 62 °C , 1 min. 30 sec. 72 °C and a final extension of 10 min. at 72 °C. Nested PCR was done on the fragments of the first PCR by, following gel-electrophoresis, taking up part of the band with a sterile wooden toothpick, eluting it in 5 µl water. 1 µl of which was used as a template with the vector specific primer T7

(GTAATACGACTCACTATAGGGC) and primer Forw2 (CTCGACCTTGGTTATTACAAGG) under similar conditions with annealing temperature starting at 64 °C and ending at 54 °C and extension was 3 min. at 68 °C. All resulting PCR-fragments were isolated from gel using the prep-a-gene kit (BioRad) and cloned into the pGEMT-Easy vector (Promega).

Subcloning of genomic clone by PCR

Genomic clone was sub-cloned by long range PCR according to the manufacturer protocol (Pharmacia) with the following program: 1 min. 94°C, 35 cycles (45 sec. 94°C, 45 sec. 60°C, 10 min. 68°C). We use Nrl (TAAAAGCAGAAGTCCAACCCAGATAACGAT) as a vector specific primer and Nslong (AGCTTTACCGCATAATTTACACTTACAGG) as a *Patella Snail*-box specific primer. The Amplified fragment was cloned in TOPO-TA vector (Invitrogen).

Fertilization and embryo rearing:

Adult animals were collected at the Roscoff marine station in September 1998, 1999 and 2000 and kept in natural sea water until the end of the breeding season (march). Embryos were obtained as described previously in (van den Biggelaar, 1977).

Embryos fixation and storage:

Early stage embryos (until 11 hours post fertilization, hpf) were dejellied by a brief treatment in millipore filtered seawater (MPFSW) acidified with HCl to pH 3.9 and washed in normal MPFSW. Selected embryos were fixed in eppendorf tubes for at least 1 hr with MEMPFA-T (0.1 M MOPS, pH 7.4, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 4% paraformaldehyde and 0.1% Tween-20) on a rotating wheel. Embryos were progressively dehydrated with 5 minute washes with gradual series of methanol/MEMPFA-T (25/75, 50/50, 75/25, 100/0) followed by a 15 min. wash with 100% MeOH. At this point embryos were stored at -20 °C until further use.

Probe synthesis

Sense and anti-sense probe were synthesised from PCR product using the Maxiscript T7 and SP6 RNA polymerase kit (Ambion) and the Dig RNA labelling kit (Roche).

Whole mount *In situ* hybridisation

The protocol used was modified after Houtzager (1998). All steps were performed at room temperature unless indicated otherwise. Embryos were progressively rehydrated in TBS-T (136 mM NaCl; 25 mM Tris, pH 7.4; 2.7 mM KCl and 0.1% Tween-20) by 5 min. successive washes in Methanol/TBST

(75/25, 50/50, 25/75, 0/100). Then they were treated with proteinase K (50 ng/ml) (Roche Molecular Biochemicals) in TBS-T for 20 min. at 37 °C. Embryos were then successively incubated in 0.1 M triethanolamine (TEA, Merck) pH 7.0 - 8.0, TEA with 2.5 µl acetic anhydride (Baker Chemicals)/ml and TEA with 5.0 µl acetic anhydride/ml, followed by two washes for 5 min. in TBS-T. Embryos were re-fixed for 20 min. in MEMPFA-T, washed 5x 5 min. in TBS-T, washed 10 min. in 500 µl 50% TBS-T/50% hybridization buffer (750 mM NaCl, 75 mM NaCitrate pH 7.0), 50% formamide, 100 µg/ml Torula RNA (Fluka), 1.5% blocking reagent (Roche Molecular Biochemicals), 5 mM EDTA and 0.1% Tween-20). Prehybridization was done in 100 µl hybridization buffer in an eppendorf tube for 6 hrs at 65 °C. 1 µl probe was added and hybridization was done overnight at 65 °C.

The probe was removed by washes at 65 °C in 50% hybridization buffer/50% 2x SSC for 20 min., 25% hybridization buffer/75% 2x SSC for 20 min., 2x SSC for 30 min. and two washes in 0.2x SSC with 0.3% CHAPS (Sigma) for 30 min. Embryos were washed twice in MaNaT (100 mM Maleic acid/150 mM NaCl pH 7.5 and 0.1% Tween-20) for 10 min. at room temperature and then blocked for 1 hr with Blocking Buffer (MaNaT containing 1% blocking reagent (Roche Molecular Biochemicals)). Antibody incubation was performed for 1 hr in a fresh solution of Blocking Buffer containing a 1:5000 dilution of the affinity-purified anti-digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase (Roche Molecular Biochemicals). This was followed by extensive washing in MaNaT: 2 x 5 min. and 6 x 15 min.

Embryos were washed with alkaline phosphatase buffer (100 mM Tris, pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) after which the embryos were stained in a fresh tube with alkaline phosphatase PVA (10% polyvinyl alcohol, 100 Kd) buffer containing 3.5 µl of NBT (Nitro blue tetrazolium; 75 mg/ml (Roche Molecular Biochemicals)) and 3.5 µl of BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate; 50 mg/ml (Roche Molecular Biochemicals)) per ml of buffer. After reaching an adequate signal compared to the background, the reaction was stopped by washing twice with TBS-T. Subsequently, the embryos were re-fixed with MEMPFA-T for 20 min., washed twice with TBS-T, once with 70% EtOH and stored in 70% EtOH at 4 °C.

For photography, embryos were dehydrated with 2x 5 minute washes in DMP (di-methoxy propane; Fluka) that was activated with HCl (5µl 100% HCl per 10 mL DMP), 2x 5 minutes in 100% HistoClear (National Diagnostics) and mounted in Canada Balsam (BDH.). Pictures were taken with an Olympus BX-50 microscope with DIC optics (Nomarski) on 50 ASA Fuji Velvia films.

RESULTS

Cloning of pv-*Slak1* and pv-*Slak2*, two *Snail* homologues in *Patella vulgata*

A PCR amplification with primers Sna1W and Sna4C allowed us to isolate a 196 bp fragment (Figure 43) which corresponds without any ambiguity to a sub-part of the *Snail*-box (zinc finger n° 2, 3 and 4) and displays respectively 88,3 and 96,7% of sequence identity with the genes *Snail* and *Escargot* of *Drosophila melanogaster*. This fragment was used as a probe to screen in parallel a genomic library and a 16 hour cDNA library from *Patella vulgata* trochophore larvae. From the cDNA library, we have isolated a cDNA with a 1.6 Kb fragment that possesses a 393 amino acids open reading frame (ORF) surrounded by two short 5' (58 bp) and 3' (328 bp) untranslated regions (UTR) (Figure 44). This ORF codes for a 45,1 Kd putative protein which possesses a classical 5 zinc fingers *Snail*-motive. This gene was the first *Snail* homologue isolated to our knowledge in a lophotrochozoan. We called it pv-*Slak1* (*Slak* means *Snail* in Dutch). A clone was also isolated from the genomic library and was sub-cloned by a PCR approach using primers Nrl and Nslong. This led us to isolate a 3.6 Kb fragment that possesses a 307 bp 5' UTR and a 368 ORF interrupted by a 2 kb intron (Figure 46). The 3' UTR of this gene has been determined by 3' RACE PCR amplification on a 16 h plasmid library. This gives us a final ORF of 444 amino acids that codes for a putative 50,4 Kd protein and which also possesses a classical 5 zinc fingers *Snail*-box. This second gene is the second member of the *Snail*-family identified in *Patella vulgata* and was called pv-*Slak2*.

Sequence comparison of the two pv-*Slak* genes

The two pv-*Slak* genes share a 39,8% of sequence identity with 86% of sequence identity for the *Snail*-box itself. The sequence conservation outside of this putative DNA binding is not biologically relevant as we tested it by a statistical reshuffling alignment analysis. Indeed, when we compare the sequence score alignment we obtained with only this region of the native proteins, to scores we found with reshuffled protein (same amino acids composition) we could easily conclude that only the *Snail*-box is conserved between these two proteins. The reshuffled proteins produce a better alignment score in the majority of the cases (145 times on 200 tries). Surprisingly, we also identified a 53 amino acids (Figure 47) fragment in the *Snail*-box, which shared 100% of identity between the two proteins. This fragment presents a 98,7% identity when we look at the nucleotide level (2 mismatches on 159 nucleotides) (Figure 48). We are probably facing here a gene conversion that occurred between the two limpet genes. We can underline that the first and the fifth zinc finger of the *Snail*-box are both excluded from this conversion. From this, we can imagine that the sequence identity between the two

genes was not high enough to allow the extension of the conversion on these zinc fingers or that the gene conversion was initially larger but that the selective forces were not significant to keep the sequence identity to the same level as for the three other zinc fingers. This result, together with the fact that the first zinc finger is sometime missing on some of the *Snail* homologues, leads us to the conclusion that this first zinc finger is probably not as useful as the others for the function of the *Snail* proteins.

Sequence comparison of the *Snail*-related proteins among Bilateria

To date, 28 members of the *Snail* family have been isolated and sequenced (Table 2). In order to compare these proteins all together and to avoid comparison bias due to different protein lengths, we used SSPA score identity (Brocchieri and Karlin, 1998) instead of classical percentage identity. Our analysis of the complete protein family was conducted by dividing each protein sequence in two parts, the *Snail* motif on one side and the rest of the protein of the other side (Table 3). Protein pairwise identity score, of the sequence outside of the *Snail* motive are very low (below 40%) except for the vertebrates *Slug* proteins (upper 84%). From this we can conclude that the sequence conservation of the *Slug* proteins is probably favoured for the correct function or specificity of these genes and that such a conservation is not necessary for the *Snail* function. From the analysis of the Snail-box we can conclude that the sequence identity is higher than for the rest of the protein and even much higher in vertebrates (>77%) than in ecdysozoans (>51 %). It is also interesting to see that, despite their name, all these genes show a higher identity score with the *Escargot* and *Worniu* genes of *Drosophila melanogaster* than with the fly's *Snail* gene.

Phylogenetic analysis of the Snail-genes

We used the most conserved part of the *Snail* box (zinc fingers 2, 3, 4, 5) (Figure 49) in order to try to resolve the orthology relationships between the members of the *Snail* family. Parsimony and distance analysis give us more or less the same results, but only the distance (NJ) tree is presented here (Figure 50). All the vertebrate genes with the notable exception of the mouse *Smuc* are clustered together in a group that is nevertheless supported by a weak bootstrap value (48%). The position of the lancelet and sea urchin genes, basal to this vertebrate group, although it matches the ideas we have about the placement of these two species, is very poorly supported and probably only results from a long branch artefact. Inside the vertebrate gene cluster, we can identify two main groups. The *Slug* group on one side and the *Snail* group and the other side. While the previous is supported by a high bootstrap value (87%), with a species emergence order that seems to be reasonable, the latter is weakly supported mainly due to the misplacement of the [Xenopus, Chicken] group outside of the [mammals (mouse and

human) and teleost fishes (Zebrafish and Fugu)]. In this vertebrate group, we could identify at least three independent duplications. A first one, the *Snail/Slug* that occurred probably in the vertebrate ancestor, although the *Slug* copy of this gene duplication was not found until now in teleost fishes. Then two later independent duplications occurring in human and fishes. Things are more fuzzy when we consider the protostomian genes. This situation mainly results from the long branch attraction effect that groups together the most derived genes of the family. From this, it is difficult to determine the orthology relationships among these genes, even for the *Patella vulgata* paralogues genes where the signal is blurred by a genetic conversion that affects the region we used for our phylogenetic analysis. We are nevertheless prone to favour the hypothesis of a specific *pv-Slak1/pv-Slak2* duplication that occurred independently of the numerous fly duplications.

***pv-Slak1* expression pattern**

Expression pattern where determined from oocyte stage to 24 hours old trochophore larvae. No maternal expression has been detected so far for this gene and the first sign of expression is seen on trochophore larvae after the 16th hour of development. The staining is restricted to four distinct areas at this stage. Cross section observations show that these areas correspond to four large cells (Figures 51, 52, and 53). Two of these cells are located ventrally in the trochal area and the two other are situated dorsally in the post-trochal area. Although it is difficult to determine the embryological origin of these cells, we have reason to think that they are mesodermal cells. This idea is mainly based on previous observations made by Smith who located the mesodermal bands in the area where we see labelling by *pv-Slak1* (Smith, 1935) (Figure 54). At this developmental stage, the expression of *pv-Slak1* could be restricted to cells of the mesodermal band. Due to their respective positions, we assign these cells to an area of the mesodermal band extremity where the process of germ band extension take place. This former expression persists at least until the 24th of development. At this stage, a second domain of expression appears on the right side of the trochophore larva foot (Figure 55). This expression is assumed to be ectodermal (data not shown) and does not correspond to any cells or characteristic structures previously identified in this area. The significance of this staining still remains cryptic to us.

***pv-Slak2* expression pattern**

Expression of this second gene was not detected before the 8th hour after the first cleavage. The staining is first restricted to the neural plate (Figure 57), in a few cells located at the base of the apical tuft. These ectodermal cells are believed to be of neural origin. This apical expression is maintained until at least the 24 hour old trochophore larvae stage. At the 11th hour of development, two new area become stained with the *pv-Slak2* probe. They correspond to two dots which are symmetrically placed

on each side of the foot (Figures 58, 59, and 60). These cells are of ectodermal origin and correspond to the mantle tips involuting cells (Figure 60).

DISCUSSION

Ancestral function of the *Snail* gene

Although the *Snail* gene is conserved in lophotrochozoans, the patterns of expression of the two *Patella Snail* homologues we have characterised during this work appeared to be dynamic and different from that expected if these genes were involved in mesoderm formation. Indeed, their timing of expression is much later than that of mesentoblast (4d) formation and there are almost no direct links between their expression pattern and the initial mesoderm formation in this mollusc.

The expression of *pv-Slak1* in the progressing zone of the mesodermal bands is the only one to be of mesodermal nature, but is more probably linked to special activity of these cells than to their third germ layer origin. Moreover, the expression of *pv-Slak2* in presumptive neural cells and in the involuting cells of the mantle tips is obviously not mesodermal but ectodermal.

Recent results on mouse (Cano et al., 2000) and human (Batlle et al., 2000) lead us to a completely new interpretation of our observations and suggest a new hypothesis on the ancestral function of these genes.

Indeed, these two independent results have shown that in these two species the *Snail* gene is able to bind E-boxes situated in the E-cadherin promoter and thus to repress the expression of these molecules that play a central role in the control of cell adhesivity and migration. Certain members of the *Snail* family genes are therefore believed to play an essential function in the regulation in epithelio-mesenchymal transitions. Expression in *Patella* (mesodermal band extremity, involuting cells of the mantle tip) is compatible with the control of EMT during in the early development of this species.

Thus, instead of being a key gene ancestrally involved in mesoderm formation, we suggest that the *Snail* ancestor was to be involved in the regulation of cadherin and the control of epithelio-mesenchymal transitions.

We this idea in mind, many of the expression patterns of this gene family in the fly as in vertebrates could be understood: cell movement during gastrulation and mesoderm formation, neuroblasts delamination, neural crest cell migration (Hay, 1995).

The specific expression in neural cells (some members of the family are assumed to be pan-neural genes) could also be related to the control of cadherin expression in these specific cells and could also

play a major role in the generation, diversification and organisation of the central nervous system (Yagi and Takeichi, 2000).

The function of these genes in apoptosis (nematode) and endoreplication (mouse and fly) is nevertheless difficult to relate with the control of cadherin expression and these two roles do not seem to be conserved in *Patella*. They are probably derived from the ancestral function.

Evolution of the *Snail* family

Except for the vertebrates, the orthology relationships of the *Snail* genes is very difficult to determine. This is mainly due to a low conservation of these genes sequences and to the existence of numerous independent duplications in this family. In order to better understand the plasticity of this gene family, we propose a scenario based on the duplication-degeneration-complementation (DDC) model (Force et al., 1999). According to this model, duplication of the *Snail* gene yields the possibility for each copy to evolve independently and to become more specialised (subfunctionalization) or even sometimes to acquire and fix new functions. We propose that the low constraints level on the *Snail* genes that is reflected by the absence of sequence conservation was the process that, after duplication event, drive the diversification from ancestral function and permit specification and acquisition of new functions. On this model, sequence conservation of the *Slug* group in this family was due to the specification or acquisition of a new function that is essential for vertebrate development (neural crest formation).

REFERENCES

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor Miklos, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-95.
- Aguinaldo, A. M., Turbeville, J. M., Linford, L. S., Rivera, M. C., Garey, J. R., Raff, R. A., and Lake, J. A. (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387, 489-93.
- Alberga, A., Boulay, J. L., Kempe, E., Dennefeld, C., and Haenlin, M. (1991). The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development* 111, 983-92.
- Ashraf, S. I., Hu, X., Roote, J., and Ip, Y. T. (1999). The mesoderm determinant snail collaborates with related zinc-finger proteins to control *Drosophila* neurogenesis. *Embo J* 18, 6426-38.
- Ausubel, I. and Frederick, M. (1994). *Current protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, USA
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-9.
- Boulay, J. L., Dennefeld, C., and Alberga, A. (1987). The *Drosophila* developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers. *Nature* 330, 395-8.
- Brocchieri, L., and Karlin, S. (1998). A Symmetric-iterated Multiple Alignment of Protein Sequences. *J. Mol. Biol.* 276, 249-264.
- Buxton, P. G., Kostakopoulou, K., Brickell, P., Thorogood, P., and Ferretti, P. (1997). Expression of the transcription factor slug correlates with growth of the limb bud and is regulated by FGF-4 and retinoic acid. *Int J Dev Biol* 41, 559-68.
- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.

- Carl, T. F., Dufton, C., Hanken, J., and Klymkowsky, M. W. (1999). Inhibition of neural crest migration in *Xenopus* using antisense Slug RNA. *Developmental Biology* 213, 101-115.
- Casal, J., and Leptin, M. (1996). Identification of novel genes in *Drosophila* reveals the complex regulation of early gene activity in the mesoderm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10327-32.
- Cohen, M. E., Yin, M., Paznekas, W. A., Schertzer, M., Wood, S., and Jabs, E. W. (1998). Human SLUG gene organization, expression, and chromosome map location on 8q. *Genomics* 51, 468-71.
- Corbo, J. C., Erives, A., Di Gregorio, A., Chang, A., and Levine, M. (1997). Dorsoventral patterning of the vertebrate neural tube is conserved in a protochordate. *Development* 124, 2335-44.
- Emery, J. F., and Bier, E. (1995). Specificity of CNS and PNS regulatory subelements comprising pan-neural enhancers of the deadpan and scratch genes is achieved by repression. *Development* 121, 3549-3560.
- Erives, A., Corbo, J. C., and Levine, M. (1998). Lineage-specific regulation of the *Ciona* snail gene in the embryonic mesoderm and neuroectoderm. *Dev Biol* 194, 213-25.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L., and Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151, 1531-45.
- Fujiwara, S., Corbo, J. C., and Levine, M. (1998). The snail repressor establishes a muscle/notochord boundary in the *Ciona* embryo. *Development* 125, 2511-20.
- Fuse, N., Hirose, S., and Hayashi, S. (1996). Determination of wing cell fate by the escargot and snail genes in *Drosophila*. *Development* 122, 1059-67.
- Fuse, N., Hirose, S., and Hayashi, S. (1994). Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by escargot. *Genes Dev* 8, 2270-81.
- Grau, Y., Carteret, C., and Simpson, P. (1984). Mutations and chromosomal rearrangement affecting the expression of Snail, a gene involved in embryonic patterning in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 108, 347-360.
- Halanych, K. M., Bacheller, J. D., Aguinaldo, A. M. A., Liva, S. M., Hillis, D. M., and Lake, J. A. (1995). 18S rDNA evidence that the lophophorates are protostome animals. *Science* 267, 1641-1643.
- Hammerschmidt, M., and Nusslein-Volhard, C. (1993). The expression of a zebrafish gene homologous to *Drosophila* snail suggests a conserved function in invertebrate and vertebrate gastrulation. *Development* 119, 1107-18.
- Hay, E. D. (1995). An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Acta Anat* 154, 8-20.
- Hayashi, S., Hirose, S., Metcalfe, T., and Shirras, A. D. (1993). Control of imaginal cell development by the escargot gene of *Drosophila*. *Development* 118, 105-15.
- Hemavathy, K., Meng, X., and Ip, Y. T. (1997). Differential regulation of gastrulation and neuroectodermal gene expression by Snail in the *Drosophila* embryo. *Development* 124, 3683-91.

- Houtzager, E. (Ed.) (1998). *The role of connexins and the function of the dorsal endoderm in embryogenesis of Xenopus laevis*, Thesis, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands
- Ip, Y. T., Levine, M., and Bier, E. (1994). Neurogenic expression of snail is controlled by separable CNS and PNS promoter elements. *Development* 120, 199-207.
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Bier, E., and Levine, M. (1992). The dorsal gradient morphogen regulates stripes of rhomboid expression in the presumptive neuroectoderm of the Drosophila embryo. *Genes Dev* 6, 1728-39.
- Isaac, A., Sargent, M. G., and Cooke, J. (1997). Control of vertebrate left-right asymmetry by a snail-related zinc finger gene [see comments]. *Science* 275, 1301-4.
- Jiang, R., Lan, Y., Norton, C. R., Sundberg, J. P., and Gridley, T. (1998). The Slug gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice. *Dev Biol* 198, 277-85.
- Kasai, J., Nambu, J. R., Lieberman, P. M., and Crews, S. T. (1992). Dorsal-ventral patterning in Drosophila: DNA binding of snail protein to the single-minded gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3414-3418.
- Kataoka, H., Murayama, T., Yokode, M., Mori, S., Sano, H., Ozaki, H., Yokota, Y., Nishikawa, S. I., and Kita, T. (2000). A novel Snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Research* 28, 626-633.
- Klug, A., and Schwabe, J. W. R. (1995). Zinc fingers. *FASEB J.* 9, 597-604.
- Kosman, D., Ip, Y. T., Levine, M., and Arora, K. (1991). Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the Drosophila embryo. *Science* 254, 118-22.
- LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (1998). Neural crest induction in Xenopus: evidence for a two-signal model. *Development*, 2403-2414.
- LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (2000). Snail-related transcriptional repressors are required in Xenopus for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev Biol* 221, 195-205.
- Lai, Z., Fortini, M. E., and Rubin, G. M. (1991). The embryonic expression patterns of zfh-1 and zfh-2, two Drosophila genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins. *Mechanisms of Development* 34, 123-134.
- Langeland, J. A., Tomsa, J. M., Jackman, W. R., Jr., and Kimmel, C. B. (1998). An amphioxus snail gene: expression in paraxial mesoderm and neural plate suggests a conserved role in patterning the chordate embryo. *Dev Genes Evol* 208, 569-77.
- Leptin, M. (1991). twist and snail as positive and negative regulators during Drosophila mesoderm development. *Genes Dev* 5, 1568-76.
- Leptin, M., and Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in Drosophila. *Development* 110, 73-84.

- Linker, C., Bronner-Fraser, M., and Mayor, R. (2000). Relationship between Gene Expression Domains of Xsnail, Xslug, and Xtwist and Cell Movement in the Prospective Neural Crest of *Xenopus*. *Developmental Biology* 224, 215-225.
- Mauhin, V., Lutz, Y., Dennefeld, C., and Alberga, A. (1993). Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res* 21, 3951-7.
- Mayor, R., Essex, L. J., Bennett, M. F., and Sargent, M. G. (1993). Distinct elements of the *xsna* promoter are required for mesodermal and ectodermal expression. *Development* 119, 661-71.
- Mayor, R., Morgan, R., and Sargent, M. G. (1995). Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121, 767-777.
- Metzstein, M. M., and Horvitz, H. R. (1999). The *C. elegans* cell death specification gene *ces-1* encodes a snail family zinc finger protein. *Mol Cell* 4, 309-19.
- Nakayama, H., Scott, I. C., and Cross, J. C. (1998). The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol* 199, 150-63.
- Nibu, Y., Zhang, H., Bajor, E., Barolo, S., Small, S., and Levine, M. (1998). dCtBP mediates transcriptional repression by knirps, Kruppel and snail in the *drosophila* embryo [In Process Citation]. *Embo J* 17, 7009-20.
- Nieto, M. A., Bennett, M. F., Sargent, M. G., and Wilkinson, D. G. (1992). Cloning and developmental expression of *Sna*, a murine homologue of the *Drosophila* snail gene. *Development* 116, 227-37.
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G., and Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by *Slug*, a zinc finger gene. *Science* 264, 835-9.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., and Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux Archives of Developmental Biology* 193, 267-282.
- Paznekas, W. A., Okajima, K., Schertzer, M., Wood, S., and Jabs, E. W. (1999). Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (*SNAI1*) and a related processed pseudogene (*SNAI1P*). *Genomics* 62, 42-9.
- Reuter, R., and Leptin, M. (1994). Interacting functions of snail, twist and huckebein during the early development of germ layers in *Drosophila*. *Development* 120, 1137-50.
- Roark, M., Sturtevant, M. A., Emery, J., Vaessin, H., Grell, E., and Bier, E. (1995). *scratch*, a pan-neural gene encoding a zinc finger protein related to snail, promotes neuronal development. *Genes Dev* 9, 2384-98.
- Romano, L. A., and Runyan, R. B. (1999). *Slug* Is a Mediator of Epithelial-Mesenchymal Cell Transformation in the Developing Chicken Heart. *Developmental biology* 212, 243-254.
- Romano, L. A., and Runyan, R. B. (2000). *Slug* is an Essential Target of TGFbeta2 Signaling in the Developing Chicken Heart. *Dev Biol* 223, 91-102.

- Ros, M. A., Sefton, M., and Nieto, M. A. (1997). Slug, a zinc finger gene previously implicated in the early patterning of the mesoderm and the neural crest, is also involved in chick limb development. *Development* *124*, 1821-9.
- Samakovlis, C., Manning, G., Steneberg, P., Hacohen, N., Cantera, R., and Krasnow, M. A. (1996). Genetic control of epithelial tube fusion during *Drosophila* tracheal development. *Development* *122*, 3531-6.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition Edition (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sargent, M. G., and Bennett, M. F. (1990). Identification in *Xenopus* of a structural homologue of the *Drosophila* gene snail. *Development* *109*, 967-73.
- Savagner, P., Yamada, K. M., and Thiery, J. P. (1997). The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* *137*, 1403-19.
- Sefton, M., Sanchez, S., and Nieto, M. A. (1998). Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development* *125*, 3111-21.
- Simpson, P. (1983). Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *drosophila* embryos. *Genetics* *105*, 615-632.
- Smith, F. G. W. (1935). The Development of *Patella Vulgata*. *Phil. Trans. Roy. Soc. London B* *225*, 95-125.
- Smith, D. E., Franco del Amo, F., and Gridley, T. (1992). Isolation of *Sna*, a mouse gene homologous to the *Drosophila* genes snail and escargot: its expression pattern suggests multiple roles during postimplantation development [published erratum appears in *Development* 1993 Mar;117(3):preceding table of contents]. *Development* *116*, 1033-9.
- Sommer, R. J., Retzlaff, M., Goerlich, K., Sander, K., and Tautz, D. (1992). Evolutionary conservation pattern of zinc-finger domains of *Drosophila* segmentation genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 10782-6.
- Sommer, R. J., and Tautz, D. (1994). Expression patterns of twist and snail in *Tribolium* (Coleoptera) suggest a homologous formation of mesoderm in long and short germ band insects. *Dev Genet* *15*, 32-7.
- Tanaka-Matakatsu, M., Uemura, T., Oda, H., Takeichi, M., and Hayashi, S. (1996). Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in *Drosophila* trachea regulated by the transcription factor Escargot. *Development* *122*, 3697-705.
- Thisse, C., Thisse, B., and Postlethwait, J. H. (1995). Expression of snail2, a second member of the zebrafish snail family, in cephalic mesendoderm and presumptive neural crest of wild-type and spadetail mutant embryos. *Dev Biol* *172*, 86-99.

- Thisse, C., Thisse, B., Schilling, T. F., and Postlethwait, J. H. (1993). Structure of the zebrafish snail gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos. *Development* *119*, 1203-15.
- van den Biggelaar, J. A. M. (1977). Development of dorsoventral polarity and mesentoblast determination in *Patella vulgata*. *J Morphol* *154*, 157-86.
- van Loon, A. E., Goedemans, H. J., Daemen, A. J. J. M., van de Kamp, A. J., and van den Biggelaar, J. A. M. (1993). Actin genes expressed during early development of *Patella vulgata*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* *202*, 77-84.
- Veltmaat, J. M., Orelio, C. C., Ward-van Oostwaard, D., van Rooijen, M. A., Mummery, C. L., and Defize, L. H. K. (2000). Snail is an immediate early target gene of parathyroid hormone related peptide signaling in parietal endoderm formation. *International Journal of Developmental Biology* *44*, 297-307.
- Wada, S., and Saiga, H. (1999). Cloning and embryonic expression of Hrsna, a snail family gene of the ascidian *Halocynthia roretzi*: implication in the origins of mechanisms for mesoderm specification and body axis formation in chordates. *Dev Growth Differ* *41*, 9-18.
- Whiteley, M., Noguchi, P. D., Sensabaugh, S. M., Odenwald, W. F., and Kassis, J. A. (1992). The *Drosophila* gene escargot encodes a zinc finger motif found in snail-related genes. *Mech Dev* *36*, 117-27.
- Yagi, T., and Takeichi, M. (2000). Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity [In Process Citation]. *Genes Dev* *14*, 1169-80.