

L'embryogenèse précoce des mammifères □ premières différenciations cellulaires et cellules souches.

Claire Chazaud

GReD (Génétique, Reproduction et Développement); CNRS, UMR 6247; INSERM, U931; Clermont Université; Faculté de médecine, 28 place H. Dunant BP38, 63001 Clermont-Fd, FRANCE

Tel □ +33 4 73 17 83 80

Fax □ +33 4 73 27 61 32

e-mail □ [claire.chazaud@u-clermont1.fr](mailto:claire.chazaud@u-clermont1.fr)

## Aperçu

Chez les mammifères, les lignages cellulaires embryonnaires et extraembryonnaires qui forment respectivement tout l'embryon et les annexes telles que le placenta se séparent dès les premières différenciations cellulaires. En effet, l'embryon de mammifère n'ayant pas beaucoup de réserves énergétiques se prépare très tôt à l'implantation pour absorber les nutriments maternels d'abord par l'intermédiaire du sac vitellin puis du placenta. Ces premières étapes impliquent les processus génétiques et morphogénétiques classiques de la différenciation cellulaire ainsi que des mécanismes propres au début du développement embryonnaire comme certaines reprogrammations épigénétiques et le maintien de la pluripotence cellulaire. L'analyse des embryons a conduit à l'isolement des cellules souches embryonnaires, couronné par le prix Nobel de médecine en 2007 (Evans, Capecchi, Smithies) et qui offre de grands espoirs pour la thérapie cellulaire.

## Abstract

In mammals, embryonic and extraembryonic cell lineages are separating during the first steps of cell differentiation in the preimplantation embryo. Indeed, mammal embryos contain very low energy stocks and thus get ready for implantation very early to be able to absorb nutrients from the mother, first through the yolk sac and then through the placenta. These first steps involve classical genetic and morphogenetic processes as well as specific mechanisms of early embryo development such as epigenetic reprogramming and maintenance of pluripotent cells. Embryo analysis led to the isolation of embryonic stem (ES) cells, granted by the 2007 Nobel prize of Medicine (Evans, Capecchi, Smithies) and offer strong hopes for cell therapy.

## Introduction

Chez les modèles de vertébrés tels que le poisson-zèbre ou le xénope, des asymétries moléculaires sont déjà observées dans l'oeuf fécondé. Elles vont être héritées différemment par les cellules filles au cours des divisions et déterminer ainsi leur future identité. Au contraire, chez les mammifères et notamment la souris, aucune protéine ou composant cellulaire n'a été localisé de manière asymétrique dans le zygote. D'autres mécanismes interviennent donc pour initier les premières différenciations cellulaires. Grâce à l'évolution de techniques plus sensibles et plus résolutive, l'embryon de souris avant l'implantation ne mesurant qu'environ cent microns, de nombreuses interactions géniques ont été identifiées ces dernières années, permettant de mieux comprendre les mécanismes de différenciation cellulaire au niveau moléculaire.

### 1- De la fécondation à l'implantation chez la souris: morphologie de l'embryon (Figure 1A)

Après la fécondation, l'oeuf, tout en gardant le même volume, se divise en deux, quatre puis huit cellules –ou blastomères- identiques. Au stade 8-cellules, les blastomères qui étaient jusqu'alors arrondis et de forme symétrique, se polarisent en renforçant les contacts avec leurs voisins et en aplatisant leur surface externe [1, 2]. C'est la phase de compaction qui donne à l'embryon une forme de petite mûre appelée morula. Jusqu'à ce stade, les blastomères sont homogènes et ont tous la capacité de donner à la fois des tissus embryonnaires et extraembryonnaires, cependant la compaction va entraîner la production de deux populations de cellules différentes au cours des cycles de division suivants. En effet, une fois polarisées, les cellules vont se diviser soit symétriquement, le long de l'axe interne/externe et donner deux cellules polarisées –soit asymétriquement le long d'un axe perpendiculaire à l'axe interne/externe pour produire une cellule externe polarisée et une cellule interne non-polarisée (Fig. 1B). Ainsi, au stade 16-cellules, l'embryon est formé de deux types cellulaires différent par leur position interne ou externe. Une nouvelle vague de divisions symétriques et asymétriques conduit au stade de 32-cellules. Des expériences de traçage cellulaire ont montré qu'à partir de ce stade, les cellules externes commencent à acquérir leur identité définitive en trophoblastes [1]. Après le stade 32-cellules une cavité se forme à l'intérieur de l'embryon. Ainsi au stade de blastocyste à 3,5 jours (E3,5) l'embryon est formé d'une couche externe de trophoblastes renfermant la cavité blastocélique et la masse cellulaire interne (MCI). Au cours des heures suivantes, la MCI va produire deux tissus distincts –une masse de cellules formant l'épiblaste (Epi) recouverte d'un épithélium d'endoderme primitif (EPr). Donc, au moment de l'implantation à E4,5 chez la souris, l'embryon est formé de trois tissus –les trophoblastes

(Tr) qui participeront plus tard à la formation du placenta, l'EPr qui formera une partie du sac vitellin et l'Epi qui à la fois participera à la formation des annexes embryonnaires et produira toutes les cellules de l'embryon, y compris les cellules germinales qui portent la perpétuation de l'espèce.

## 2- Cellules souches issues du blastocyste

Aux trois lignages cellulaires présents à l'implantation, l'Epi, le Tr et l'EPr correspondent trois modèles *in vitro* de cellules souches [3]. Les trois types de cellules souches sont isolées à partir de blastocystes (E3,5). Les plus largement étudiées sont les cellules souches embryonnaires (ES) qui ont des caractéristiques épiblastiques [4, 5]. Les cellules souches trophoblastiques (TS) [6] et Xen [7] ont été isolées plus récemment et représentent les lignées trophoblastiques et de l'EPr respectivement. Pour chacune de ces trois lignées, le caractère «souche» a été validé par la production d'embryons chimères, c'est à dire en greffant ces cellules à des embryons de stade 8-cellules ou blastocyste. Les embryons ou les souris adultes analysés par la suite ont montré une colonisation restreinte à chaque lignage cellulaire et ont ainsi permis de démontrer l'identité et le potentiel de chacune de ces lignées de cellules souches *in vivo*.

Les cellules ES sont largement utilisées en transgénèse puisqu'elles peuvent être manipulées génétiquement *in vitro* pour être réintroduites dans un animal. De nombreux modèles animaux de maladies génétiques humaines ont été produits ainsi [8]. Le grand intérêt que ces cellules suscitent depuis quelques années a été provoqué par leur isolement chez l'homme [9] rendant envisageable de nombreuses thérapies cellulaires puisque ces cellules ont la capacité de se différencier en tous les types cellulaires foetaux et adultes [10] [11]. Les cellules souches sont des outils indispensables pour comprendre les propriétés et les différenciations des lignages cellulaires mais possèdent cependant des caractéristiques propres à leur environnement *in vitro*, divergeant des lignages cellulaires *in vivo* de l'embryon dont elles sont issues.

## 3- Détermination et différenciation des premières lignées cellulaires.

### a) Trophoblastes/MCI

La différenciation des cellules trophoblastiques par rapport à la MCI dépend de leur structure polarisée ainsi que de leur position externe dans l'embryon, qui résultent des divisions symétriques et asymétriques [1]. La répartition entre ces cellules est menée par des molécules impliquées dans l'adhésion et/ou la polarité cellulaire telles que la E-cadherine, l'Ezrine, des protéines Par ou certaines isoformes de la PKC. L'héritage de ces molécules au cours des

divisions symétriques et asymétriques ainsi que leur localisation baso-latérale ou apicale maintiennent la polarité des cellules externes [2, 3]. Par exemple, lorsque l'aPKC ou ParD3, exprimées au pôle apical des cellules polarisées, sont inactivées dans certaines cellules, ces cellules ont tendance à être à l'intérieur de l'embryon [12]. Ces protéines impliquées dans la polarité cellulaire influencent donc la position de la cellule dans l'embryon, mais cependant ne leur donnent pas une identité définitive.

L'identité trophoblastique est fixée entre les stades 32- et 64-cellules (début de formation du blastocyste) et peut être visualisée grâce au facteur de transcription *Cdx2*, uniquement exprimé dans les cellules externes [13-16]. A l'inverse, les gènes de pluripotence tels que *Oct-4*, *Sox2* et *Nanog* ont leur expression restreinte aux cellules internes du blastocyste. Il est intéressant de noter que ces protéines, spécifiques soit des trophoblastes ou soit de la MCI, sont co-exprimées dans tous les blastomères jusqu'au stade 16-cellules, montrant que les mécanismes de régulation sont complexes.

L'analyse des embryons mutants pour *Cdx2* a ainsi montré que ce facteur de transcription est requis pour le maintien de l'identité des trophoblastes en réprimant des gènes spécifiques de la MCI tels que *Oct-4* ou *Nanog* [13, 14] (Figure 2). Les mécanismes de cette répression ont été clarifiés *in vitro*, en montrant qu'un complexe répresseur Oct-4/*Cdx2* se lie au promoteur d'*Oct-4* dans les cellules trophoblastiques [16].

Par contre *Cdx2* n'a aucune influence sur la position ou la polarité des cellules pour former le blastocyste. En effet, les embryons mutants pour *Cdx2* peuvent former des cellules polarisées externes qui ont les caractéristiques morphologiques des trophoblastes jusqu'au début de la formation du blastocyste. Des résultats récents ont mis en évidence que la restriction de l'expression de *Cdx2* dans les cellules externes de la morula tardive (à partir d'une vingtaine de cellules) serait une conséquence de la polarisation des cellules [14, 15]. Ainsi, *Cdx2* ne serait induit que dans les cellules externes.

Aussi, il a été montré que le facteur de transcription TEAD4 est requis pour l'induction de *Cdx2* dès le stade de morula. L'invalidation de *Tead4* produit un phénotype plus sévère que celui de *Cdx2* puisque les embryons *Tead4*<sup>-/-</sup> ne forment pas de blastocyste [17, 18].

Néanmoins, l'expression de *Tead4* est ubiquitaire pendant la préimplantation et donc doit être combinée à d'autres signaux issus de la polarisation des cellules pour induire *Cdx2*.

Ainsi, les cellules de la MCI seraient déterminées d'abord par l'absence d'expression de facteurs trophoblastiques, notamment de *Cdx2*. L'identité de la MCI est caractérisée par l'expression de facteurs de transcription exprimés dans toutes les cellules internes du

blastocystes, tels que Oct-4 ou Sox2. Ces protéines sont impliquées dans le maintien de l'identité épiblastique puisque leur élimination provoque une transdétermination des cellules en type trophoblastique [3] (Figure 2). De même, le facteur Sall4, de la famille des *Spalt*, est enrichi dans la MCI [19] et son inactivation induit l'expression de Cdx2 dans la MCI [20]. Chez la drosophile *Spalt* est impliqué dans la polarisation puis différenciation cellulaire [21] et il serait intéressant de voir si le rôle de Sall4 dans la détermination de la MCI est directement lié à la polarisation cellulaire et/ou aux divisions asymétriques.

#### b) Epiblaste/Endoderme Primitif

La différenciation entre l'Epi et l'EPr est morphologiquement visible au jour 4,5 par l'apparition d'un épithélium à l'interface de la cavité blastocélique et des cellules plus internes, formant désormais l'Epi (Fig. 1A). Des expériences récentes ont montré que les cellules précurseurs de l'EPr proviennent non seulement de la surface mais aussi de l'intérieur de la MCI. En effet, il a été montré *in situ* que la MCI d'un blastocyste de 3,5 jours est composée de cellules exprimant soit Nanog, marqueur de l'Epi [22, 23], soit Gata6, marqueur de l'EPr [24, 25], mélangées en «poivre et sel» [26]. Ces résultats ont été appuyés par l'analyse de banques d'ADNc produites à partir de cellules uniques de la MCI montrant qu'il existe deux catégories de cellules exprimant des gènes différents [27]. Différentes expériences de traçage cellulaire ont montré qu'une cellule de la MCI à E3,5 est déjà déterminée en Epi ou en EPr [26]. Ainsi l'ensemble de ces travaux met en évidence que la MCI d'un blastocyste de 3,5 jours n'est pas homogène mais est déjà composée de précurseurs épiblastiques (pré-Epi) et de précurseurs endodermiques (pré-EPr). Dans l'embryon, ces deux lignages cellulaires sont définitivement séparés, alors qu'il est possible de différencier *in vitro* des cellules ES en EPr, notamment lors de la formation de corps embryonnaires.

Les mécanismes d'induction de ces deux lignées cellulaires restent inconnus bien que des expériences sur les embryons et sur les cellules ES commencent à en élucider les processus (Figure 2). La surexpression des gènes *Gata4* ou *Gata6* dans les cellules ES induit leur différenciation en EPr [28, 29], montrant que ces gènes ont un impact fort dans l'induction de l'EPr. Dans ces expériences l'expression des marqueurs de pluripotence est rapidement diminuée, suggérant des mécanismes de répression active.

De plus, dans les embryons mutants pour la protéine Grb2, un adaptateur de la voie de signalisation des récepteurs à tyrosine-kinase (RTK), *Gata6* n'est pas exprimé alors que Nanog est présente dans toutes les cellules de la MCI [26]. Ainsi, toutes les cellules de la MCI ont une identité épiblastique, montrant que la voie des RTK est requise pour l'induction de

l'EPr, soit en activant *Gata6* ou soit en inhibant *Nanog*. A l'inverse, les embryons mutants pour *Nanog* semblent ne donner que des cellules endodermiques [23], toutefois ces mutants ont été analysés longtemps après la formation du blastocyste et des expériences à des stades plus précoces (E3,5) seront nécessaires. L'analyse de l'inactivation de *Nanog* dans les cellules ES révèle que ce gène n'est pas absolument nécessaire au maintien de ces cellules dans leur état pluripotent mais donc serait plutôt requis pour induire l'identité initiale de ces cellules [30]. L'ensemble de ces résultats montre que la voie de signalisation RTK, couplée à *Gata6*, et *Nanog* ont des effets antagonistes et réciproques. Cependant, les mécanismes d'induction et de régulation de l'expression de *Nanog* et *Gata6* ne sont pas aussi simples puisque ces protéines sont coexprimées dans l'ensemble des blastomères entre le stade 8-cellules et celui de la formation du blastocyste (C.C., F. Gerbe et S. Frankenberg, résultats non publiés).

La voie de signalisation RTK responsable de l'activation de l'EPr semblerait être celle du FGF étant donné que les embryons mutants pour FGF4 ou certains de ses récepteurs ne forment pas d'EPr [31, 32]. Cependant, d'autres RTK sont présents au niveau de l'EPr comme le PDGFR [27, 33] et leur implication reste à élucider.

Des études sur la différenciation des cellules EC de carcinôme embryonnaire (proches des ES) et de cellules ES ont mis en évidence un rôle de gènes *Sox* dans la formation de l'EPr et ses dérivés. *Sox7* serait en amont de la cascade d'induction et activerait *Gata6* [34], alors que *Sox17* serait en aval et permettrait la transition de l'EPr en endoderme viscéral et en endoderme pariétal [35]. Néanmoins, aucun phénotype n'a été décrit avant l'implantation dans les embryons mutants.

Le gène *Sall4*, impliqué dans la ségrégation trophoblastes/MCI est aussi requis au niveau de l'EPr mais sa place dans la cascade d'induction des lignages cellulaires n'a pas été déterminée [19, 20].

D'autres facteurs tels que LRH-1, UTF-1, Notchless ou FoxD3 [36-39] sont requis dans l'Epi et les cellules ES mais seraient plutôt impliqués pour le maintien de l'état pluripotent et non son induction, en évitant une différenciation trop hative en tissu neural ou mésendodermique.

#### 4- Formation de l'épithélium de l'EPr

Les cellules pré-Epi et pré-EPr sont mélangées en «poivre et sel» dans la MCI à E3,5 [3, 40]. Un jour plus tard, ces types cellulaires forment deux tissus bien séparés, l'épithélium de l'EPr recouvrant la masse de cellules épiblastiques. Le tri entre ces cellules pourrait s'effectuer de

manière active, avec des cellules migratrices ou de manière passive grâce aux capacités d'adhésion différentes, les deux systèmes pouvant être combinés. Les embryons mutants pour la Maspine (Serpib5), une protéine impliquée dans la migration cellulaire et exprimée dans les dérivés de l'EPr, meurent au moment de l'implantation avec une dégénérescence de la MCI [41]. L'analyse des corps embryonnaires Maspine-/- révèle que les cellules pré-EPr sont présentes puisqu'elles expriment Gata4. Par contre, ces cellules ne sont pas positionnées à la périphérie comme avec les cellules sauvages mais disposées en «poivre et sel» [41], montrant que les cellules exprimant Gata4 n'ont pu atteindre la surface. Des phénotypes identiques ont été observés lorsque *Dab2* [42-44] ou le gène codant pour la chaîne  $\alpha 1$  de la laminine 111 (*LamC1*) [45] sont inactivés. *Dab2* est une protéine adaptatrice se liant, entre autres, aux intégrines qui sont des récepteurs aux laminines. L'ensemble de ces résultats montre que des molécules impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire sont requises pour faire le tri entre les pré-Epi et les pré-EPr et donner deux tissus séparés.

Les cellules déterminées en EPr non seulement ségrègent de l'Epi, mais aussi vont former un épithélium. Cet épithélium a très tôt une activité d'absorption pour alimenter l'épiblaste sous-jacent [46, 47], possiblement dès sa formation. Or, à E3,5, les cellules pré-EPr commencent à se préparer à leur nouvelle fonction avant d'atteindre la surface de la cavité blastocélique. En effet, LRP2, un récepteur membranaire pour un grand nombre de ligands (lipoprotéines, protéases, plasminogène, albumine...), est exprimé dans certaines cellules pré-EPr à E3,5 [33]. Le nombre de cellules pré-EPr exprimant LRP2 augmente au cours des heures suivantes démontrant une maturation progressive des pré-EPr, sachant que toutes les cellules de l'EPr l'expriment à E4,5. La localisation sub-cellulaire de la protéine est aussi liée la maturité de la cellule ainsi qu'à sa position. LRP2 est stockée à l'intérieur de la cellule, probablement dans le Golgi, lorsque la cellule est interne à la MCI puis localisée au pôle apical du futur épithélium lorsque la cellule a atteint la surface de la cavité blastocélique [33]. Cette localisation dépendrait de *Dab2* [43] qui est aussi exprimée au pôle apical des cellules, bordant la cavité blastocélique. Ainsi, la cellule prépare et stocke les protéines nécessaires à l'endocytose de nutriments, ou à la formation de la structure épithéliale telle que le collagène IV, pour être prête et fonctionnelle le plus tôt possible. De manière intéressante, les cellules de l'EPr se polarisent dès qu'elles atteignent la surface et ce individuellement. D'autres travaux seront nécessaires pour déterminer comment les autres cellules vont s'intercaler à la surface et amorcer la formation de jonctions épithéliales avec leurs voisines déjà positionnées et polarisées.

## Conclusion

Ces dernières années, de grandes avancées ont été faites dans la compréhension des mécanismes moléculaires régulant la différenciation des trois premiers lignages cellulaires de l'embryon. Néanmoins de nombreuses questions restent en suspens par exemple sur les mécanismes de restriction de Cdx2 dans les cellules externes ou comment Nanog et Gata6 sont induites de manière exclusive dans la MCI. On ne sait pas non plus si les cellules de l'Epi et de l'EPr ont un précurseur commun séparé de la lignée trophoblastique ou si les trois lignées cellulaires se déterminent en même temps. D'autre part, les régulations épigénétiques n'ont pas été abordées dans cette revue mais de plus en plus de travaux relatent leur implication dans le maintien ou la différenciation des cellules, notamment dans les cellules pluripotentes ES. La particularité des tissus extraembryonnaires (trophoblastes et EPr) dans les mécanismes de régulation épigénétiques (hypométhylation de l'ADN, inactivation du X paternel...) font de l'embryon précoce un outil d'étude excellent.

Il faut aussi noter que de plus en plus d'indices montrent que l'induction des axes de l'embryon (antéro-postérieur, dorso-ventral) se produirait autour du stade de l'implantation et dépendrait d'interactions entre les trois lignages cellulaires [48].

Plus généralement, l'embryon produit deux épithéliums au cours de la préimplantation, en recrutant les cellules épithéliales avec des mécanismes différents. Les trophoblastes sont induits grâce à leur position externe dans l'embryon alors que les cellules de l'EPr sont d'abord induites avant de se positionner à la surface de la MCI. Ainsi, la compréhension des mécanismes fondamentaux de formation d'épithéliums ainsi que ceux de détermination cellulaire apportera des réponses dans de nombreux domaines de la biologie.

## Remerciements

Merci à Bertrand Pain, Vincent Mirouse et Jean-Louis Couderc pour leurs commentaires sur le manuscrit et à Corinne Belville pour son aide sur la Figure 1A.

## Références

1. Johnson MH, McConnell JM. Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:583-597.
2. Dard N, Breuer M, Maro B, *et al.* Morphogenesis of the mammalian blastocyst. *Mol Cell Endocrinol* 2008;282:70-77.
3. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, *et al.* Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* 2006;235:2301-2314.

4. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-156.
5. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7634-7638.
6. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, *et al.* Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 1998;282:2072-2075.
7. Kunath T, Arnaud D, Uy GD, *et al.* Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development* 2005;132:1649-1661.
8. Cohen-Tannoudji M. [Nobel Prize 2007 for Medicine to Mario Capecchi, Martin Evans and Oliver Smithies: the mutant mice to order]. *Med Sci (Paris)* 2007;23:1159-1161.
9. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147.
10. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 2005;19:1129-1155.
11. Peschanski M. [Stem cells, time for scale-up.]. *Med Sci (Paris)* 2008;24:335-338.
12. Plusa B, Frankenberg S, Chalmers A, *et al.* Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Sci* 2005;118:505-515.
13. Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, *et al.* Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 2005;132:2093-2102.
14. Ralston A, Rossant J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2008;313:614-629.
15. Dietrich JE, Hirragi T. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* 2007;134:4219-4231.
16. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, *et al.* Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 2005;123:917-929.
17. Yagi R, Kohn MJ, Karavanova I, *et al.* Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 2007;134:3827-3836.
18. Nishioka N, Yamamoto S, Kiyonari H, *et al.* Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev* 2008;125:270-283.
19. Elling U, Klasen C, Eisenberger T, *et al.* Murine inner cell mass-derived lineages depend on Sall4 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:16319-16324.
20. Zhang J, Tam WL, Tong GQ, *et al.* Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat Cell Biol* 2006;8:1114-1123.
21. Domingos PM, Mlodzik M, Mendes CS, *et al.* Spalt transcription factors are required for R3/R4 specification and establishment of planar cell polarity in the Drosophila eye. *Development* 2004;131:5695-5702.
22. Chambers I, Colby D, Robertson M, *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003;113:643-655.
23. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, *et al.* The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003;113:631-642.
24. Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, *et al.* The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* 1999;126:723-732.

25. Morrisey EE, Tang Z, Sigrist K, *et al.* GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev* 1998;12:3579-3590.
26. Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T, *et al.* Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Dev Cell* 2006;10:615-624.
27. Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, *et al.* An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res* 2006;34:e42.
28. Fujikura J, Yamato E, Yonemura S, *et al.* Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev* 2002;16:784-789.
29. Shimosato D, Shiki M, Niwa H. Extra-embryonic endoderm cells derived from ES cells induced by GATA factors acquire the character of XEN cells. *BMC Dev Biol* 2007;7:80.
30. Chambers I, Silva J, Colby D, *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 2007;450:1230-1234.
31. Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, *et al.* Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* 1995;267:246-249.
32. Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, *et al.* Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:5082-5087.
33. Gerbe F, Cox B, Rossant J, *et al.* Dynamic expression of Lrp2 pathway members reveals progressive epithelial differentiation of primitive endoderm in mouse blastocyst. *Dev Biol* 2008;313:594-602.
34. Futaki S, Hayashi Y, Emoto T, *et al.* Sox7 plays crucial roles in parietal endoderm differentiation in F9 embryonal carcinoma cells through regulating Gata-4 and Gata-6 expression. *Mol Cell Biol* 2004;24:10492-10503.
35. Shimoda M, Kanai-Azuma M, Hara K, *et al.* Sox17 plays a substantial role in late-stage differentiation of the extraembryonic endoderm in vitro. *J Cell Sci* 2007;120:3859-3869.
36. Gu P, Goodwin B, Chung AC, *et al.* Orphan nuclear receptor LRH-1 is required to maintain Oct4 expression at the epiblast stage of embryonic development. *Mol Cell Biol* 2005;25:3492-3505.
37. van den Boom V, Kooistra SM, Boesjes M, *et al.* UTF1 is a chromatin-associated protein involved in ES cell differentiation. *J Cell Biol* 2007;178:913-924.
38. Cormier S, Le Bras S, Souilhol C, *et al.* The murine ortholog of notchless, a direct regulator of the notch pathway in *Drosophila melanogaster*, is essential for survival of inner cell mass cells. *Mol Cell Biol* 2006;26:3541-3549.
39. Hanna LA, Foreman RK, Tarasenko IA, *et al.* Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. *Genes Dev* 2002;16:2650-2661.
40. Chazaud C, Rossant J. Disruption of early proximodistal patterning and AVE formation in Apc mutants. *Development* 2006;133:3379-3387.
41. Gao F, Shi HY, Daughy C, *et al.* Maspin plays an essential role in early embryonic development. *Development* 2004;131:1479-1489.
42. Yang DH, Smith ER, Roland IH, *et al.* Disabled-2 is essential for endodermal cell positioning and structure formation during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 2002;251:27-44.
43. Yang DH, Cai KQ, Roland IH, *et al.* Disabled-2 is an epithelial surface positioning gene. *J Biol Chem* 2007;282:13114-13122.

44. Rula ME, Cai KQ, Moore R, *et al.* Cell autonomous sorting and surface positioning in the formation of primitive endoderm in embryoid bodies. *Genesis* 2007;45:327-338.
45. Smyth N, Vatansever HS, Murray P, *et al.* Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol* 1999;144:151-160.
46. Assemat E, Vinot S, Gofflot F, *et al.* Expression and role of cubilin in the internalization of nutrients during the peri-implantation development of the rodent embryo. *Biol Reprod* 2005;72:1079-1086.
47. Maurer ME, Cooper JA. Endocytosis of megalin by visceral endoderm cells requires the Dab2 adaptor protein. *J Cell Sci* 2005;118:5345-5355.
48. Tam PP, Loebel DA. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet* 2007;8:368-381.

### Légende des figures

Figure 1 A- Les différentes étapes de formation de l'embryon de souris du stade 1-cellule (cell.) au stade E5,5. Entre le stade 1- et 4-cell., les embryons sont représentés en entier alors que du stade 8-cell. à E5,5 il sont schématisés sous forme de sections. B Production de cellules internes ou externe par division asymétrique (vert) ou symétrique (rouge) entre les stades 8- et 16- cellules. CA, Cavité amniotique C Ect, cône ectoplacentaire D VE, endoderme viscéral distal E Ex, ectoderme extraembryonnaire E Pa, endoderme pariétal, Epi, épiblaste E Pr, endoderme primitif E V, endoderme viscéral MR, membrane de Reichert Tr, trophoblastes.

Figure 2 Intéractions génétiques pour induire les trois lignages cellulaires, l'épiblaste (bleu), les trophoblastes (vert) et l'endoderme primitif (rouge). Les informations sont basées sur des résultats obtenus avec des embryons ou des cellules souches. Les inductions sont représentées par des flèches alors que les inhibitions sont représentées par des ronds. Les cercles symbolisent des groupes de gènes qui agissent ensembles sur des gènes cibles.

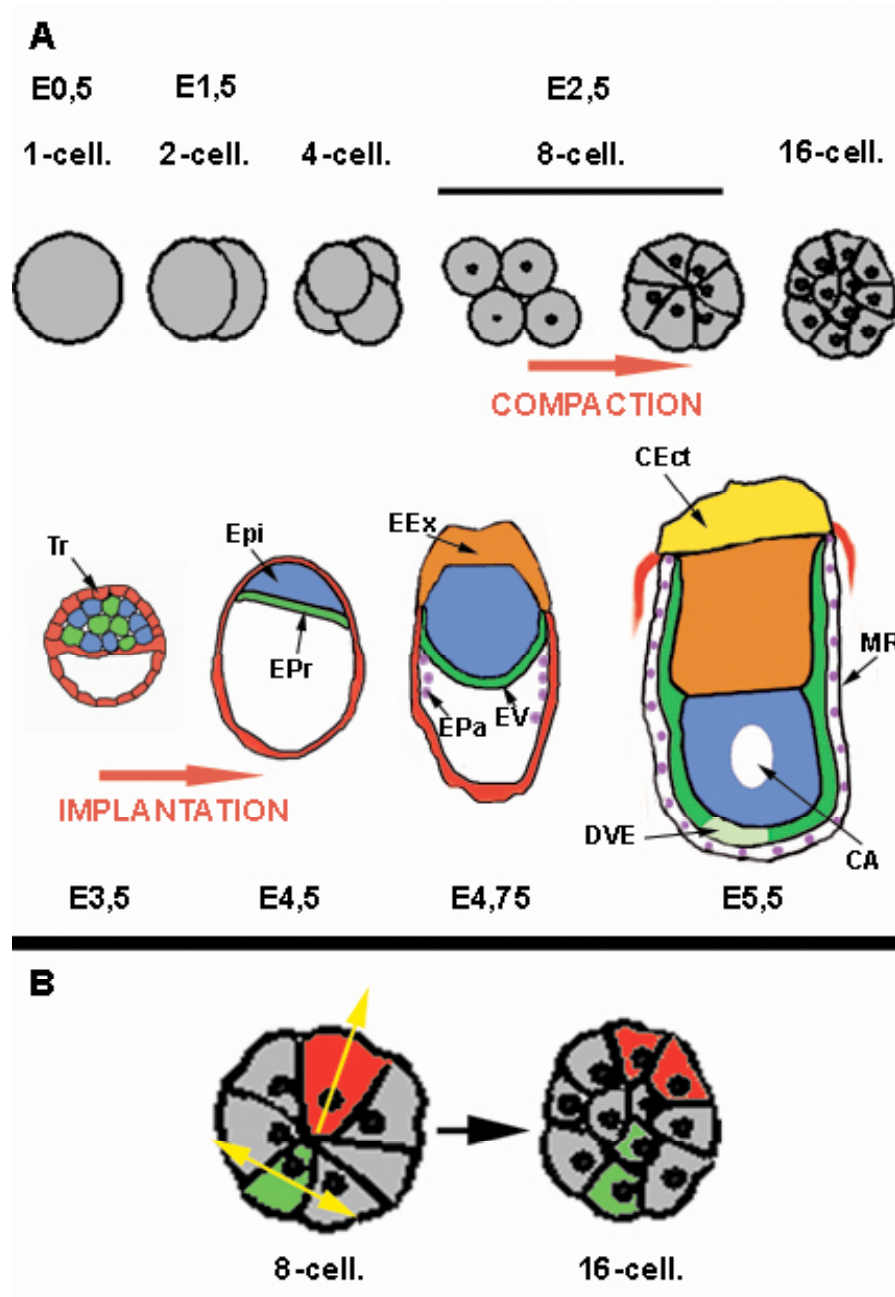


Fig 1

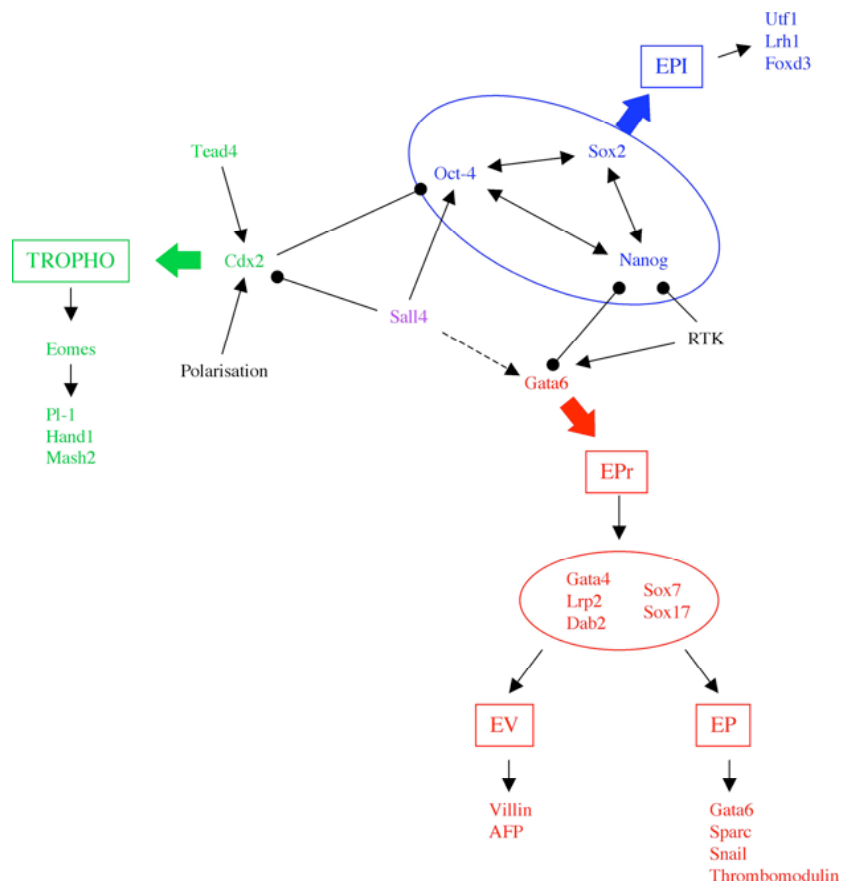


Fig 2