

Zelda, le maestro du réveil du génome zygotique

Jeremy Dufourt¹, Maëlle Bellec¹, Olivier Messina¹, Antonio Trullo¹, Cyril Favard², Ovidiu Radulescu³, Mounia Lagha¹

> Chez de nombreux animaux, bien que la fertilisation aboutisse rapidement à la fusion des génomes maternels et paternels, l'activation du génome zygotique ne débute pas dès les premières heures du développement. En effet, il existe un stock d'ARN et de protéines dans le gamète maternel qui va régir l'embryogenèse précoce. Durant cette première période critique du développement, les cellules totipotentes issues de l'œuf fécondé vont rapidement se différencier pour pouvoir ensuite former les trois feuillettes embryonnaires fondamentales : ectoderme, endoderme, et mésoderme.

La transition materno-zygotique

Chez tous les métazoaires, le passage graduel du contrôle maternel au contrôle zygotique du développement embryonnaire se déroule lors d'un événement appelé transition materno-zygotique (MZT), durant laquelle, de manière concomitante à la dégradation des ARN et protéines provenant du gamète maternel, le génome de l'embryon est activé. Cette activation est caractérisée par une vague progressive de transcription, qui coïncide avec le ralentissement des cycles cellulaires dans de nombreuses espèces. Le démarrage de cette vague de transcription ainsi que le nombre de cycles de division qu'elle accompagne varient considérablement d'une espèce à l'autre. Cependant, pour chaque espèce, le déroulement temporel de la MZT est précis et très reproductible d'un embryon à l'autre. Chez les espèces au développement rapide, telles que le nématode (*Caenorhabditis elegans*), le xénope

(*Xenopus laevis*), le poisson zèbre (*Danio rerio*) et la drosophile (*Drosophila melanogaster*), la MZT s'achève quelques heures seulement après la fécondation, et est suivie du premier événement de la morphogénèse : la gastrulation. En revanche, chez les espèces à développement plus lent, telles que la souris (*Mus musculus*) et l'homme (*Homo sapiens*), la MZT peut durer plusieurs jours [1].

Chez la drosophile, l'embryogenèse commence par 14 cycles nucléaires (nc) rapides au sein d'un syncytium, contrôlés principalement par l'apport en ARN et protéines du gamète maternel. Environ deux heures après la fécondation, le génome zygotique s'active transcriptionnellement et le syncytium se sépare en cellules individuelles (cellularisation) comportant chacune un seul noyau (Figure 1A). Le réveil transcriptionnel du génome zygotique nécessite des facteurs de transcription spécifiques, dont la protéine Zelda, qui joue un rôle essentiel dans ce processus [2]. Zelda possède plusieurs caractéristiques des facteurs de transcription dits « pionniers » : 1) sa liaison aux éléments *cis*-régulateurs avant l'activation des gènes, établissant une pré-compétence pour l'adoption de certains destins cellulaires, et 2) sa capacité à ouvrir la chromatine pour faciliter la liaison de facteurs de transcription classiques. De plus, la distribution homogène de Zelda dans l'embryon permet de potentialiser l'action locale de morphogènes (par exemple, *bicoid* et *dorsal*) dans différentes régions de l'embryon [3-5] : la réponse de gènes-cibles

à la concentration de morphogène est renforcée par la liaison de Zelda à ces gènes. Cependant, le rôle de ce facteur « pionnier » dans le contrôle temporel de l'activation transcriptionnelle n'a été élucidé que très récemment.

Zelda favorise la coordination temporelle de la transcription

Dès le début de la MZT, le gène *snail* (*sna*) est transcrit dans les cellules du futur mésoderme de l'embryon de drosophile. Il code un facteur de transcription qui va permettre la spécification du mésoderme et contrôler la transition épithélio-mésenchymateuse lors de la gastrulation. Dès les premiers cycles nucléaires, la protéine Zelda se lie à deux *enhancers* (distal et proximal) de *sna*, qui contrôlent spatialement et temporellement son expression.

Pour tenter de comprendre le rôle de Zelda dans l'activation transcriptionnelle au cours de la MZT, nous avons mesuré les temps d'activation de la transcription, dans les cellules du mésoderme en formation, de plusieurs transgènes ayant une version tronquée de l'*enhancer* distal de *sna* (*snaE*) et possédant un nombre croissant de sites de fixation de la protéine Zelda. Le suivi de l'activation de la transcription dans des embryons vivants est possible grâce à l'ajout, dans une partie non-codante du transgène rapporteur, de séquences de fixation de la protéine du bactériophage MS2 à l'ARN [6]. Lors de la transcrip-

¹Institut de génétique moléculaire de Montpellier, université de Montpellier, CNRS-UMR 5535, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

²Institut de recherche en infectiologie de Montpellier, CNRS, université de Montpellier UMR 9004, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

³LPHI, UMR CNRS 5235, université de Montpellier, place E. Bataillon - Bât. 24 cc 107, 34095 Montpellier, Cedex 5, France.

Jeremy.dufourt@igmm.cnrs.fr

Mounia.lagha@igmm.cnrs.fr



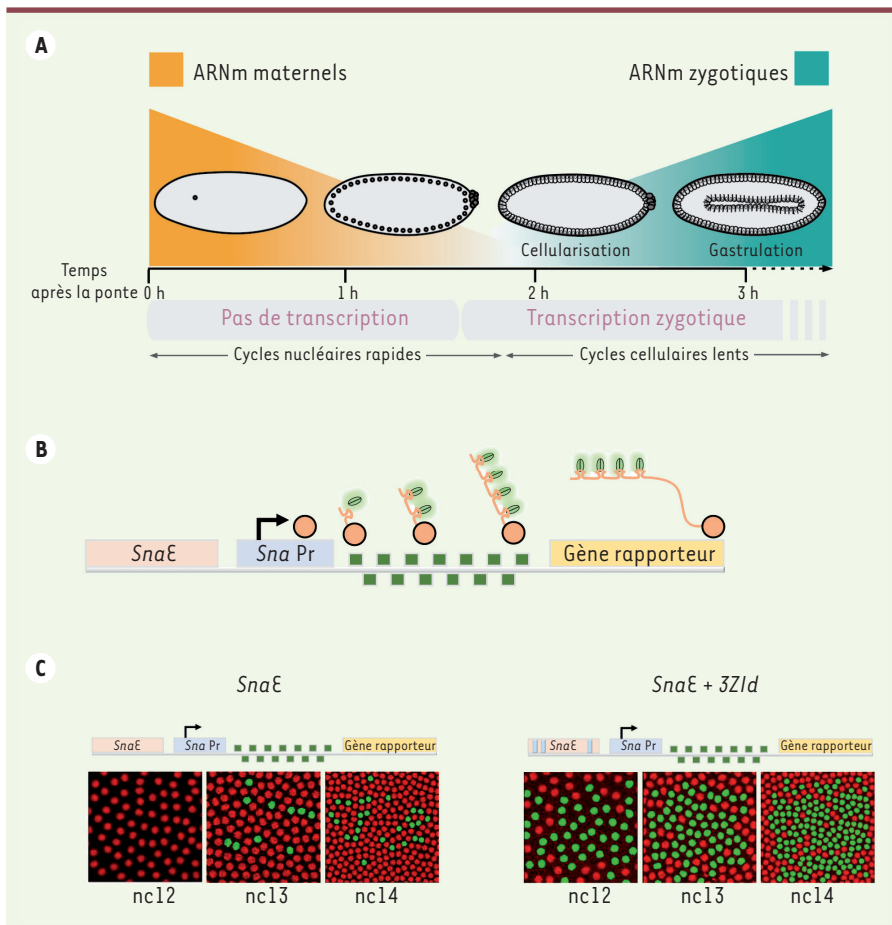


Figure 1. A. Représentation schématique de la transition materno-zygotique (MZT) chez la drosophile. B. Schéma du système MS2/MS2 coat protein (MCP) couplée à la green fluorescent protein (GFP) permettant de visualiser la transcription génique en temps réel. C. Représentation schématique des deux transgènes comportant soit la version tronquée de l'enhancer distal de *sna* (*SnaE*) ne comportant aucun site de liaison à Zelda, soit cet enhancer avec la présence additionnelle de trois sites de liaison à Zelda (*SnaE* + 3Zld), et imagerie en temps réel de leur activité de transcription au cours de trois cycles nucléaires (nc12, nc13, nc14). Chaque enhancer (rectangle orange) contrôle le promoteur minimal de *sna* (*SnaPr*, rectangle bleu), qui permet la transcription d'un gène rapporteur (rectangle jaune) comportant 24 répétitions du motif de fixation de la protéine MCP (carrés verts) dans sa partie 5' non codante. Les noyaux qui présentent une activité transcriptionnelle sont détectés grâce à la fluorescence de la GFP et colorés en vert. Ils sont beaucoup plus nombreux lorsque l'enhancer distal contient des sites de liaison à Zelda qu'en leur absence.

tion, ces étiquettes forment des « tiges-boucles » avec l'ARNm, auxquelles va rapidement se lier une protéine de fusion fluorescente (*MS2 coat protein* couplée à la *green fluorescent protein*), ce qui permet de visualiser ces nouveaux transcrits (Figure 1B). Nous avons montré que la protéine Zelda accélérât la coordination de l'activation de la transcription (synchronie) de *sna* au sein du mésoderme en formation (Figure 1C).

Zelda masque la mémoire transcriptionnelle

La possibilité de suivre l'activation de la transcription dans des embryons vivants permet aussi de déterminer l'effet de Zelda sur l'activité transcriptionnelle au cours de multiples cycles nucléaires. Nous avons ainsi récemment documenté l'existence d'une mémoire mitotique transcriptionnelle, en montrant que le statut transcriptionnel des noyaux

mères lors d'un cycle nucléaire donné influençait l'activation de la transcription, au cycle suivant, dans les noyaux qui en dérivent [7] (Figure 2A).

Les cellules vont se diviser de nombreuses fois au cours du développement, et la régulation génique des cellules mères doit être transmise aux cellules filles afin de maintenir l'identité tissulaire. Cependant, à chaque division cellulaire (mitose), la transcription s'arrête, les chromosomes se condensent, et la plupart des facteurs de transcription se dissocient de la chromatine. Afin de transmettre l'information d'identité cellulaire, certains mécanismes garantissent la réactivation post-mitotique de la transcription de certains gènes d'identité dans les cellules filles. Ce processus est appelé « bookmarking » mitotique en référence aux facteurs qui restent associés à la chromatine durant la mitose et servent

de « marque-pages » [8]. Les facteurs de transcription « pionniers », outre leur propriété de se lier aux nucléosomes, restent généralement associés aux chromosomes mitotiques. La rétention mitotique de ces facteurs de transcription en fait des candidats idéaux pour la transmission de l'identité cellulaire au cours des divisions mitotiques.

Sous l'effet de l'activation de ses enhancers, l'expression de *sna* est très rapide, ce qui empêche d'analyser le rôle de Zelda dans le tempo d'activation de *sna*. Nous avons donc utilisé la version tronquée de l'enhancer distal de *sna* (*snaE*) qui ne contient plus de sites de fixation de la protéine Zelda, et lui avons ajouté, ou pas, des sites de fixation de Zelda. L'activation de ce transgène est stochastique, mais toujours restreinte aux noyaux du mésoderme en formation. Ce dispositif expérimental permet de suivre les temps d'acti-

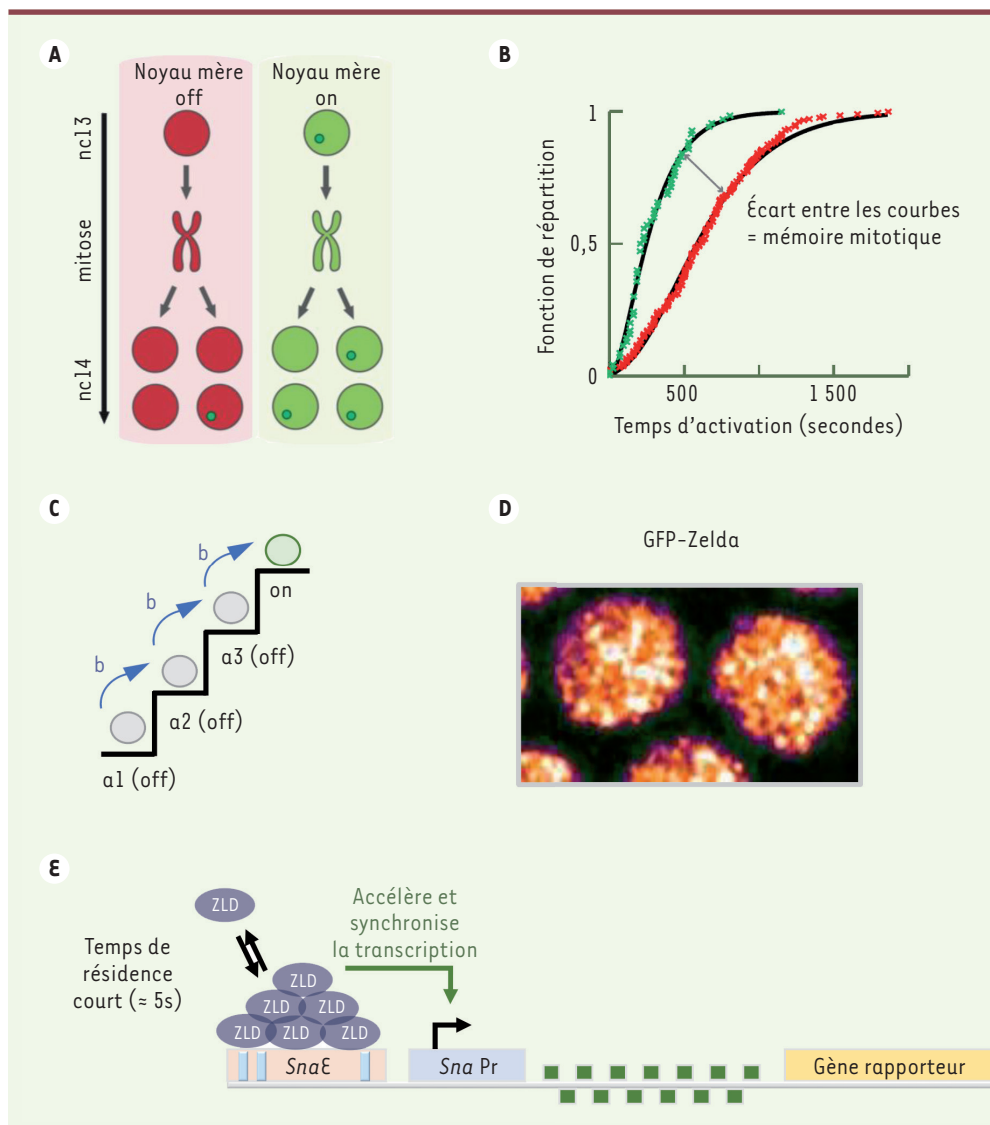


Figure 2. A. Schéma représentant la mémoire mitotique entre deux cycles nucléaires consécutifs (nc13 et nc14) de l'embryon de drosophile. Les noyaux issus de noyaux mères dans lesquelles la transcription génique est active (on, en vert) s'activent en moyenne plus rapidement que ceux issus de noyaux mères dans lesquelles la transcription génique est inactive (off, en rouge), au cycle nucléaire suivant (nc14). **B.** Fonction de répartition des temps d'activation au cycle nucléaire 14. Les valeurs des temps d'activation transcriptionnelle des noyaux issus de noyaux mères « actifs » sont représentées en vert, et celles des noyaux issus de noyaux mères « inactifs » sont représentées en rouge. Les paramètres du modèle mathématique sont estimés à partir de courbes ajustées à ces valeurs expérimentales (courbes noires). **C.** Représentation schématique des états épigénétiques discrets nécessaires pour atteindre l'activation de la transcrip-

tion (état ON). La durée de chaque transition d'un état à l'autre est fournie par le paramètre noté « b ». **D.** Image de microscopie confocale de la protéine Zelda étiquetée avec une GFP (par la technique CRISPR/Cas9) montrant la présence de « microenvironnements nucléaires » dans lesquels la protéine s'accumule. **E.** Schéma représentant le rôle de Zelda dans l'activation synchrone de la transcription de multiples gènes zygotiques. ZLD : Zelda ; GFP : *green fluorescent protein*.

tion transcriptionnelle des noyaux filles provenant de noyaux mères transcriptionnellement « actifs » ou « inactifs » (Figure 2B) : ces temps d'activation reflètent la mémoire transcriptionnelle à travers la mitose [7]. Nous avons pu ainsi montrer que Zelda accélérât l'activation transcriptionnelle des deux sous-populations de noyaux filles. Par une accélération générale de la transcription, Zelda tend ainsi à diminuer le biais de mémoire mitotique. Cependant ce biais de mémoire est récupéré

lorsqu'on diminue l'expression de ce facteur dans l'embryon, ce qui suggère l'implication d'autres facteurs dans le processus de mémoire mitotique. Pour affiner notre compréhension du rôle biologique de Zelda dans l'activation du génome zygotique, nous avons formalisé nos données en développant un modèle mathématique, qui permet de mieux appréhender le nombre et la durée des étapes nécessaires à l'activation de la transcription. Dans ce modèle, l'activation de la transcription est atteinte

après avoir parcouru une série de transitions aléatoires entre états épigénétiques discrets (Figure 2C). Le modèle prédit que le type de distribution du temps d'activation (loi exponentielle, loi gamma, etc.) dépend du nombre d'états discrets. L'analyse des résultats expérimentaux en utilisant ce modèle indique qu'en moyenne, les noyaux provenant de noyaux mères, dans lesquels la transcription est active, doivent parcourir un nombre plus petit de transitions jusqu'à l'activation, et suggère

