



HAL
open science

Études des interactions fonctionnelles entre l'endothéline-3, les intégrines beta1 et les propriétés élastiques du tissu embryonnaire au cours du développement du système nerveux entérique

Elodie Gazquez

► **To cite this version:**

Elodie Gazquez. Études des interactions fonctionnelles entre l'endothéline-3, les intégrines beta1 et les propriétés élastiques du tissu embryonnaire au cours du développement du système nerveux entérique. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066240 . tel-01592259

HAL Id: tel-01592259

<https://theses.hal.science/tel-01592259>

Submitted on 23 Sep 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Pierre et Marie Curie

École doctorale ED515-Complexité du Vivant

Institut Curie UMR144 - Institut Mondor de Recherche Biomédicale INSERM-U955

Équipe 6- Morphogénèse et Génétique Moléculaire

Études des interactions fonctionnelles entre l'endothéline-3, les intégrines- β 1 et les propriétés élastiques du tissu embryonnaire au cours du développement du système nerveux entérique

Présentée et soutenue publiquement le 21 septembre 2016 par

Elodie GAZQUEZ

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire et du Développement

Dirigée par Sylvie DUFOUR

Devant un jury composé de :

Mme Corinne ALBIGES-RIZO (DR2 CNRS) :

Rapporteur

Mr Pascal de SANTA BARBARA (DR2 INSERM) :

Rapporteur

Mme Claire THIBAUT (Professeur UPMC) :

Examineur

Mme Sylvie DUFOUR (DR2 CNRS) :

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chacun des membres du jury, Corinne Albigès-Rizo, Pascal de Santa Barbara et Claire Thibault, pour le temps qu'ils ont consacré à mon travail de thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements à ma directrice de thèse. Sylvie, j'ai tellement de raisons de vous remercier ! Merci pour votre confiance, merci de m'avoir accompagné dans mes premiers pas de scientifique padawan (j'ai encore du chemin à faire), merci pour les conditions de travail que vous m'avez fournies et la richesse scientifique à laquelle j'ai eu accès, merci d'avoir toujours été disponible pour moi et mon caractère, merci pour votre gentillesse et votre humanité.

Je tiens à remercier tout particulièrement Nadège et Yuli, pour tous vos conseils scientifiques et votre soutien (je n'oublierai pas de sitôt Rotterdam). Merci également à Vincent et Nicolas pour m'avoir ouvert grand les portes de leur labo et du monde de la biophysique. Merci à vous tous pour ces collaborations fructueuses et enrichissantes.

J'aimerais remercier chaleureusement les anciens membres de notre petite équipe que nous formions à Curie : Florence, pour m'avoir guidée dans mes premières expériences, pour ta rigueur scientifique et pour ta gentillesse. Un grand merci à Julie ! Toi et moi nous étions les Sherlock et Watson, les Gusgus et Jack-Jack du labo... Des Disneys en scred au fond du labo en passant par des pauses cafés bien trop bruyantes (c'est vrai qu'on imitait bien les mouettes de Marseille), que de souvenirs avec toi au 3^e étage de la rue Lhomond.

Un grand merci également à mes autres joyeux camarades du 3^e étage de Burg, toute la team Houdusse (y compris les anciens): Helena, Carlos, Lena, I-meï, Virginie, Serena, Hussein, Vicente, Yannick, Gilles, parce que cela n'aurait pas été pareil sans vous. Par contre pour le prochain Noël, WALLAH on arrête de remettre les noms dans la boîte après la pioche ;p!

Ce fut non sans peine que je quittais ce fameux 3^e étage de Curie pour... le ~~sous-sol~~, le ~~rez-de-chaussez-bas~~, ~~non-le-haut~~, l'ENTRESOL 1 de l'IMRB. Mais c'était sans compter la bonne humeur de mes nouveaux collègues de Mondor qui à coup de restau jap, apéros au PMU et raclette party, ont su très vite me mettre à l'aise. Merci à Pascale, Agathe, Sylvie, Stéphanie, Céline, Fanny, Nadget, Jeremy, Wielfried, Laure, Abdel, Bruno, Zohra et Maité!

Sarah, dear matey, not sure why I should thank you but still, I'm doing it: B**** better have my money, antibodies AND coffee back. Don't act like you forgot. More seriously, meeting you was a gift.

Je remercie également Jean-Loup et Marine, parce que c'est un réel plaisir de partager mon quotidien avec vous ainsi qu'avec Sylvie, Rédouane et Sophie dans notre bureau. Merci pour nos échanges scientifiques mais surtout pour le chocolat entre deux quantifs, les débats enflammés (surtout Jean-loup), les cours d'Italien et les révisions des hymnes Nationaux!

Enfin, bien que ces derniers remerciements sortent un peu du cadre de ma thèse, trop rares sont les occasions que l'on a de remercier nos proches pour que je ne saisisse pas cette occasion.

Un milliard de mercis à ma maman et mon papa, mon frère, mon tonton et ma tata, mes cousines et toute ma famille (et ça y est je pleure..) pour avoir toujours su trouver les mots justes qui me rassurent : «Sinon, tu comptes faire quoi après ta thèse?». Merci aussi à tata Marieline, pour avoir toujours été là.

Merci à tous mes amis de Marseille, les copains FADA: Ida, Pierre, Marie, Thomas et Thomas (il vit en toi), qui me manquent terriblement. La suite des copains de Marseille qui vivent ici sur Paris, Socca copain et MC. Ah copine! Que d'aventures nous avons vécues ensemble à la fac. J'entends encore les chants des manifs de nos premières années à St Charles..

Merci à mes amis de Paris, pour être la quoi qu'il arrive, Helena et Joël, ma Mouflette et son cher John (nous les aurons nos paillettes, nous les aurons!), Nancy et la Princesse (un merci bien syndical pour vous).

Le plus spécial des remerciements est pour toi Fanny. Fanny, tu illumines comme le soleil...non je déconne. Payotte, Merci pour TOUT et ton soutien sans faille.

Et le plus amoureux de mes remerciements est pour toi Tristan. Merci d'être l'un des piliers de mon existence. Je sais que maintenant la migration des crêtes neurales entériques n'a plus de secret pour toi...

À tout le monde, merci !

Elodie

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION GENERALE	6
I – Le système nerveux entérique ou « le deuxième cerveau »	6
I - A: Fonction et organisation.....	6
I - B : Origine embryonnaire.....	11
I - B - a : Les cellules de crête neurale : formation et dérivés	11
I - B - b : Le SNE provient des CCN vagues et sacrées	17
I - C : Le développement du SNE	21
I - C - a : Les aspects spatio-temporels de la colonisation intestinale par les CCNEs	21
I - C - b : Formation de l'intestin embryonnaire	23
I - C - c : Les aspects dynamiques de la migration des CCNEs	27
I - C - d : Différenciation et prolifération des CCNEs	31
II - Les acteurs moléculaires contrôlant le développement du SNE	36
II – A : La maladie de Hirschsprung et l'identification des acteurs moléculaires clés du développement du SNE	36
II - B: Les voies de signalisation principales.....	39
II - B - a : La voie de signalisation GDNF/RET	39
II - B - a : La voie de signalisation EDN3/EDNRB	42
II - C : Les autres facteurs impliqués dans le développement du SNE.....	48
II - C - a : Les facteurs de transcriptions	48
II - C - b : Les morphogènes	50
II - C - c : Les molécules d'adhérences	52
II – D : Interactions fonctionnelles et génétiques de la voie EDN3/EDNRB.....	53
II - D- a: Interactions génétiques et fonctionnelles entre les voies EDN3/EDNRB et GDNF/RET	53
II - D- b: Interactions génétiques entre les voies EDN3/EDNRB et les autres gènes du développement du SNE	55
III - Les intégrines et le développement du SNE	58
III – A : Famille et structure des intégrines.....	58
III – B : Activation et signalisation des intégrines.....	61
III – B-a : Les changements conformationnels conduisant à l'activation des intégrines	61
III – B-b: Activation et signalisation «inside-out»/«outside-in» des intégrines	64
III – B-c: L'Adhésome : complexe protéique associé aux intégrines et voies de signalisation	67
III– C : Les intégrines, l'adhérence et la migration cellulaire.....	70
III – C-a: Les structures d'adhérence à la MEC dépendantes des intégrines	70
III – C-b: Les adhésions dépendantes des intégrines et la migration cellulaire	73
III – D : Les intégrines et le développement du SNE.....	78
IV - Mécanotransduction et influence des propriétés mécaniques de l'environnement sur les comportements cellulaires.....	84
IV – A : Les Adhésions focales sont des mécanocapteurs.....	84
IV – A-a: Mise en évidence du phénomène au niveau des adhésions focales	84
IV – A-b: Mécanismes moléculaires de la mécanosensation et mécanotransduction au niveau des adhésions focales	86

IV – B : Les cellules répondent à la rigidité de l’environnement	90
IV – B-a: Effet de l’élasticité sur l’adhérence et la migration des cellules	94
IV – B-b: Effet de l’élasticité sur la différenciation cellulaire	96
V - Objectifs des travaux de thèse	99
RESULTATS	103
I - Interactions fonctionnelles et génétiques entre l’EDN3 et les intégrines-β1 au cours de la colonisation des CCNEs.....	103
II - Les propriétés élastiques de l’intestin embryonnaire et son influence sur la colonisation des CCNEs (Articles 2 et 3).....	152
III - Effet de l’élasticité sur la différenciation des progéniteurs entériques.....	192
CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	196
I - Interactions génétiques et fonctionnelles entre l’EDN3 et les intégrines-β1 au cours de la colonisation embryonnaire des CCNEs.....	196
I – A: <i>Edn3</i> et <i>Itgb1</i> agissent en synergie lors du développement du SNE.....	196
I – B: L’EDN3 promeut l’adhérence des CCNEs en régulant positivement la formation d’adhérences focales intégrines-β1	197
I – C: L’EDN3 module la dynamique membranaire des CCNEs.....	199
I – D: Les CCNEs mutantes <i>Edn3^{sls}</i> présentent des propriétés adhésives altérées ...	200
I – E : Par quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) agit la voie EDN3/EDNRB ?	201
II – Propriétés élastiques de l’intestin embryonnaire et impact sur les comportements des CCNEs au cours du développement du SNE	203
II – A: L’intestin embryonnaire se rigidifie au cours de son développement.....	204
II – B: Influence de l’élasticité environnementale sur la migration tridimensionnelle des CCNEs	206
II – C: Influence de l’élasticité des supports 2D sur la migration des CCNEs et la différenciation des progéniteurs entériques	207
II – D: Propriétés mécaniques de l’environnement et HSCR:.....	208
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	211

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Structure du SNE.....	7
Figure 2: Réflexe péristaltique et partie extrinsèque du SNE	10
Figure 3 : Induction du territoire de la crête neurale et formation du tube neural	14
Figure 4: Les dérivés des cellules de la crête neurale	16
Figure 5 : Contribution des CCN vagues et sacrales à la formation du SNE	19
Figure 6 : Colonisation de l'intestin embryonnaire par les CCNEs.....	23
Figure 7 : Le développement de l'intestin embryonnaire et sa colonisation par les CCNEs...	25
Figure 8 : Aspects dynamiques de la colonisation de l'intestin embryonnaire par les CCNEs	30
Figure 9 : Différenciation et prolifération des CCNEs au cours de la colonisation intestinale	34
Figure 10 : Les gènes impliqués dans la maladie de HSCR et les phénotypes associés	38
Figure 11 : La voie GDNF/RET et son implication dans le développement du SNE.....	41
Figure 12 : La voie EDN3/EDNRB est essentielle au développement du SNE	44
Figure 13 : La voie EDN3/EDNRB contrôle différents processus de la colonisation des CCNEs	48
Figure 14 : Interactions génétiques et fonctionnelles entre les voies EDN3/EDNRB et GDNF/RET	54
Figure 15 : Interactions génétiques et fonctionnelles entre de l'EDN3/EDNRB et certains acteurs moléculaires du développement du SNE.	56
Figure 16 : La famille des intégrines et leur structure protéique	59
Figure 17 : Les changements conformationnels des intégrines.....	62
Figure 18 : Les étapes de l'activation <i>inside-out</i> des intégrines	67
Figure 19 : Exemples de voies de signalisation <i>outside-in</i> déclenchées par l'activation des intégrines.	69
Figure 20 : Les adhérences focales formées par la liaison des intégrines à la MEC.....	73
Figure 21 : La migration cellulaire.....	75
Figure 22 : Les adhérences intégrines-dépendantes et la migration cellulaire	77
Figure 23 : Rôle des intégrines- β 1 et des N-cadhérines dans le développement du SNE	80
Figure 24 : Les cellules exercent des forces de tractions sur le support via les adhérences focales et générées par le cytosquelette d'actine couplé à la myosine II.....	86
Figure 25 : Maturation des adhérences focales par le recrutement de protéines sensibles aux forces mécaniques et renforcement de l'ancrage à la MEC.	90
Figure 26 : Modèle du <i>molecular clutch</i> et définition des modules élastiques	94
Figure 27 : Effet de la rigidité du support sur les comportements cellulaire en culture 2D ...	97
Figure 28 : Croisements permettant l'obtention des embryons « contrôles ».....	103
Figure 29 : Modèle des neurosphères entériques.....	192
Figure 30 : Immunofluorescences de colonies clonales de progéniteurs entériques mises en cultures pendant 5 jours sur des supports de PDMS de rigidités différentes.....	193
Figure 31 : Interaction génétiques et fonctionnelles entre <i>Edn3</i> et <i>Itgb1</i>	197

LISTE DES ABREVIATIONS

ADMIDAS : Adjacent Domain Metal Ion Dependant Adhesion Site
AFM : Atomic Force Microscopie
B-FABP : Brain fatty acid-binding protein
BrdU : Bromodésoxyuridine
BMP : Bone Morphogenic Proteins
CCN : Cellules de crête neurale
CCNE : Cellules de crête neurale entériques
DM : Double-mutant
DAG : Diacyl glycérol
EDN3 : Endothéline-3
EDNRB : Endothélines récepteur B
FGF : Fibroblast Growth Factors
FN : Fibronectine
GDNF : Glial cell-derived neurotrophic factor
HSCR : Maladie de Hirschsprung
ICAP-1 : Integrin Cytoplasmic domain Associated Protein 1
ILK : Integrin-Linked Kinase
IMC : Inner membrane association motif
IPANs : Neurones afférents primaires intrinsèques
JNK : c-Jun N-terminal kinases
MEC : Matrice extracellulaire
MIDAS : Metal Ion Dependant Adhesion Site
MMP : Métalloprotéinase matricielle
OMC : Outer membrane association motif
PAA-Gels : Gels de polyacrylamide
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PBT : Phosphotyrosin binding domain
RET : Rearranged during transfection
SNC : Système nerveux central
SHH : Sonic Hedgehog Homologue
SNE : Système nerveux entérique
SNP : Système nerveux périphérique
TNC : Tenascine-C
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF : Transforming Growth Factors
VN : Vitronectine
WNT : Wingless-type MMTV integration site family member

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GENERALE

I – Le système nerveux entérique ou « le deuxième cerveau »

I - A: Fonction et organisation

Le tractus gastro-intestinal, qui comprend l'œsophage, l'estomac et l'intestin, possède, contrairement aux autres organes viscéraux, un système nerveux autonome qui lui est propre : le système nerveux entérique (SNE). Le SNE contrôle diverses fonctions vitales du système digestif. Il synchronise les mouvements péristaltiques du muscle lisse intestinal qui assure le passage du bol alimentaire d'un bout à l'autre de l'intestin pendant le transit. Il régule également les sécrétions gastriques, l'absorption des nutriments (en modifiant localement le flux sanguin), contribue au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et interagit avec le système immunitaire (Furness 2012; Di Giovangiulio, Verheijden et al. 2015)

Au niveau structural, le SNE forme un maillage dense tapissant la paroi digestive sur toute sa longueur (Fig. 1A). Ce maillage est composé de neurones et cellules gliales dont les corps cellulaires sont agrégés en ganglions reliés les uns aux autres par des prolongements axonaux et dendritiques (Fig. 1A et B). Les connexions nerveuses qui composent ce réseau sont elles-mêmes entourées de cellules gliales mais dépourvues de myéline. Chez les mammifères, les ganglions sont divisés en deux plexus concentriques intramuraux : le plexus myentérique (également nommé plexus d'Auerbach), présent tout le long du tube digestif et le plexus sous-muqueux (ou plexus de Meissner) qui ne se trouve que dans le petit et gros intestin (Fig. 1D) (Furness 2006). Le plexus myentérique se situe le plus radialement, entre les couches musculaires longitudinale et circulaire. Le plexus sous-muqueux quant à lui, se localise plus en profondeur, entre la couche musculaire circulaire et la muqueuse intestinale (Fig. 1C) (Heanue and Pachnis 2007). Ainsi, le SNE interagit avec de nombreux types cellulaires composant l'intestin dont les cellules musculaires, les cellules sécrétrices, les cellules épithéliales et les cellules interstitielles de Cajal, considérées comme les cellules pacemaker de l'intestin.

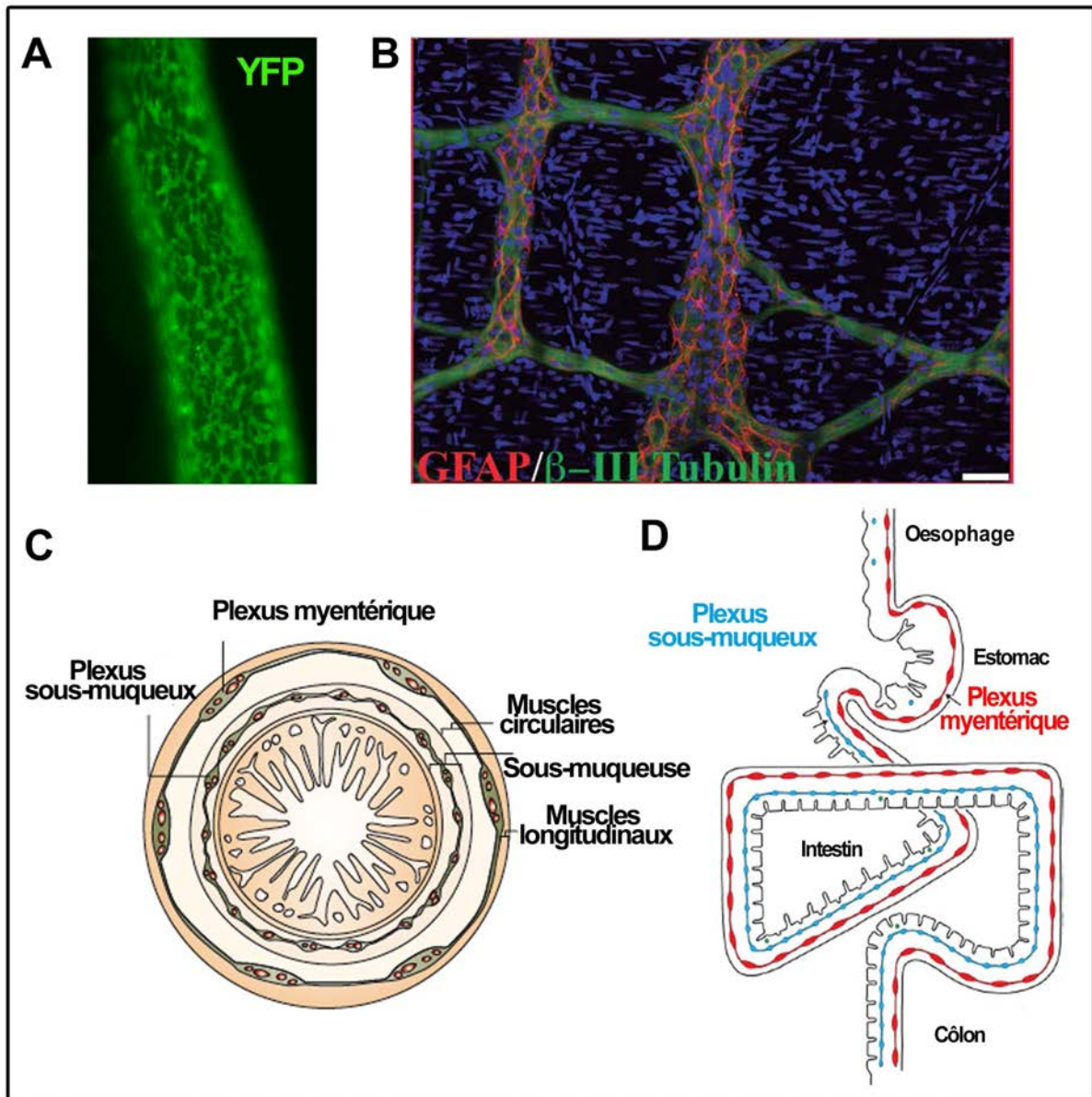


Figure 1: Structure du SNE

A- Immunofluorescence *whole-mount* d'intestin embryonnaire E12.5 de souris, illustrant le maillage dense composant le SNE (YFP, vert), image personnelle. **B-** Immunofluorescence du plexus myentérique adulte, les neurones sont marqués par la β III Tubuline (vert) et les cellules gliales par la GFAP (rouge), échelle : 50 μ m (Coelho-Aguiar, Bon-Frauches et al. 2015) **C-** Coupe sagittale illustrant les structures histologiques de l'intestin adulte : le plexus myentérique est contenu entre les couches des muscles longitudinaux et circulaires. Le plexus sous-muqueux est localisé en profondeur dans la sous-muqueuse intestinale, proche de l'épithélium (Heanue and Pachnis 2007). **D-** Illustration de l'anatomie du tractus digestif et de la localisation des plexus : le plexus myentérique est présent sur toute la longueur du tube intestinal et le plexus sous-muqueux innerve du petit intestin au côlon (Furness 2006).

Chaque ganglion contient différents sous-types neuronaux. Il faut noter cependant que la présence de certains sous-types ainsi que la taille des ganglions peuvent varier selon la région intestinale ou l'espèce considérée (Furness et al. 1995). Il en est de même pour l'Homme, bien qu'aucune exploration systématique de toutes les régions intestinales, ni de

recensement exhaustif de tous les types de neurones n'aient été réalisés (Hao and Young 2009; Carbone, Jovanovska et al. 2014). Ces sous-types ont été caractérisés selon un ensemble de critères tels que leur morphologie, leurs caractéristiques électrophysiologiques, leur localisation, la longueur et direction (orale ou anale) des projections axonales, les cibles cellulaires intestinales ainsi que le répertoire de neurotransmetteurs exprimé (Costa, Brookes et al. 1996; Lomax, Sharkey et al. 1999; Lomax and Furness 2000; Brookes 2001). On trouve notamment des neurones sensoriels, tels que les IPANs (neurones afférents¹ primaires intrinsèques) sensibles aux stimuli chimiques et mécaniques de la lumière intestinale. Ces neurones font partie de microcircuits réflexes régulant de manière autonome le péristaltisme (Fig. 2B et 2C ; Furness 1980). Au passage du bol alimentaire, les IPANs transmettent des signaux aux neurones moteurs excitateurs via les interneurons ascendants² ce qui a pour effet la contraction musculaire en amont du bol. En aval en revanche, le muscle va être relaxé par les motoneurons inhibiteurs activés via les interneurons descendants, le tout ayant pour effet la propulsion du contenu de la lumière intestinale vers l'anus (Costa 2000; Young 2008).

De plus, le répertoire de neurotransmetteurs est aussi divers que celui exprimé par le système nerveux central (SNC) tels que l'acétylcholine, la sérotonine, le GABA (acide gamma aminobutyrique), la substance P, le NO (oxyde nitrique), les peptides NPY (Neuro Peptides Y) ou encore le VIP (Peptide vasoactif intestinal) (Hao and Young 2009; Furness 2012).

Concernant les cellules gliales entériques, elles sont encore plus nombreuses que les neurones et plus abondantes dans le plexus myentérique que dans le sous muqueux (Hoff, Zeller et al. 2008). Plusieurs études utilisant des souris transgéniques, chez qui la population de cellules gliales adultes est altérée ou diminuée, ont permis de mettre en évidence leur rôle crucial dans la physiologie intestinale. Premièrement, elles sont indispensables au maintien et à la survie des neurones entériques (Bush, Savidge et al. 1998; Laranjeira, Sandgren et al. 2011; Abdo, Mahe et al. 2012; Boesmans, Lasrado et al. 2015). Deuxièmement, elles contribuent directement au maintien de la barrière épithéliale intestinale puisqu'elles contrôlent la prolifération et l'adhérence des cellules épithéliales

¹ Afférent ou efférent : neurones dont les projections vont du SNC vers la périphérie (efférent) ou de la périphérie vers le SNC (afférent)

² Ascendant ou descendant : désigne la direction des projections axonales. Direction orale pour ascendant et direction anale pour descendant.

entre elles (Neunlist 2007). Elles ont également un effet indirect via les neurones, car leur altération conduit à des changements de phénotype des sous-types neuronaux qui, *in fine*, perturbent la motilité et la perméabilité de la paroi intestinale (Aube, Cabarrocas et al. 2006). Au sein des ganglions, cellules gliales et neurones entériques interagissent directement (Fig. 2A). En effet, les cellules gliales expriment des récepteurs à l'ATP (Adénosyle tri-Phosphate), à l'acétylcholine et à la sérotonine (Boesmans, Cirillo et al. 2013), qui sont des neurotransmetteurs exprimés par les neurones. Mais les cellules gliales peuvent également sécréter des neurotransmetteurs, tels que le NO et moduler ainsi l'activité neuronale (Cirillo, Sarnelli et al. 2011; Boesmans, Cirillo et al. 2013). Cependant, les effecteurs et mécanismes moléculaires impliqués dans cette communication neurones-cellules gliales sont mal connus. Plus remarquable encore, certaines cellules gliales souches présentes dans l'intestin adulte ont été montrées comme capables de se trans-différencier en neurones entériques sous certaines conditions (stress chimique), bien que ce potentiel de neurogénèse soit très limité (Laranjeira et al. 2011). Enfin, elles sont capables d'une certaine plasticité de fonction et vont moduler l'expression de certains marqueurs en réponse aux facteurs environnementaux de l'intestin (nutriments, microbiote et forces mécaniques par exemple) (Boesmans et al. 2015).

Enfin, le SNE est considéré comme la troisième branche du système nerveux autonome, composé également des systèmes nerveux parasympathique et orthosympathique (Furness 2006). Il fonctionne partiellement de manière autonome puisque les réflexes péristaltiques surviennent toujours sur des segments d'intestins disséqués et isolés (Bulbring, Lin et al. 1958). Ce phénomène est dû aux microcircuits nerveux intrinsèques décrits précédemment qui assurent le péristaltisme réflexe au passage du bol alimentaire (Bulbring, Lin et al. 1958). Le SNE est cependant relié anatomiquement au SNC, par ce qui est considéré comme la partie extrinsèque du SNE. Ce lien anatomique, qui s'opère via le nerf vague, les nerfs splanchniques et pelviens, assure un dialogue permanent entre le SNC et le SNE, modulant ainsi son indépendance. Ces nerfs sont composés des projections axonales, vers le SNC, des neurones entériques dont les corps cellulaires sont situés dans la paroi intestinale et constituent les afférences sensibles, mais qui peuvent faire circuler des signaux efférents (i. e du SNC vers le SNE).

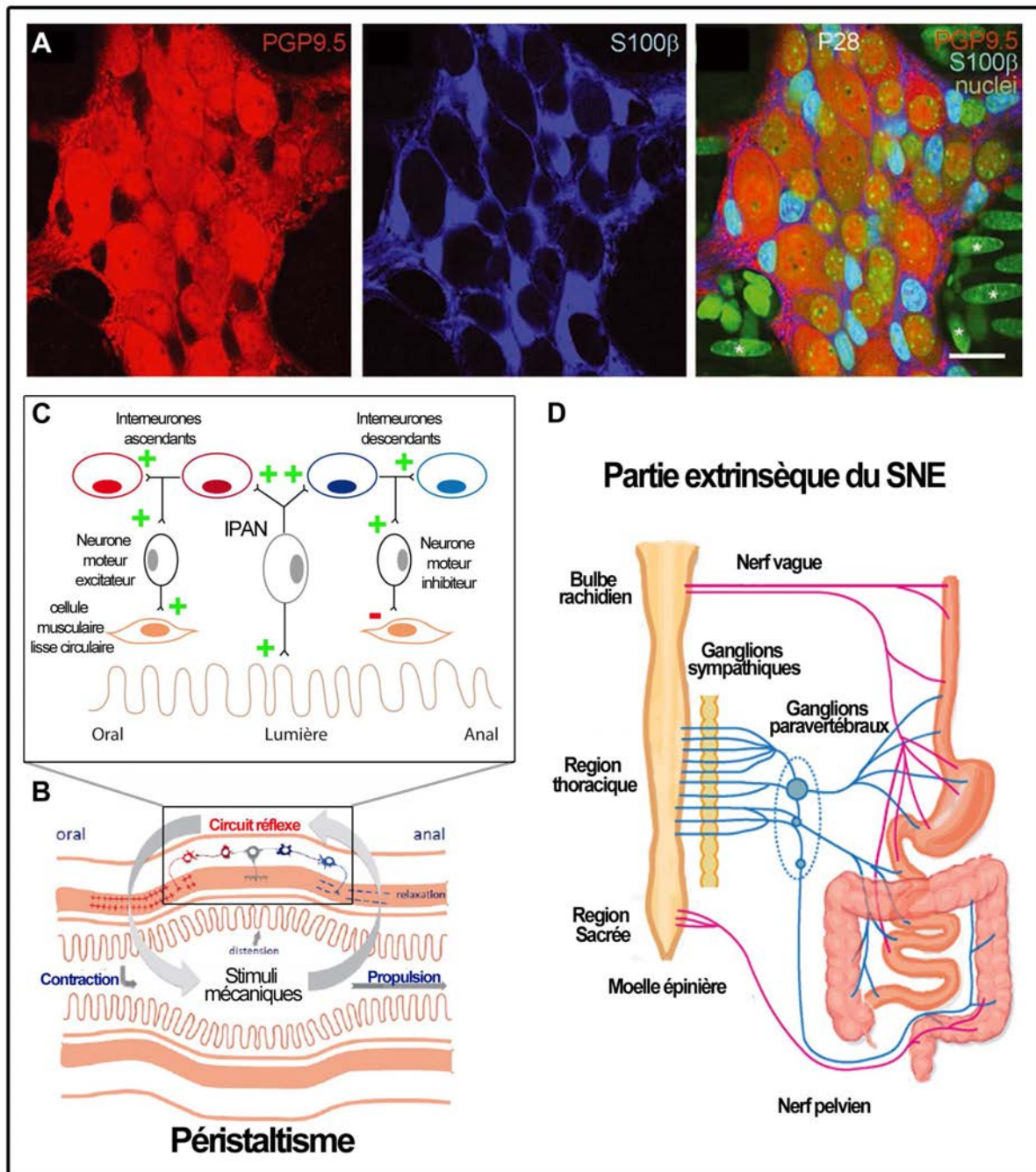


Figure 2: Réflexe péristaltique et partie extrinsèque du SNE

A- Proximité des neurones et des cellules gliales composant un ganglion du plexus myentérique d'une souris adulte (28 jours). Les cellules gliales sont marquées avec S100 β (violet), les neurones avec PGP9.5 (rouge), les noyaux en vert, merge S100 β et noyaux (bleu ciel), échelle : 25 μ m, (Hao and Young 2009). B,C- Schémas illustrant le péristaltisme (B) contrôlé par le microcircuit réflexe (C). Au passage du bol alimentaire, les IPANs (B) détectent les stimuli mécaniques et contrôlent la contraction musculaire en amont du bol (oral, B) via les interneurons ascendants et les motoneurons excitateurs, alors qu'en aval, ils inhibent la contraction (B) via les interneurons descendants et les motoneurons inhibiteurs (C), ce qui a pour effet la relaxation musculaire et la propulsion anale du contenu de la lumière intestinale (B) (Hansen 2003; Spencer, Dinning et al. 2016). D- Partie extrinsèque de SNE : innervations sympathiques (bleu) via les ganglions paravertébraux et parasympathiques (fuchsia) via le nerf vague et le nerf pelvien. Ces connexions anatomiques permettent un dialogue permanent entre le SNE et le SNC (Uesaka, Young et al. 2016).

En conclusion, de par sa ressemblance avec le SNC, sa fonction primordiale de régulateur de l'appareil digestif, la diversité des types neuronaux et de cellules gliales qui le composent, la diversité de neurotransmetteurs qu'ils expriment ainsi que son indépendance relative vis à vis du SNC, font qu'il est considéré aujourd'hui comme le « second cerveau ».

I - B : Origine embryonnaire du SNE

I - B - a : Les cellules de crête neurale : formation et dérivés

Les cellules de crête neurale (CCN) désignent chez les vertébrés, une population de cellules multipotentes et transitoires qui migrent au sein de l'embryon suivant différentes voies prédéfinies, pour donner naissance à une grande diversité de structures chez l'adulte (Fig. 4). Les CCN proviennent d'un territoire particulier de l'ectoderme, la crête neurale, localisé au niveau dorsal de l'embryon, le long de son axe antéropostérieur. La crête neurale se situe à la frontière entre le neurectoderme, à l'origine du SNC, et l'ectoderme qui donnera l'épiderme (Gammill and Bronner-Fraser 2003). **La spécification de la crête neurale, ainsi que l'acquisition de l'identité des futures CCN qui la composent, va se faire progressivement au fil des étapes précoces de l'embryogénèse, sous l'influence d'un réseau d'interactions complexes entre plusieurs gènes régulateurs** (Fig. 3) (Prasad, Sauka-Spengler et al. 2012)

Dans un premier temps, au cours des étapes précoces de la gastrulation, les frontières entre les différentes zones adjacentes (ectoderme, crête neurale et neurectoderme) ne sont pas nettement définies et se chevauchent (Fig. 3A). L'induction de la crête neurale se fait via l'action combinée de signaux provenant à la fois du neurectoderme, de l'ectoderme et du mésoderme paraxial ; ce dernier est le précurseur des somites et est localisé du côté ventral du futur tube neural (Fig. 3B et C). Les acteurs moléculaires majeurs de cette induction sont les gradients de morphogènes BMP (*Bone Morphogenic Proteins*) et FGF (*Fibroblast Growth Factors*), les signaux diffusibles tels que l'acide rétinoïque, Hedgehog ainsi que les voies de signalisations canoniques Wnt et Notch (Gammill and Bronner-Fraser 2003; Milet and Monsoro-Burq 2012). **Sous l'induction combinée de ces différents signaux, les cellules composant la crête neurale vont alors exprimer des facteurs de transcription spécifiques**, en particulier Pax mais également Msx-1/2 et Zic-1, c-Myc et AP2 α , absents du neurectoderme et de l'ectoderme. Ainsi les frontières finissent par se dessiner nettement. À ce stade, les cellules composant la crête

neurale sont considérées comme les progéniteurs des CCN (Fig. 3B) (Milet and Monsoro-Burq 2012; Prasad, Sauka-Spengler et al. 2012; Duband, Dady et al. 2015).

Ensuite, **la spécification des progéniteurs des CCN en CCN pré-migratoires va s'accroître, toujours sous l'effet des mêmes effecteurs** (BMP, FGF, Wnt) mais également combinée à l'action des facteurs de transcription nouvellement exprimés (Fig. 3B). Les CCN pré-migratoires vont accumuler une seconde vague de facteurs de transcription parmi lesquels Snail1, Snail2, FoxD3, Sox9, Sox10, Twist, Ap2 et Zeb2, essentiels à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et à leur délamination du tube neural (Stuhlmiller and García-Castro 2012; Duband, Dady et al. 2015).

Suivant la région rostro-caudale considérée et en fonction des espèces, la délamination et la TEM des CCN débutent peu avant (chez la souris), au moment ou bien après la fermeture du tube neural (chez le poulet) et se poursuit selon une régulation spatiotemporelle précise. La fermeture du tube neural a lieu pendant la neurulation, le long de l'axe cranio-caudal et se produit par la convergence et la fusion des bourrelets neuronaux (formés au préalable par l'invagination de la plaque neurale). La crête neurale se retrouve ainsi sur la partie dorsale du tube (Fig. 3C) (Gammill and Bronner-Fraser 2003).

Pour illustrer brièvement la TEM, on peut citer à titre d'exemple différents processus qui se produisent au niveau des CCN troncales chez le poulet. **Il faut cependant noter qu'il existe une différence d'expression des N-cadhérines, présentes dans les parties postérieures mais non exprimées dans les parties antérieures** (Dady, Blavet et al. 2012; Lee, Nagai et al. 2013). Pour les parties troncales antérieures, on peut notamment citer les processus suivants :

- La répression directe de l'expression des Cadhérines-6b par Snail2 (Taneyhill, Coles et al. 2007) au profit des Cadhérines-7 (Nakagawa and Takeichi 1998) et Cadhérines-11 (la voie de signalisation Wnt/ β cat semble réguler de manière indirecte leurs expressions respectives (Chalpe, Prasad et al. 2010).
- La progression du cycle cellulaire : passage de la phase G1 à S induite par la voie de signalisation canonique Wnt et BMP (Burstyn-Cohen 2004).
- L'activation des protéines Rho GTPases par le Bmp4 qui va induire une modification du cytosquelette d'actine et des changements de contraction de l'actomyosine, nécessaires à la rupture des jonctions apicales et à l'acquisition de la motilité cellulaire (Liu and Jessell 1998).

Pour les parties troncales postérieures et caudales :

- Répression indirecte de l'expression des N-Cadhérines par FoxD3 (Cheung, Chaboissier et al. 2005)
- Le clivage de la partie extracellulaire de la N-Cadhérine par la métalloprotéase ADAM-10 (dont l'expression est elle-même ciblée par Bmp4).
- La progression du cycle cellulaire : passage de la phase G1 à S en partie induite par l'activation des cyclines-D1, elles-mêmes activées par les parties cytoplasmiques des N-cadhérines tronquées qui ont transloquées dans le noyau (Shoval, Ludwig et al. 2007).
- La stimulation de la synthèse de la laminine, protéine de la matrice extracellulaire (MEC) et de l'expression des intégrines $\beta 1$, récepteurs adhésif de la MEC, nécessaires à l'adhérence et aux processus migratoires (effet indirect de FoxD3) (Cheung, Chaboissier et al. 2005).

Ainsi, il existe des variabilités en fonction de l'axe antéro-postérieur mais également en fonction de l'espèce considérée notamment chez le xénope (variabilités qui ne seront pas détaillées ici). Cependant, malgré ces disparités, tous ces processus ont pour effet l'affaiblissement de l'adhérence intercellulaire, via le remplacement de Cadhérines formant de fortes interactions intercellulaires (N-Cadhérines) par des cadhérines formant des interactions plus faibles (Cadhérines-7 et 11) (Chu, Eder et al. 2006). Cet échange facilite la perte de la polarité apico-basal, les changements morphologiques des CCN pré-migratoires et l'acquisition de la motilité cellulaire permettant ainsi leur départ en migration collective et leur délamination du tube neural.

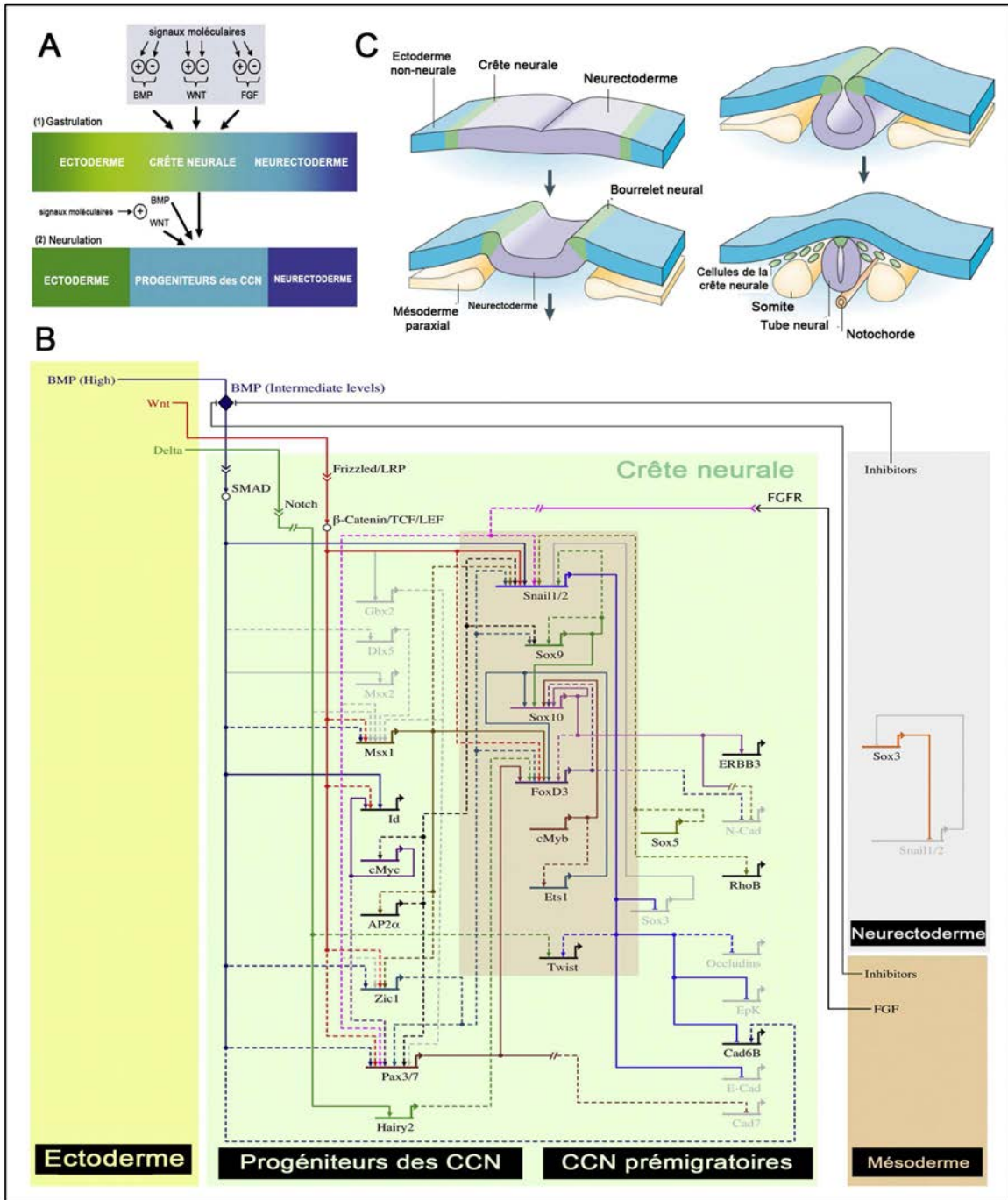


Figure 3 : Induction du territoire de la crête neurale et formation du tube neural

A, B- Au début de la gastrulation, les frontières séparant la crête neurale du neurectoderme (bleu foncé) et de l'ectoderme non-neurale (vert) se chevauchent (A). Sous l'induction de plusieurs signaux tels que le BMP, WNT et FGF (A, B) provenant à la fois de l'ectoderme, du neurectoderme et du mésoderme, les progéniteurs de CCN composant la crête neurale vont exprimer des facteurs de transcription tels que Pax, Msx-1/2, Zic-1, c-Myc et les bordures entre les différents territoires vont se définir plus nettement au moment de la neurulation (A, B).

B- Exemple de réseau d'interactions complexes entre plusieurs signaux régulateurs. Certains agissent de manière itérative pour la formation des progéniteurs des CCN et leur induction en CCN pré-migratoires.

C- Formation du tube neural (violet) durant la neurulation par le soulèvement des bourrelets neuronaux et leur fusion. La crête neurale (vert) se retrouve ainsi sur la partie dorsale du tube neural d'où les CCN vont partir en migration au travers de l'embryon. Adapté de (Gammill and Bronner-Fraser 2003; Milet and Monsoro-Burq 2012; Prasad, Sauka-Spengler et al. 2012).

Les CCN vont ainsi emprunter différentes voies de migration au travers de l'embryon afin de rejoindre leurs sites terminaux de différenciation, parfois très éloignés de leur point de départ. Le devenir des CCN dépend de leur position d'origine le long de l'axe antéropostérieur, de l'influence des signaux provenant de l'environnement qu'elles rencontrent au cours de leur trajet de migration mais également de leurs interactions avec les autres populations cellulaires présentes sur le site terminal de différenciation (Simoès-Costa and Bronner 2015). Ainsi, les CCN vont contribuer à la formation de différents tissus et organes (Fig. 4) (Bronner and LeDouarin 2012):

- Les **CCN crânielles**, qui sont les plus rostrales comme leur nom l'indique (proscéphale, mésencéphale, rhombencéphale et somites 1 à 4) sont à l'origine d'une partie des structures squelettiques et connectives de la face (dents et dentines, derme, cornée, squelette, cartilage et certains muscles) ainsi que les ganglions des nerfs crâniens.
- Les **CCN vagues** (somites 1-7) vont donner notamment les muscles lisses des vaisseaux, le septum cardiaque et le SNE.
- Les **CCN troncales** (somites 8-28 chez le poulet et 8-24 chez la souris) vont former les ganglions sympathiques du SNP, les ganglions de la racine dorsale et les glandes médullo-surrénales.
- Les **CCN sacrales** quant à elles, situées sur la partie la plus postérieure, vont contribuer en partie aux ganglions entériques.

De plus, toutes les CCN distribuées le long de l'axe antéropostérieur vont également donner des mélanocytes (Fig. 4). Les CCN ont donc la capacité de se différencier en de nombreux types cellulaires, très hétérogènes, tels que des **cellules pigmentaires**, des **cellules nerveuses** (les neurones, les cellules gliales, cellules satellites, cellules de Schwann), **des cellules mésenchymateuses** (cellules de l'os tels que les chondroblastes, chondrocytes, ostéoblastes, ostéocytes, les odontoblastes des dents mais également fibroblastes, des myoblastes striés et lisses et enfin des adipocytes) ainsi que des **cellules sécrétrices** (cellules chromaffines, parafolliculaires de la thyroïde, cellules productrices de calcitonine) (Simoès-Costa and Bronner 2015). Cette diversité de dérivés formés par les CCN reflète leur caractère de progéniteurs multipotents.

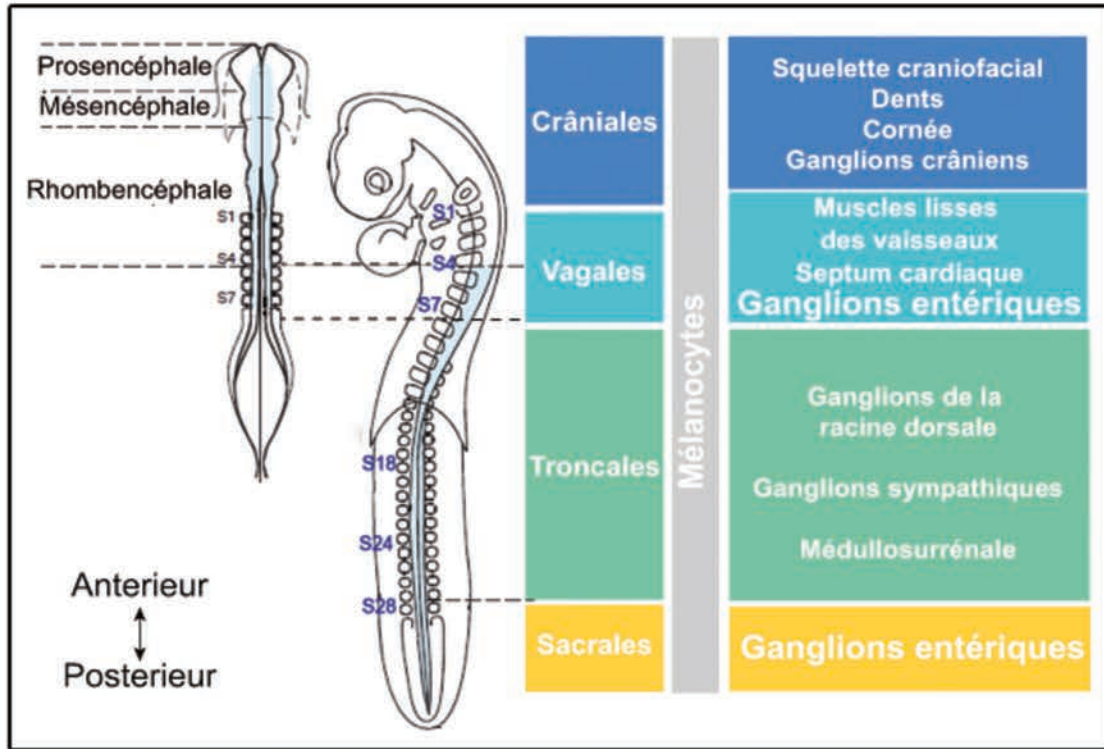


Figure 4: Les dérivés des cellules de la crête neurale

Schéma d'embryon de poulet illustrant les différents tissus et organes formés par les CCN en fonction de leurs origines selon l'axe antéro-postérieur du tube neural. S désigne le numéro des somites. L'illustration en haut à gauche schématise la partie la plus rostrale de l'axe, composée des parties céphaliques du tube neural d'où proviennent les CCN crâiales (Le Douarin 2004; Simoes-Costa and Bronner 2013).

En résumé, la crête neurale est une zone de maturation progressive des progéniteurs de CCN qui la composent. Au fur et à mesure que cette maturation se produit, les frontières de la crête neurale se dessinent de plus en plus nettement. Toutes les étapes dynamiques suivantes : l'induction de la crête neurale et la maturation des CCN, la TEM et départ en migration des CCN au travers de l'embryon, se font sous le contrôle spatio-temporel d'un réseau de gènes régulateurs dont certains acteurs moléculaires clés (morphogènes et facteurs de transcription) vont agir de **manière itérative** lors de ces différentes étapes. De plus, il faut noter que ces mécanismes peuvent également être régulés par des modifications post-transcriptionnelles et épigénétiques, qui ne sont pas détaillés ici. Enfin, les CCN sont des progéniteurs multipotents capables de se différencier en une large variété de types cellulaires. En fonction de leurs points de départ en migration, selon l'axe antéro-postérieur de l'embryon, et des signaux rencontrés le long de leurs voies de migration, les CCN vont former de nombreux dérivés. Les CCN représentent donc des acteurs majeurs de l'embryogénèse.

I - B - b : Le SNE provient des CCN vagues et sacrales

Le SNE est donc un dérivé de la crête neurale, contrairement au tractus digestif qu'il innerve. La première mise en évidence de cette origine a été faite par Yntema et Hammond en 1954 qui, après avoir effectué des ablations de la partie vagale du tube neural d'embryon de poulet, ont constaté l'absence de ganglions entériques sur toute la longueur du tube digestif (Yntema and Hammond 1954). En 1973, Le Douarin et Teillet ont confirmé cette origine vagale du SNE en utilisant la technique très connue de «greffe caille-poulet³» (Fig. 5A et B). Ainsi, en suivant le devenir des cellules de cailles au sein du tissu hôte de poulet, elles ont montré que les cellules provenant des greffes de la partie vagale du tube neural (somites 1 à 7) formaient la majorité des ganglions entériques sur toute la longueur du tube digestif. Elles ont également montré, pour la première fois, la contribution minoritaire d'une deuxième population de CCN, les CCN sacrales qui ne forment en revanche qu'une petite partie des ganglions du côlon (Fig. 5C) (Le Douarin and Teillet 1973).

Depuis ces premières découvertes, différentes techniques de biologie du développement ont permis de déterminer de manière précise les origines vagues et sacrales des ganglions entériques de chaque partie distincte du tube digestif. Ces techniques, qui se sont raffinées avec les avancées de la biologie moléculaire, consistaient tout d'abord soit à des ablations précises de différentes parties du tube neural et aux observations des phénotypes entériques résultants (Yntema and Hammond 1954; Peters-van der Sanden, Kirby et al. 1993) soit au suivi *in vivo* du devenir des CCN vagues. Ce suivi pouvait se faire grâce aux greffes caille-poulet, comme mentionnées précédemment (Le Douarin and Teillet 1973), grâce aux micro-injections dans les CCN d'un colorant fluorescent (DiI) (Pomeranz, Rothman et al. 1991; Serbedzija, Burgan et al. 1991; Durbec, Larsson-Blomberg et al. 1996) ou encore grâce aux micro-injections de rétrovirus comportant un rapporteur Lac-Z (Pomeranz, Rothman et al. 1991; Epstein, Mikawa et al. 1994). L'arrivée d'anticorps dirigés contre les cellules de caille (QCPN) (Fig. 5D) ou reconnaissant les cellules de crête (NC-1 et HNK-1) (Tucker, Aoyama et al. 1984; Vincent and Thiery 1984) et la possibilité de réaliser des doubles marquages ont permis notamment de confirmer des observations sujettes à

³ La greffe caille-poulet : Consiste au remplacement de parties du tube neural d'embryon de poulet, suivant l'axe antéropostérieur, par la partie équivalente provenant d'un tube neural d'embryon de caille au même stade embryonnaire. Cette technique permet de suivre le devenir des cellules greffées car ces dernières présentent une structure nucléaire distincte de celle des cellules hôtes de poulet.

controverse, telle que la contribution des CCN sacrales à la formation du SNE. Cette controverse sera abordée dans la partie « contribution des CCN sacrales ».

Contribution des CCN vagues :

L'anatomie de l'intestin embryonnaire comprend trois régions successives, (1) le *foregut*, (2) le *midgut* et (3) le *hindgut* séparés par le cæcum. Ces trois structures primaires donneront respectivement l'œsophage, l'estomac (qui correspond au proventricule et au gésier chez les espèces aviaires) et le duodénum (1), l'intestin grêle et le gros intestin (2), et enfin le côlon et le rectum (3). Chez l'embryon de poulet, les CCN vagues provenant des somites 1 et 2 contribuent majoritairement aux ganglions du *foregut*, celles provenant des somites 3 à 6 forment en revanche la majorité des ganglions entériques de toute la longueur du tube digestif. Enfin, les CCN vagues des somites 6 et 7 contribuent quant à elles à une partie des ganglions du *hindgut* (Fig. 5C) (Epstein, Mikawa et al. 1994).

Chez la souris, ce sont les CCN vagues provenant des somites 6-7 qui contribuent à la formation d'une partie des ganglions du *foregut* et celles provenant des somites 1 à 4 qui contribuent à l'ensemble des ganglions du tractus digestif (Fig. 5E) (Durbec, Larsson-Blomberg et al. 1996).

Contribution des CCN sacrales :

Bien que mise en évidence pour la première fois par Le Douarin et Teillet, **l'origine sacrale des précurseurs entériques et l'importance de leur contribution au SNE ont longtemps été sujets à controverse**. Comme mentionné précédemment, Le Douarin et Teillet avaient montré qu'une partie des ganglions entériques du côlon provenaient de cellules de cailles greffées dans la partie lombo-sacrale du tube neural (Le Douarin and Teillet 1973). Cependant, suite à l'ablation de la totalité de la partie vagale de la crête neurale, l'absence de SNE dans le *hindgut* d'embryon de poulet, constatée par Yntema et Hammond, a longtemps laissé penser que les CCN vagues représentaient la seule source de précurseurs entériques. Une des hypothèses pour expliquer l'absence de ganglions entériques dans le côlon, malgré la non-ablation de la partie sacrale du tube neural, était qu'au moment des observations des marquages histologiques de *hindgut* (i.e après 7 à 10 jours de culture suivant l'ablation vagale) les ganglions n'étaient pas encore visibles car non différenciés (Yntema and Hammond 1954; Le Douarin and Teillet 1973).

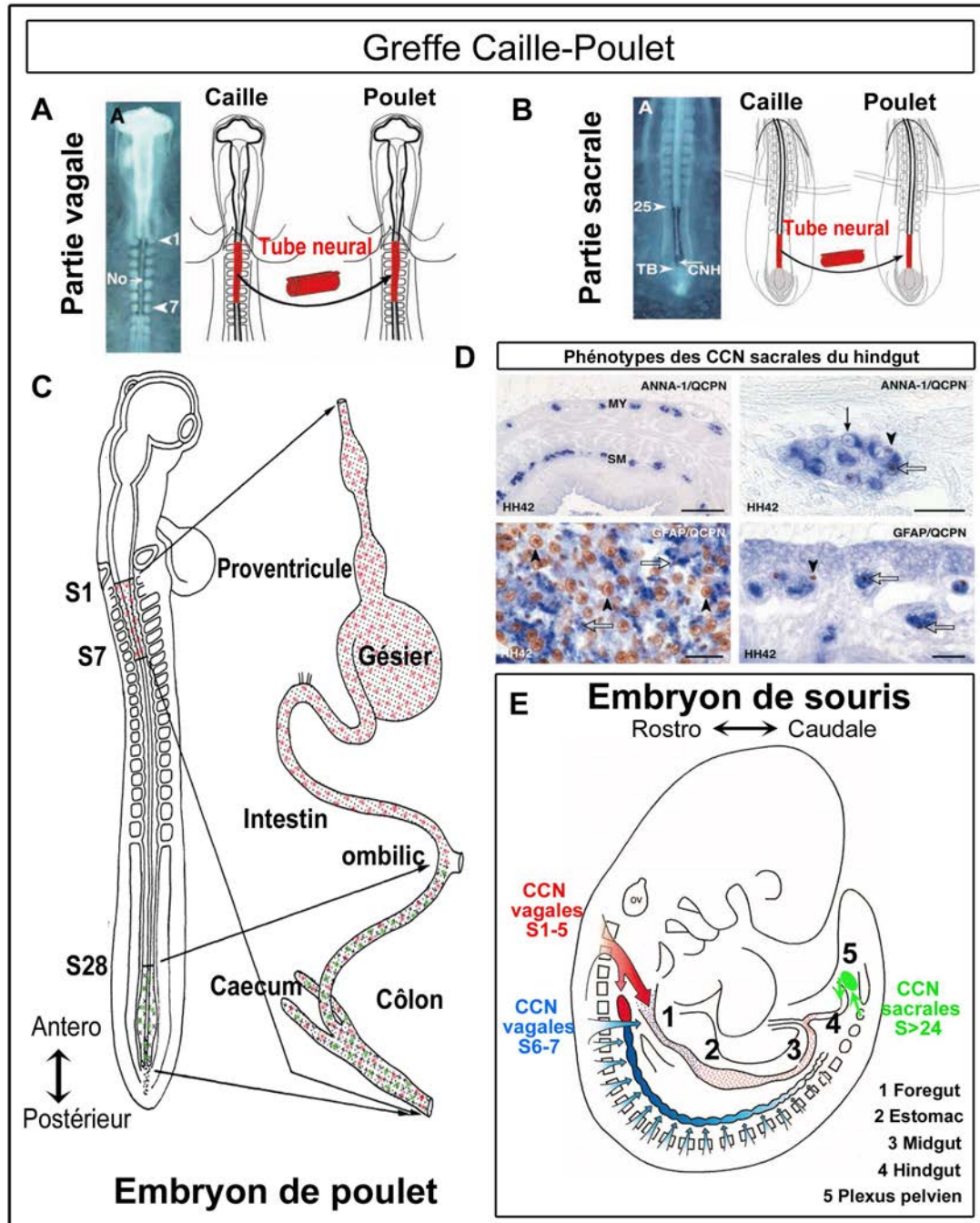


Figure 5 : Contribution des CCN vagales et sacrales à la formation du SNE

A,B- Schémas illustrant la technique de greffe caille-poulet. Elle consiste en l'échange de la partie vagale ou de la partie sacrale du tube neural de poulet par la partie équivalente provenant d'une caille au même stade embryonnaire (Burns and Le Douarin 1998). **C**- Le suivi du devenir des cellules de cailles greffées (visibles grâce à la structure de leur noyau, différente de celle des cellules hôtes de poulet) a permis de mettre en évidence la contribution majeure des CCN vagales à la formation du SNE, alors que les CCN sacrales ne forment qu'une minorité des ganglions du côlon (Le Douarin and Teillet 1973). **D**- Analyses phénotypiques des CCN sacrales contenues dans le *hindgut* de poulet au stade HH42 après une greffe. Double marquage avec des marqueurs des cellules de caille (QCPN, marron) et de neurones (ANNA-1, bleu panneaux du haut) ou de cellules gliales (GFAP, bleu, panneaux du bas), échelles : 100µm (panneaux de gauche) et 20 µm (panneaux de droite) (Burns and Le Douarin 1998). **E**- Chez l'embryon de souris, les CCN vagales provenant des somites 1 à 5 (rouge) forment la majorité du SNE le long de l'intestin, les CCN vagales provenant des somites 6 et 7 (bleu) donnent

une partie des ganglions du *foregut* et les CCN sacrales (vert) une partie des ganglions du côlon distal (Barlow, Wallace et al. 2008).

Ainsi pour trancher, Allan *et al* en 1980, ont tenté de comparer la séquence d'arrivée des précurseurs entériques dans l'intestin à la séquence d'apparition des neuroblastes. Il faut cependant noter qu'à cette époque, aucun marqueur immunologique des précurseurs entériques n'était disponible. Ils ont donc procédé en deux temps pour adresser cette question : (1) par des observations de coupes histologiques précises d'intestins d'embryons de poulet, ils ont déterminé la position et le moment d'apparition des ganglions en fonction du stade embryonnaire puis, (2) ils ont transplanté dans la membrane chorioallantoïque, à tous les stades embryonnaires entre HH24 et HH35⁴, des explants supposés contenir les précurseurs, soit ceux situés juste en aval (i.e au niveau caudal) du front de colonisation des neuroblastes. Enfin, après une mise en culture suffisamment longue (i.e 7 à 10 jours) pour laisser le temps aux précurseurs de se différencier, les marquages des neurones adrénergiques de ces explants ont été analysés. Ils n'ont cependant observé aucun marquage neuronal dans ces explants de *hindgut* distaux, aux stades HH29 et HH30, soit ceux supposés contenir les précurseurs entériques provenant des CCN sacrales. Allan *et al* concluent donc que les CCN sacrales ne participent pas à la formation du SNE. Ils proposent comme hypothèse pour expliquer cette différence de résultats entre Yntema et Le Douarin, que les cellules de caille greffées seraient potentiellement plus invasives que celles du poulet et envahiraient donc le *hindgut* contrairement aux cellules hôtes ou bien alors que la différenciation des CCN sacrales requiert la présence des CCN vagues (Allan and Newgreen 1980).

Alors qu'en 1991, deux articles rapportent pourtant la présence dans le *hindgut* distal de cellules Dil positives ou la présence de cellules co-marquées par NC-1 et β -galactosidase après micro-injection des CCN sacrales par le colorant ou le rétrovirus Lac-Z rapporteur, il faut attendre 1998 pour que la controverse soit définitivement enterrée avec l'article de Burn et Le Douarin (Payette, Tennyson et al. 1988; Pomeranz, Rothman et al. 1991; Burns and Le Douarin 1998). Ces derniers, dans leur très élégante étude, utilisent de nouveau la technique de greffe caille-poulet couplée à l'utilisation d'anticorps spécifiques pour les cellules de cailles (QPCN), de neurones (ANNA-1) et de cellules gliales (GFAP) (Fig. 5D). Ils montrent ainsi que les CCN sacrales émigrent du tube neural au stade embryonnaire E4.5

⁴HH : désigne les stades embryonnaires décrits chez le poulet par Hamburger et Hamilton

pour former tout d'abord le plexus pelvien et le nerf de Remak⁵, où elles vont rester pendant environ 3 jours avant de poursuivre leur migration dans le *hindgut*. Cette migration se fait de manière caudo-rostrale, à partir de E7.5, au moment de l'arrivée des CCN vagues (Burns and Le Douarin 1998). Enfin, ils montrent que les CCN sacrales entériques se différencient en neurones et cellules gliales mais qu'elles ne forment qu'une petite fraction (17%) des neurones de la partie la plus distale du *hindgut*. Cette contribution varie peu avec l'ablation de la partie vagale du tube neural, signifiant que la colonisation caudo-rostrale des CCN sacrales est indépendante de l'arrivée préalable des CCN vagues (Burns and Le Douarin 1998). Ce fait sera validé quelques temps après par la publication d'Hearn *et al*, qui montrent, par l'utilisation d'explants de tube neural sacral greffés à des explants de *hindguts* dépourvus de ganglions, que les CCN sacrales sont capables de coloniser les explants sans la présence de CCN vagues (Burns and Le Douarin 1998; Hearn and Newgreen 2000). En revanche, peu d'informations étaient disponibles concernant la contribution des CCN sacrales au SNE chez le modèle murin. Les expériences de micro-injection de Dil chez l'embryon de souris suggéraient que ce soit bien le cas (Serbedzija, Burgan et al. 1991). L'utilisation de souris transgéniques *Wnt-lacZ* a montré également que, tout comme chez le poulet, les CCN sacrales forment dans un premier temps le plexus pelvien de chaque côté du *hindgut* (aux alentours des stades embryonnaires E10/E11), mais qu'elles n'envahissent pas le *hindgut* avant le stade E14.5 (Kapur 2000). Ces données ont été validées récemment par Wang *et al*, qui montrent qu'elles débutent en réalité leur entrée dans le *hindgut* distal à E13.5 par les fibres nerveuses extrinsèques provenant du plexus pelvien (Fig. 6C). Ils confirment également que chez la souris cette colonisation est indépendante de la présence des CCN vagues et qu'elle se fait bien de manière caudo-rostrale, soit en sens inverse de la colonisation des CCN vagues (Druckenbrod and Epstein 2005; Wang, Chan et al. 2011).

I - C : Le développement du SNE

I - C - a : Les aspects spatio-temporels de la colonisation intestinale par les CCNEs

Une fois qu'elles ont pénétré l'intestin, les CCN vagues et sacrales sont dénommées CCN entériques (CCNEs). Les CCNEs vont coloniser la totalité de la longueur du tube digestif en une seule vague rostro-caudale (Fig. A et D) (Young, Hearn et al. 1998). Chez la souris,

⁵ Le nerf de Remak est une structure spécifique de l'espèce aviaire. Elle est formée d'une chaîne de ganglions, située dans le mésentère adjacent au côlon distal.

à E8.5 les CCN vagues délaminent du tube neural et migrent dorso-ventralement dans le mésoderme paraxial avant de débiter la colonisation du *foregut* à E9.5 (Kapur, Yost et al. 1992; Durbec, Larsson-Blomberg et al. 1996). À ce stade embryonnaire, le *foregut* possède une anatomie relativement linéaire, mais il faut cependant noter qu'au fur et à mesure de sa colonisation, l'intestin embryonnaire va également poursuivre son programme de croissance. Il va ainsi subir des changements morphologiques considérables, tels que l'apparition des circonvolutions du petit intestin, le bourgeonnement du cæcum (partie séparant le *midgut* du *hindgut*) ainsi que l'allongement et l'épaississement du côlon (Fig. 6 D). À E10.5, les CCNEs sont à la moitié du *midgut*. Une partie alors des CCNEs vont continuer leur migration au sein de l'intestin pour atteindre la base du cæcum à E11.5 (Fig. 6 A et D), où elles vont marquer une pause de plusieurs heures (Druckenbrod and Epstein 2005) avant de le coloniser et de se retrouver dans le *hindgut* proximal à E12.5 (Fig. 6 A et D) (Kapur, Yost et al. 1992; Young, Hearn et al. 1998). Une autre partie des CCNEs vont quant à elles court-circuiter le cæcum et passer directement dans le *hindgut* en empruntant la voie dite « transmésentérique » entre E10.5 et 11.5 (Fig. 6B). Cette migration transmésentérique est rendue possible par la forme en épingle à cheveux de l'intestin (Fig. 6A) (Druckenbrod and Epstein 2005; Nishiyama, Uesaka et al. 2012). Le *midgut* et le *hindgut* sont accolés parallèlement, et seulement séparés par une fine couche de mésentère, qu'une partie des CCNEs dites « transmésentériques » vont pouvoir traverser, avant de s'accumuler dans le *hindgut* proximal (Fig. 6A,B et D) (Nishiyama, Uesaka et al. 2012). Vers E12.5 les deux populations se rejoignent, seulement ce sont les CCNEs transmésentériques qui vont majoritairement coloniser le *hindgut* distal jusqu'au stade E14.5 (Fig. 6D) (Nishiyama, Uesaka et al. 2012). Par ailleurs, ces deux populations sont rejointes par les CCNE sacrales entre E13.5 et E14.5, qui migrent quant à elle caudo-rostralement (Fig. 6C et D) (Burns and Le Douarin 1998; Kapur 2000; Druckenbrod and Epstein 2005; Wang, Chan et al. 2011).

La colonisation de l'intestin embryonnaire chez la souris se fait donc entre les stades E9.5 et E14.5, soit un processus long de 5 jours. On peut noter que la colonisation du futur côlon est la période la plus longue (3 jours pour le *hindgut* et 2 jours pour le *midgut*) (Kapur, Yost et al. 1992). Chez le poulet la colonisation dure environ 4 jours et se fait entre les stades HH22 (E4.5) et HH32 (E8.5) (Fairman, Clagett-Dame et al. 1995), enfin chez l'Homme, il faut quasiment 4 semaines pour que l'intestin soit entièrement colonisé (Fu, Tam et al. 2004).

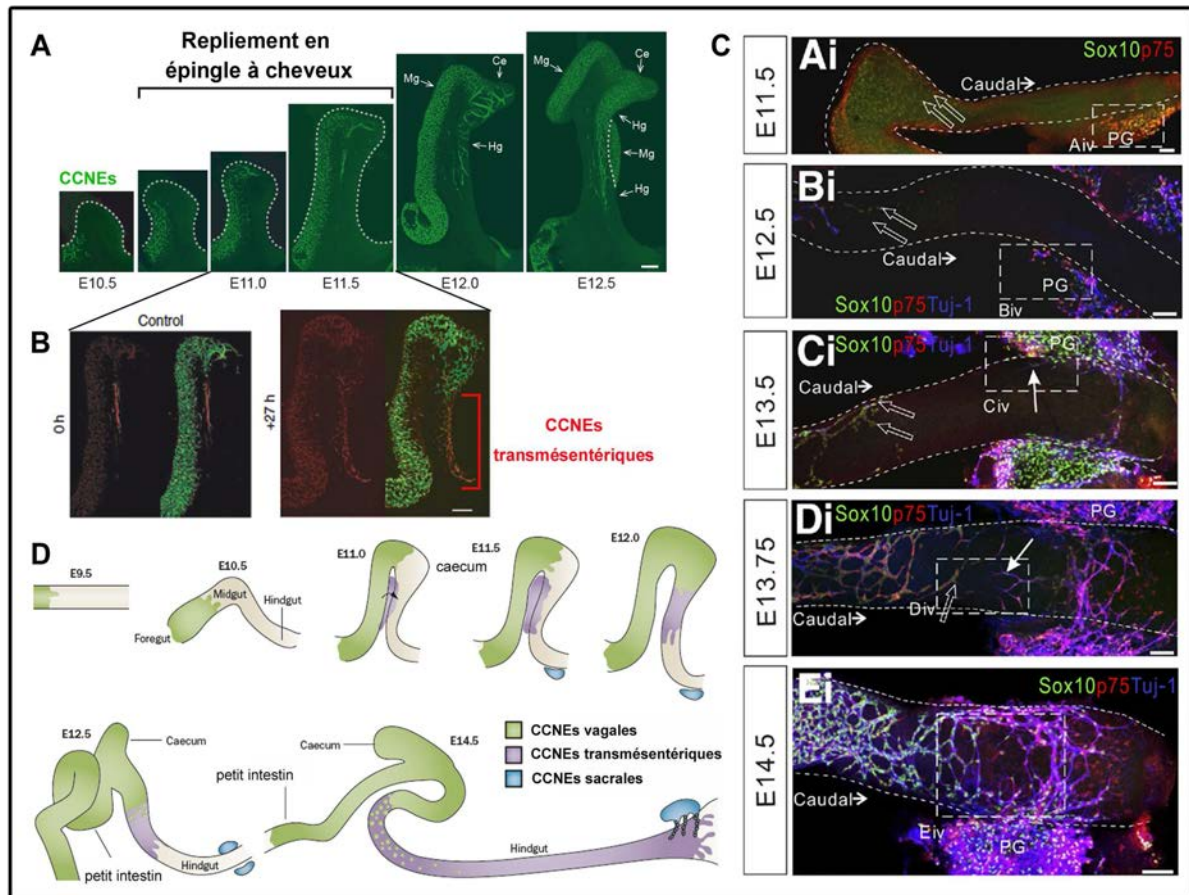


Figure 6 : Colonisation de l'intestin embryonnaire par les CCNEs

A- Séquence de développement de l'intestin embryonnaire de souris et de sa colonisation par les CCNE vagues (vert). La conformation en épingle à cheveux est nettement visible entre E10.5 et E11.5. Images confocales d'intestin de souris *Ret*^{+/*EGFP*} marqués en wholemount. Chez cette lignée de souris transgénique, les CCNEs sont GFP⁺ car la GFP est placée sous le contrôle du promoteur du gène *Ret*, spécifiquement exprimé par les CCNEs en migration. Mg= *midgut*; Hg= *hindgut*; Ce= *cæcum*; échelle: 200 µm. **B**- Visualisation des CCNEs transmésentériques (rouge) colonisant le *hindgut*, **A,B**- (Nishiyama, Uesaka et al. 2012) **C**- Migration des CCN sacrales *in vivo* entre E11.5 et E14.5. Images confocales d'intestin embryonnaire de souris marqué en wholemount. Les CCN sont Sox10⁺/ P75⁺. Les CCN vagues sont indiquées par les flèches blanches vides, on aperçoit leur avancée rostro-caudale. Les CCN sacrales s'accumulent dans un premier temps dans le plexus pelvien (PG) à E11.5/E12.5 (encadré pointillé Aiv et Biv) et pénètrent dans le *hindgut* à E13.5 (encadré pointillé Civ), les CCN sacrales sont indiquées par les flèches blanches pleines), TuJ1 (bleu) désigne le marquage des neurofilaments sur lesquels les CCN sacrales migrent pour pénétrer dans le *hindgut* (encadré pointillé Div). Les CCN sacrales migrent caudo-rostralement pour rejoindre les CCN vagues à E14.5 (encadré pointillé Eiv) (Wang, Chan et al. 2011). **D**- Schémas récapitulants les séquences spatio-temporelle de colonisation de l'intestin embryonnaire par les CCNE vagues, transmésentériques et sacrales (Obermayr, Hotta et al. 2013).

I - C - b : Formation de l'intestin embryonnaire

Comme mentionné précédemment, le tractus digestif adulte comprend plusieurs parties anatomiques distinctes dont les fonctions physiologiques et les structures histologiques varient. Selon l'axe rostro-caudal se succèdent ainsi : l'œsophage et l'estomac (*foregut*), l'intestin grêle (provenant du *midgut* et lui-même divisé en duodénum, jujénum et

ileum), le cæcum (ou jonction iléo-caecale, présent chez les espèces murines et aviaires) et le côlon (provenant du *hindgut*) (Heath 2010). L'intestin mature comprend également 4 couches de tissus concentriques (brièvement décrites dans le paragraphe § I - A). La première couche, la plus interne, est la muqueuse intestinale. Elle comprend l'épithélium intestinal, dérivé de l'endoderme, associé à la lamina propria elle-même en contact avec la *muscularis mucosae* (formée de cellules musculaires lisses). Ces deux dernières structures proviennent du mésoderme. La deuxième couche est la sous-muqueuse, formée d'un tissu mésenchymateux (dérivé du mésoderme) et riche en collagène, connectant la muqueuse aux couches musculaires lisses plus externes. Cette couche musculaire externe, est la troisième couche de l'intestin, dérivée elle aussi du mésoderme et comprenant les muscles lisses circulaires surmontés des muscles longitudinaux. Enfin, la dernière couche entourant tout l'intestin est composée d'un épithélium externe, la séreuse (Heath 2010).

Au moment de la colonisation des CCNEs, cette organisation longitudinale et radiale du tractus digestif n'est pas encore mise en place. En effet, à l'invasion du *foregut* à E9.5 chez la souris, le tube primitif qu'est l'intestin embryonnaire est tout juste formé et seulement composé de la couche épithéliale intérieure, d'une couche mésenchymateuse relativement uniforme et recouvert par la séreuse (Heath 2010). D'une longueur relativement courte au début de sa croissance, l'intestin va cependant s'allonger de manière conséquente au cours du développement, comme illustré chez le poulet en Fig. 7A. Les CCNEs migrent dans la partie externe de la couche mésenchymateuse, non encore différenciée en cellules de muscles lisses. Cependant, l'élongation longitudinale et la croissance radiale de l'intestin ne sont pas uniformes dans le temps (Fig. 7A et B). Il a été montré chez le poulet notamment, que l'élongation du *midgut* est relativement faible au moment de la migration des CCNEs, mais s'accroît fortement entre E5/E6 (HH26) et E9/E10 (HH35) lorsque ces dernières envahissent le cæcum et le *hindgut* (Fig. 7A, B graph de gauche et C) (Newgreen, Southwell et al. 1996). A contrario, les CCNEs envahissant le cæcum et le futur côlon doivent faire face à une poussée de croissance radiale de ces régions dont le diamètre augmente fortement (Fig. 7B, graph de droite) (Newgreen, Southwell et al. 1996).

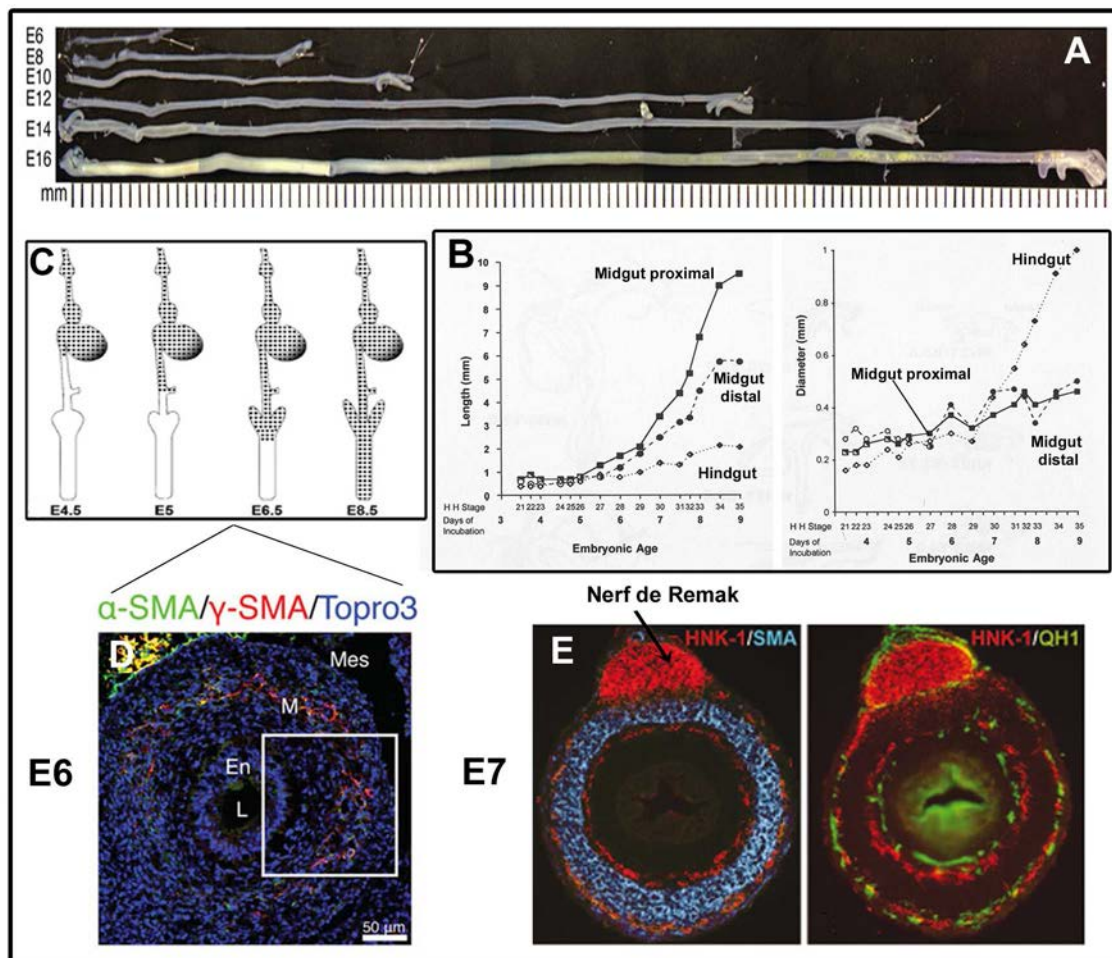


Figure 7 : Le développement de l'intestin embryonnaire et sa colonisation par les CCNEs

A- Entre E6 et E16, le *midgut* d'embryon de poulet s'allonge fortement (Thomason, Bader et al. 2012). B- Graphs représentant l'élongation longitudinale (gauche) et radiale (droite) des différentes parties anatomiques de l'intestin embryonnaire (*midgut* proximal, *midgut* distal et *hindgut*) entre E3 et E9 (Newgreen, Southwell et al. 1996). La croissance n'est pas homogène. C- Schémas récapitulant l'étendue de la colonisation des CCNEs en fonction du stade embryonnaire (Goldstein and Nagy 2008). Le *midgut* s'allonge fortement une fois colonisé par les CCNEs mais ces dernières doivent faire face à une forte poussée radiale du *hindgut* au moment où elles l'envahissent (B,C). D- Immunofluorescences de coupes congelées de *midgut* à E6. La différenciation des cellules mésenchymateuses en muscle lisse intestinal est à peine visible, comme indiqué par les faibles marquages α -SMA (α -smooth muscle actin, vert) et γ -SMA (γ -smooth muscle actin, rouge) de la couche musculaire circulaire. Les noyaux sont marqués par le Topro3 (bleu). L : lumen ; En : endothélium ; M : mésenchyme ; MES : mésendothélium (Thomason, Bader et al. 2012). E- Immunofluorescences de coupes congelées de *hindgut* de poulet à E7. Les CCNEs (HNK-1⁺ /QH1⁺, rouge et vert respectivement) migrent sur la partie externe de la couche de muscle lisse circulaire (SMA, bleu) en différenciation ; le cercle le plus interne de CCNEs est le plexus sous-muqueux qui se met en place (E) (Goldstein and Nagy 2008).

De plus, la différenciation des cellules mésenchymateuses en muscles lisses semble démarrer vers E6 chez le poulet, lorsque les CCNEs colonisent le *hindgut* (Fig 7C,D et E) (Thomason, Bader et al. 2012). Chez la souris également, l'intestin s'allonge et s'épaissit entre E9.5 et E13.5. L'élongation du *midgut* chez la souris se fait sous le contrôle de Wnt5a,

exprimé dans le mésenchyme intestinal. Ce dernier contrôle la prolifération des cellules mésenchymateuses, la prolifération des cellules de l'épithélium et la ré-intercalation de ces dernières dans la monocouche épithéliale, permettant ainsi l'allongement du tissu (Cervantes, Yamaguchi et al. 2009). En plus de cette voie de signalisation, l'activation de la voie Fgf (exprimé par le mésenchyme)/Fgfr2b (récepteur exprimé par l'épithélium) est essentielle à l'élongation du cæcum (Burns, Fairbanks et al. 2004). Cette élongation a par ailleurs lieu entre E11.5 et E13.5 chez la souris, soit au moment de la colonisation des CCNEs (Burns, Fairbanks et al. 2004). Ainsi, la croissance de l'intestin, sa différenciation radiale et la progression des CCNEs sont en partie concomitantes.

Ces deux derniers exemples illustrent **les interactions bi-directionnelles entre le mésenchyme et l'épithélium** qui contrôlent la morphogénèse de l'intestin embryonnaire et qui représentent le mécanisme clé **du patron ou « patterning » longitudinal et radial** (Roberts 2000). Les gènes de la famille **ParaHox et Hox** font partie des acteurs moléculaires du **patterning longitudinal** de l'intestin, c'est à dire ceux contrôlant l'acquisition de l'identité anatomique de chaque partie de l'intestin comme par exemple, le gène *Cdx2*, de la famille des gènes *ParaHox* (Heath 2010). Son expression est visible dès E8.5 et précède celle des gènes *Hox*. De plus, à E12.5 son expression marque la frontière entre le *foregut* et le reste de l'intestin où il est fortement exprimé, en particulier à la jonction iléo-caecale (Silberg, Swain et al. 2000). *Cdx2* est indispensable au maintien de l'identité de l'épithélium du *midgut*, à la spécification du *hindgut* et influence l'expression d'autres gènes du programme de différenciation (Gao, White et al. 2009; Grainger, Savory et al. 2010). De même, toute une combinaison de gènes *Hox* est exprimée de manière différentielle par l'intestin suivant l'axe rostro-caudal (Sekimoto, Yoshinobu et al. 1998) et semble indispensable à la formation du cæcum notamment (Zacchetti, Duboule et al. 2007). Les morphogènes **BMPs** (BMP-4, -2 et -7), exprimés par le mésenchyme, participent également à la régionalisation antéro-postérieure de l'intestin primitif en *foregut*, *midgut* et *hindgut* (De Santa Barbara, Williams et al. 2005)

Les protéines de la famille Hedgehog, **SHH** (*sonic hedgehog*) et **IHH** (*indian hedgehog homologue*) sécrétées par l'épithélium intestinal jouent un rôle primordial dans **la différenciation radiale du mésenchyme intestinal embryonnaire**, qui exprime le récepteur Patched (Roberts, Smith et al. 1998; Ramalho-Santos, Melton et al. 2000; Kolterud, Grosse et al. 2009). Leurs expressions respectives se chevauchent mais les gradients de concentration

sont opposés, SHH étant fortement exprimée de l'estomac jusqu'au *midgut* alors qu' IHH est plus fortement exprimée de l'anus vers le *hindgut* (Ramalho-Santos, Melton et al. 2000; Kolterud, Grosse et al. 2009). Chez la souris, ces deux morphogènes sont important pour le développement des couches musculaires longitudinales et circulaires, puisque chez les mutants *Shh*^{-/-} et *Ihh*^{-/-} ces couches sont fortement amincies (Ramalho-Santos, Melton et al. 2000). En revanche chez le poulet (à l'exception de l'estomac), SHH inhibe la différenciation musculaire du mésenchyme adjacent à l'épithélium via l'activation de l'expression du BMP4 dans cette couche. Cette inhibition favorise la formation de la lamina propria et de la sous-muqueuse (Roberts, Smith et al. 1998; Sukegawa, Narita et al. 2000).

De manière intéressante, SHH peut également impacter la colonisation des CCNEs et les souris mutantes pour *Ihh* présentent des défauts de développement du SNE (Ramalho-Santos, Melton et al. 2000; Sukegawa, Narita et al. 2000). Il semblerait que le BMP4 et le BMP2 soient également impliqués dans le développement du SNE (Chalazonitis 2004; De Santa Barbara, Williams et al. 2005; Goldstein, Brewer et al. 2005). Leurs rôles respectifs concernant le développement du SNE seront abordés dans le chapitre § II-C-b, paragraphe Les morphogènes.

Ainsi, les différents acteurs moléculaires clés du *patterning* et de la différenciation radiale de l'intestin peuvent influencer le développement du SNE, mais l'inverse est également vrai. En effet, très récemment et pour la toute première fois, il a été montré chez le poulet que la formation des muscles lisses de l'estomac est également régulée par les CCNEs (Faure, McKey et al. 2015). Ces dernières induisent la prolifération des cellules mésenchymateuse indifférenciées de l'estomac et permettent le maintien de l'identité « estomac » de l'épithélium, via l'inhibition de la voie Notch (Faure, McKey et al. 2015).

I - C - c : Les aspects dynamiques de la migration des CCNEs

Les aspects dynamiques des comportements migratoires individuels et collectifs des CCNEs ont pu être analysés plus en détail, grâce en particulier à l'imagerie *time-lapse*. Les cultures *ex-vivo* d'intestins entiers, provenant de souris transgéniques ont permis de visualiser la migration en temps réel des CCNEs au sein de leur tissu physiologique grâce à l'expression spécifique des protéines fluorescentes par ces dernières (Fig. 8A). La vitesse et la directionnalité de migration des CCNEs au front ont ainsi pu être mesurées.

Les premières études, utilisaient soit des lignées de souris *Ret*^{TGM/+} (TGM= tau-EGFP-myc), chez qui l'expression de la GFP est placée sous le contrôle du gène *Ret*, exprimé par les CCNEs tout au long de leur colonisation (Fig. 8A) (Young, Bergner et al. 2004), soit des lignées *Wnt1-Cre ;YFP-R26R*, chez qui les CCN expriment de manière constitutive la YFP après defloxxage par la Cre recombinase (Druckenbrod and Epstein 2005). Leurs observations confirment ce qui avait déjà été montré sur des échantillons fixés, à savoir que **les CCNEs au front de migration forment des chaînes**, en contact les unes avec les autres mais ne migrent pas vraiment de manière individualisée (Conner, Focke et al. 2003). Elles ont permis de démontrer que le comportement dynamique de ces chaînes est complexe, elles sont labiles et en constant cycle d'association/dissociation. Ceci est dû au fait que les CCNEs qui les composent ne forment que des contacts transitoires mais répétés les unes avec les autres. Cette migration en chaîne suppose donc que l'adhérence cellule-cellule joue un rôle primordial (Young, Bergner et al. 2004; Druckenbrod and Epstein 2005). Ces chaînes sont observées dans les parties linéaires de l'intestin, le *midgut* à E10.5 et le *hindgut* à E12.5. Les vitesses d'avancées du front de migration sont respectivement 35-45 $\mu\text{m}/\text{h}$ dans le *midgut* et 30 $\mu\text{m}/\text{h}$ dans le *hindgut* (Young, Bergner et al. 2004; Druckenbrod and Epstein 2005). Les auteurs respectifs confirment également que la migration caudo-rostrale des CCNE sacrales dans le *hindgut*, ne se produit pas avant l'arrivée des CCNEs d'origine vagale (Young, Bergner et al. 2004; Druckenbrod and Epstein 2005).

Au niveau de la jonction iléo-caecale, une partie des CCNEs formant les chaînes se détachent et migrent dans le cæcum de manière isolée, en le colonisant dans un premier temps par les bordures extérieures (Fig. 8C). Au fur et à mesure de leur avancée, les CCNEs isolées se regroupent en petits agrégats, agrégats qui vont par la suite se connecter les uns aux autres par la formation de nouvelles chaînes de CCNEs (Fig. 8C) (Druckenbrod and Epstein 2005). Les auteurs émettent l'hypothèse que ce comportement pourrait être dû à un environnement particulier du cæcum (Druckenbrod and Epstein 2005).

La même équipe en 2007, pour expliquer le mécanisme d'avancement des chaînes, a filmé le front de migration provenant de *midgut* d'embryons de poulet préalablement électroporés avec de la GFP. Ils ont remarqué que les CCNEs contribuant à l'avancée des chaînes se situaient dans les premiers 300 μm du front de colonisation et proposent le modèle simplifié suivant, comportant trois types définis de CCNEs (Fig. 8D). En aval du front de migration, explorant les parties non colonisées, se trouvent les cellules isolées (1) dites

« pionnières », non reliées aux chaînes. Situées en bout de chaîne se trouvent les cellules « distales » (2), elles-mêmes reliées au reste de la chaîne et du réseau par les cellules dites « rostrales » (3). La chaîne avance, soit lorsque une cellule pionnière (1) s'ajoute en bout de chaîne, soit lorsqu'une cellule distale (2) libère l'espace derrière elle en s'avancant vers la pionnière (1), espace qui sera occupé par une cellule rostrale (3) s'intercalant entre la chaîne et la cellule distale qui a légèrement avancé (Fig. 8D) (Druckenbrod and Epstein 2007).

Néanmoins, si ce modèle a le mérite d'expliquer en partie l'avancée des chaînes, il ne tient pas compte d'un phénomène pourtant observé dans toutes les études dynamiques décrites jusqu'ici : **le comportement erratique d'une grande majorité des CCNEs**, y compris au front de migration et dans les chaînes. Certaines CCNEs changent de vitesse et de directionnalité (certaines ont été observées remontant les chaînes caudo-rostralement) ou s'isolent parfois du reste de la chaîne durant plusieurs heures, et ce, de manière totalement aléatoire (Young, Bergner et al. 2004; Druckenbrod and Epstein 2005; Druckenbrod and Epstein 2007; Young, Bergner et al. 2014).

Une analyse récente et plus poussée du comportement individuel de CCNEs a très bien décrit ce phénomène, grâce à une lignée de souris chez qui les CCNEs expriment une protéine photoconvertible (KikGR) (Fig. 8B). Cette protéine, une fois excitée à une certaine longueur d'onde, va changer de longueur d'émission et pourra être visualisée dans une autre couleur. Ainsi, les CCNEs photoexcitées sont visibles en rouge et facilement analysable du reste de la population de CCNEs émettant dans le vert (Fig. 8B) (Young, Bergner et al. 2014). Chez la souris, les CCNEs pionnières au front de migration, telles que décrites chez le poulet, ne sont pas détectées. Les auteurs rapportent plutôt la présence de CCNEs solitaires, qui ne migrent pas de manière caudale. En moyenne, ces cellules isolées migrent moins vite que les CCNEs associées en chaînes. Ces dernières, malgré la variabilité dans leurs comportements individuels, tendent à migrer en direction caudale (Fig. 8E) (Young, Bergner et al. 2014). Chez la souris, ce sont donc les CCNEs formant les chaînes qui envahissent les régions caudales vierges. Mais de manière surprenante, ce ne sont pas les CCNEs des chaînes qui ont un taux d'avancement caudal le plus élevé mais les CCNEs situées juste en arrière, entre 300 μm et 450 μm du front de migration (Fig. 8E). Les auteurs proposent ainsi un mode d'avancée en « saute-mouton », les CCNEs de cette zone passant devant le front de migration pour en former un nouveau et ainsi de suite (Fig. 8C et E) (Young, Bergner et al. 2014).

Les CCNEs les plus en arrière du front de migration continuent en revanche à migrer à la même vitesse, mais de manière non directionnelle et plutôt circonférentielle et colonisent ainsi les espaces non peuplés et ce durant presque 24h après le passage du front de migration (Fig. 8E) (Druckenbrod and Epstein 2007; Young, Bergner et al. 2014).

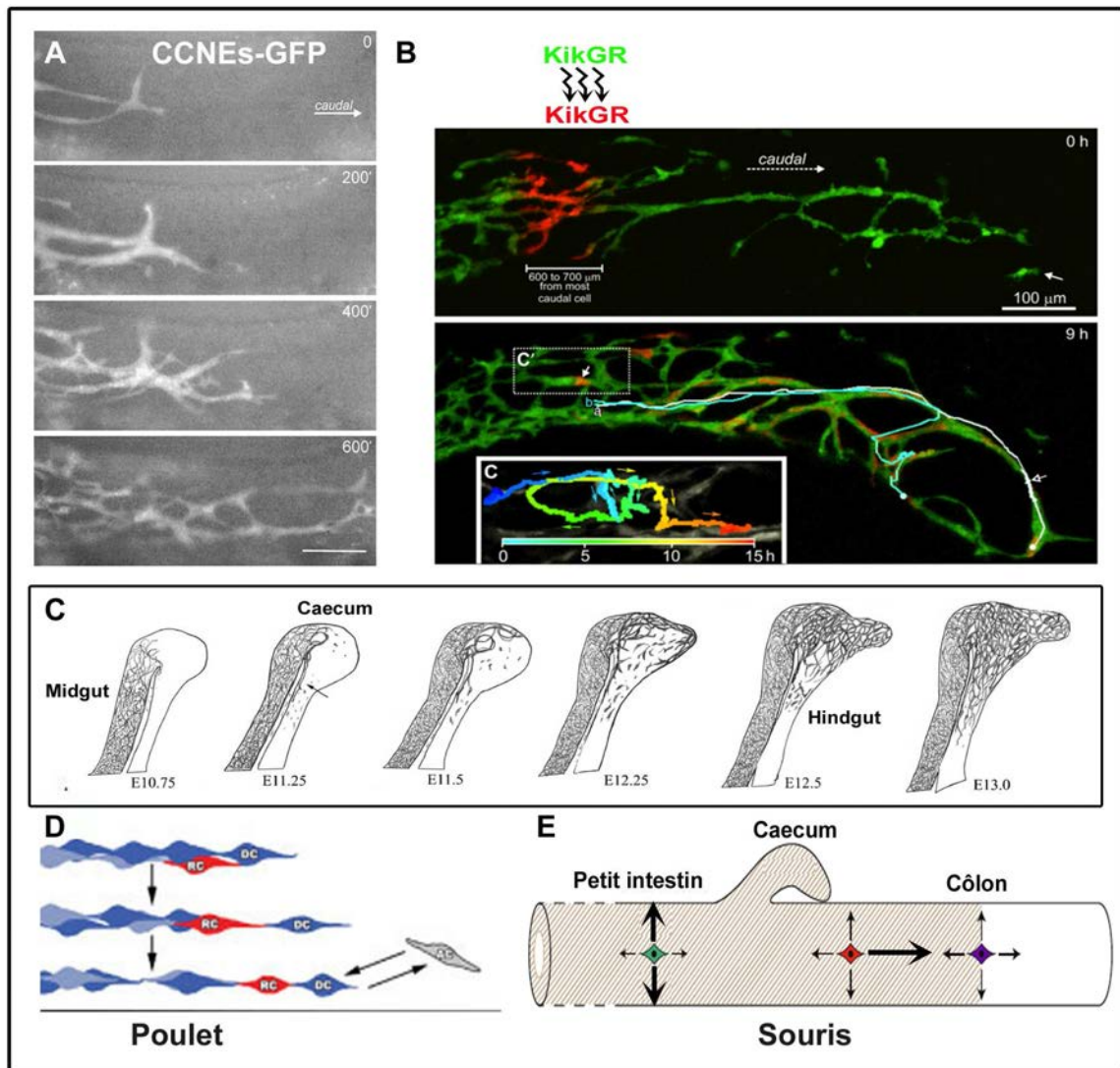


Figure 8 : Aspects dynamiques de la colonisation de l'intestin embryonnaire par les CCNEs

A- Images time-lapse de CCNEs exprimant la GFP montrant la formation des chaînes au front de migration dans le *hindgut* de souris à E12.5 ; échelle : 100 μm (Young, Bergner et al. 2004). **B-** Avancée en « saute-mouton » des CCNEs au front de migration. Les CCNEs exprimant une protéine photoconvertible (KikGR, vert) émettent dans le rouge une fois excitée par la lumière laser se qui permet de suivre leur déplacement individuel. Certaines CCNEs (rouge) qui se trouvaient en arrière du front de migration (600-700 μm) se retrouvent au front de migration, au bout des chaînes ; échelle : 100 μm (Young, Bergner et al. 2014). **C-** Patron de colonisation du cæcum et du *hindgut* proximal. Après une pause transitoire, les CCNEs accumulées à l'entrée du cæcum vont se dissocier des chaînes et coloniser tout d'abord les bordures puis le corps du cæcum. Enfin les CCNEs reforment les chaînes dans le proximal où elles sont rejointes par les CCNEs transmésentériques (Druckenbrod and Epstein 2005). **D-** Modèle simplifié d'avancée des chaînes de CCNEs au front de migration chez le poulet : la CCNE distale (DC) en s'avancant vers la CCNE pionnière (AC) libère de l'espace derrière elle qui sera occupé par la CCNE rostrale

s'intercalant entre la DC et le reste de la chaîne. L'avancée de la chaîne peut également se faire ajout de la cellule pionnière (Druckebrod and Epstein 2007). E- Schémas représentant les tendances directionnelles de migration (flèches) des CCNEs de souris, en fonction de leur localisation par rapport au front de migration. L'épaisseur de la flèche traduit la tendance directionnelle : radiale pour les CCNEs les plus rostrales (vert), caudale pour les CCNEs rostrales situées juste derrière le front de migration (rouge). Les CCNEs au front de migration (bleu) ont une probabilité égale de migrer dans toutes les directions (Xu, Heanue et al. 2014).

I - C - d : Différenciation et prolifération des CCNEs

Quel est le phénotype des CCNEs en migration au travers de l'intestin ? La population de CCNEs est une population hétérogène et au moment de la colonisation intestinale, **des CCNEs de différents phénotypes coexistent** (progéniteurs entériques indifférenciés, neurones et cellules gliales immatures, CCNEs différenciées). Vers E8.5, les CCN vagues pré-entériques commencent à exprimer Sox10 avant leur délamination et p75 juste après (Anderson, Stewart et al. 2006). Elles expriment également EDNRB, et peu avant leur entrée dans le *foregut* (E9.5) elles vont exprimer en plus Phox2b et RET (Young and Newgreen 2001; Anderson, Stewart et al. 2006; Sasselli, Pachnis et al. 2012). Ainsi, les CCNEs exprimant Sox10/p75±Phox2b/RET sont considérées comme les progéniteurs indifférenciés multipotents (indifféremment appelées dans le texte progéniteurs entériques ou CCNEs progénitrices) d'où proviendront tous les sous-types neuronaux et cellules gliales du SNE. Au fur et à mesure de leur colonisation, mais de manière asynchrone, les CCNEs progénitrices vont s'engager dans les voies de différenciation neuronales puis gliales, en fonction des signaux de l'environnement (Fig. 9A) (Lake and Heuckeroth 2013). Cependant, une petite partie va rester à l'état indifférencié, formant le « pool » de cellules souches entériques qui persiste chez l'adulte (en très faible proportion cependant) et représente un intérêt particulier pour les thérapies cellulaires ciblant les pathologies du SNE (Kruger, Mosher et al. 2002).

Entre E10.5 et E11.5, environ 10% à 20% des CCNEs colonisant le *midgut*, commencent à exprimer des marqueurs pan-neuronaux⁶ tels que Hu, Tuj1, PGP9.5, Neurofilament-N, de façon concomitante à la perte très rapide de l'expression de Sox10 et plus progressive de P75 (Fig. 9B) (Young, Ciampoli et al. 1999; Young, Bergner et al. 2003). Ces neurones immatures projettent des neurites et axones en direction caudale et sont associés à de nombreuses CCNEs (Young, Jones et al. 2002; Hao, Moore et al. 2010). Les neurones continueront cependant d'exprimer Phox2B (Corpening, Cantrell et al. 2008). Elles

⁶ Marqueur pan-neuronal : qui marque tous les types de neurones et ne sont pas restreint à un sous-type neuronal particulier.

sont alors considérées comme des neurones immatures et on les retrouve réparties sur toute la longueur de la région colonisée y compris proche du front de migration mais dans de faible proportion (Hao, Bornstein et al. 2013). En effet, au niveau de ce dernier, bien que l'on retrouve de nombreuses projections axonales Tuj1+, associées aux CCNEs, moins de 2% des CCNEs (majoritairement Sox10/P75/RET/Phox2B) expriment de marqueurs pan-neuronaux (PGP9.5, Neurofilament-N et Hu), (Young, Bergner et al. 2004; Hao, Moore et al. 2010). Ensuite, la neurogénèse va continuer et se poursuivre jusqu'à la naissance et les premières semaines de la vie. Les neurones immatures vont exprimer tout un échelon de marqueurs, les engageant de plus en plus dans leur voie de différenciation, afin de donner tous les sous-types neuronaux composant le SNE (Sasselli, Pachnis et al. 2012; Lake and Heuckeroth 2013).

Le premier marqueur de différenciation gliale à être détecté dans le *midgut* est le B-FAB, vers E11.5, soit 24h après l'apparition des premiers neurones immatures et au moment où les CCNEs entament la colonisation du cæcum (Fig. 9B) (Young, Bergner et al. 2003). Contrairement aux neurones, les cellules gliales immatures conservent l'expression de Sox10 ainsi que Phox2b et P75 (Young, Bergner et al. 2003). Les marqueurs plus tardifs de la différenciation gliale, S100b et le GFAP, n'apparaîtront en revanche qu'entre E14.5 et E16.5, signant la différenciation complète des cellules gliales entériques (Young, Bergner et al. 2003; Sasselli, Pachnis et al. 2012). On peut noter que contrairement aux neurones, les marqueurs disponibles et les études sur la différenciation des cellules gliales entériques sont relativement peu nombreux.

Il a été montré que la différenciation neuronale n'impliquait pas nécessairement un arrêt immédiat de la migration, comme il était supposé. Au contraire, 50% des **neurones immatures conservent leurs capacités migratoires** pendant plusieurs heures, bien qu'elles soient réduites par rapport aux progéniteurs entériques indifférenciés (Hao, Anderson et al. 2009). Les neurones immatures migrent en s'aidant de leur projections axonales à une vitesse de 15 $\mu\text{m}/\text{h}$ soit bien moins rapidement que les autres CCNEs (35-45 $\mu\text{m}/\text{h}$, voir paragraphe précédent) (Hao, Anderson et al. 2009). De manière intéressante, les études sur la dynamique de migration des CCNEs mentionnées dans le chapitre précédent, ont permis de mettre en évidence que les CCNEs se servent des neurites projetés par les cellules ayant entamées leur différenciation neuronale pour migrer, bien que ces projections ne dépassent jamais le front de migration (Young, Bergner et al. 2014). En revanche, aucune étude

analysant les propriétés migratoires des cellules gliales entériques immatures n'a encore été réalisée à ce jour.

Enfin, **la prolifération des CCNEs est un des mécanismes cellulaires cruciaux pour produire un nombre suffisant de cellules assurant la colonisation complète de l'intestin** en cours de croissance. **Toutes les CCNEs prolifèrent-elles ou leur capacité proliférative dépend-elle de leurs phénotypes et de l'environnement?** Pour répondre à ces questions, une étude s'est attelée à la comparaison du taux de prolifération des CCNEs en fonction de certaines régions de l'intestin et de leurs phénotypes (Fig. 9C) (Young, Turner et al. 2005). Les CCNEs prolifèrent massivement au cours de la colonisation avec un taux de prolifération d'environ **40%**, ce taux étant homogène d'une région à l'autre de l'intestin entre E11.5 et E12.5, hormis dans l'estomac où les CCNEs prolifèrent moins (analyses par comptage des CCNEs Phox2b⁺ ayant incorporées du BrdU, Fig. 9C) (Young, Turner et al. 2005). De plus, Sur le nombre total de CCNEs Phox2b⁺ et P75⁺, environ un tiers présentent des marqueurs neuronaux précoces continuent de proliférer. Les neurones immatures conservent donc une certaine capacité de prolifération. Cependant, ils sortent du cycle cellulaire peut avant de devenir des neurones matures, qui ne prolifèrent quasiment plus. De mêmes, les cellules gliales entériques exprimant S100b continuent de se diviser (Young, Turner et al. 2005).

Pour renforcer l'argument selon lequel la population de CCNEs doit être suffisante pour coloniser l'intestin embryonnaire, nous verrons dans les chapitres §II-C et §II-D que plusieurs mutants présentant une colonisation incomplète de l'intestin, voire absente, résultent soit d'une baisse du nombre de CCNEs, soit d'un défaut de prolifération ou une apoptose précoce. Nous pouvons également mentionner le fait que la réduction de la taille de la population initiale de CCNEs, par ablation d'une partie du tube neural vagal à pour conséquence une colonisation incomplète de l'intestin embryonnaire (Barlow, Wallace et al. 2008). Par ailleurs, l'importance de la densité de population sur les capacités migratoires intrinsèque des CCNEs a également été démontrée *ex-vivo*, en isolant le front de migration par une petite ablation en amont de ce dernier, ce qui a pour effet de diminuer la vitesse de migration ou la progression des CCNEs isolées du reste de la population (Young, Bergner et al. 2004; Druckenbrod and Epstein 2005). Ces expériences valident la notion de « pression de population » pour les CCNEs et ainsi que les modèles mathématiques proposés par plusieurs équipes (Simpson, Landman et al. 2006; Landman, Simpson et al. 2007; Simpson, Zhang et al. 2007).

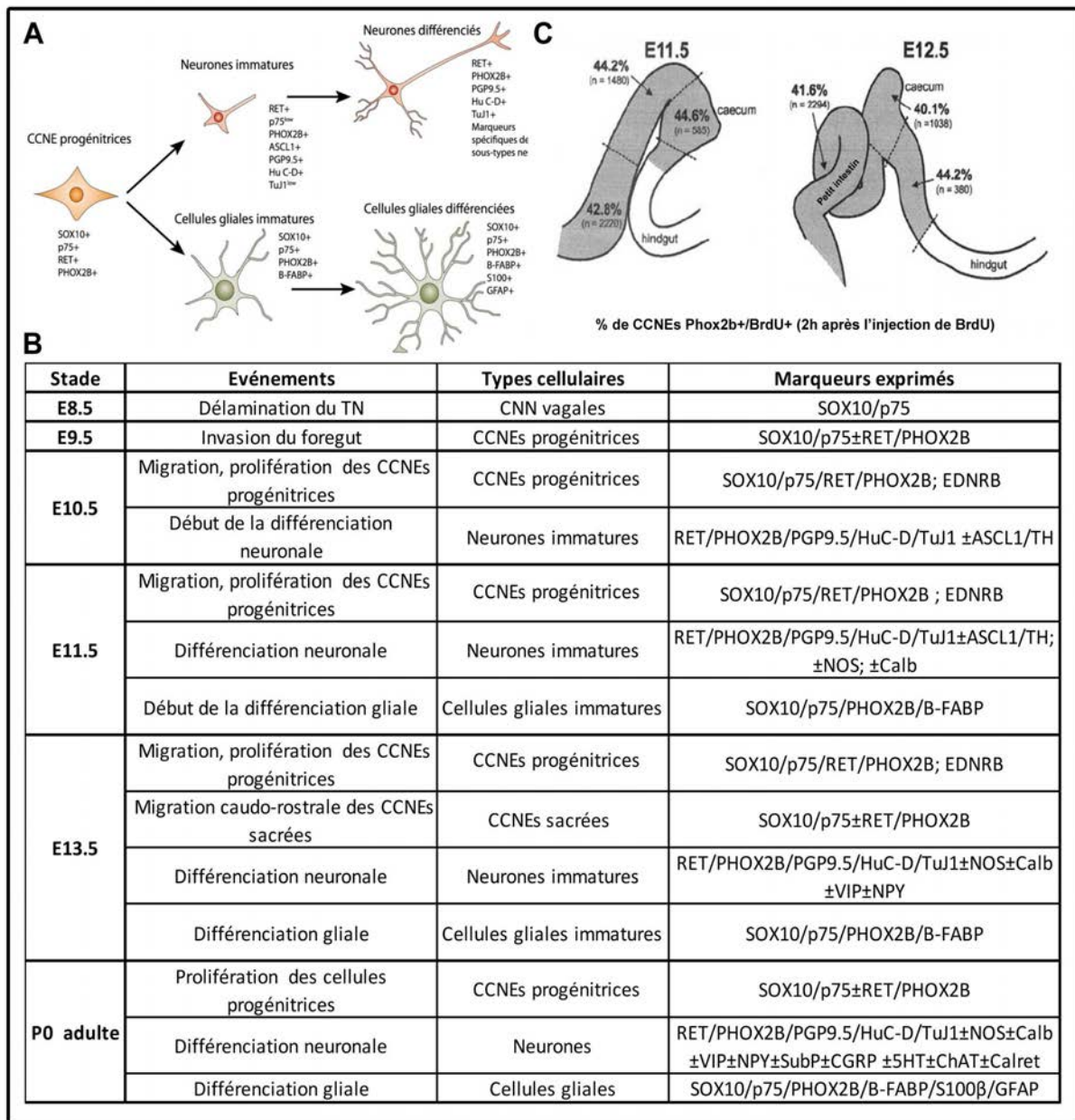


Figure 9 : Différenciation et prolifération des CCNEs au cours de la colonisation intestinale

A- Schémas récapitulants les deux voies de différenciation des CCNEs progénitrices et leurs marqueurs caractéristiques en fonction de l'état de maturation dans la voie engagée (Heanue and Pachnis 2007). **B-** Pourcentage de CCNEs en prolifération en fonction de la zone colonisée entre E11.5 et E12.5 (Young, Turner et al. 2005). **C-** Tableau résumant les principaux marqueurs exprimés par les CCNEs en fonction de leur stade de différenciation lors de la colonisation de l'intestin embryonnaire (Sasselli, Pachnis et al. 2012). Figure tirée et adaptée de (Watanabe 2014)

En résumé, le SNE est majoritairement formé par les CCN vagues. Une fois dans l'intestin embryonnaire à E9.5, les CCNEs vont coloniser la totalité de ce dernier, qui lui-même continue son programme de croissance. Les CCNEs colonisent le *foregut*, le *midgut*, puis le cæcum et enfin le *hindgut*, en une seule vague rostro-caudale. Les CCNEs migrent de manière collective, en contacts transitoires permanents les unes avec les autres. Au front de migration, dans les parties linéaires de l'intestin, les CCNEs forment des chaînes labiles qui envahissent les régions caudales vierges. À E11.5, à l'entrée du cæcum, une partie des CCNEs marque une pause de plusieurs heures, se dissocient des chaînes et envahissent de manière isolée le cæcum. Elles reformeront les chaînes, une fois rejointes par les CCNEs transmésantériques, dans le *hindgut* proximal. Enfin, vers E13.5, une fois le *hindgut* distal atteint, les CCNEs sacrées jusqu'alors dans le plexus pelvien, migrent de façon rostro-caudale vers les CCNEs vagues complétant ainsi la colonisation à E14.5. La colonisation du tractus digestif est donc un processus long, qui n'a pas d'égal au cours de l'embryogénèse. Non seulement les CCNEs doivent coloniser toute la longueur de l'intestin, mais celles disséminées en arrière du front de colonisation doivent peupler radialement les régions préalablement envahies et former le plexus sous-muqueux. De plus, les CCNEs entament leur programme de différenciation très tôt au cours de leur colonisation et s'organisent progressivement en réseau nerveux complexe. De ce fait, la population de CCNEs est hétérogène et formée de CCNEs présentant différents « phénotypes » : progéniteurs indifférenciés, neurones et cellules gliales immatures, neurones engagés, ne présentant pas les mêmes caractéristiques de prolifération et de migration. De même, le comportement migratoire individuel des CCNEs est aléatoire et non prévisible.

Ainsi, la population de CCNEs en tant que population globale, possède des propriétés qui ne représentent pas la somme des propriétés individuelles de chacune des CCNEs la composant. Pourtant, l'avancée du front de colonisation se déroule quant à elle, toujours selon le même patron. Malgré cette disparité de comportements individuels, comment se fait la colonisation directionnelle de l'intestin? Bien que ce phénomène ne soit pas encore compris dans sa globalité, la pression de population liée à une population suffisante et un taux de prolifération permettant l'expansion de la colonisation, les adhérences intercellulaires permettant la formation des chaînes et la migration collective, la différenciation des progéniteurs entériques, sont autant de mécanismes cellulaires influençant la colonisation des CCNEs. Lorsqu'ils sont déréglés, cela conduit à des anomalies de développement de SNE que nous allons à présent décrire en partie ainsi que **les acteurs moléculaires qui contrôlent son développement.**

II - Les acteurs moléculaires contrôlant le développement du SNE

II – A : La maladie de Hirschsprung et l'identification des acteurs moléculaires clés du développement du SNE

La maladie de Hirschsprung (HSCR) est une neurocristopathie congénitale de la motilité intestinale, dont l'incidence est estimée à 1 naissance pour 5000 (Obermayr, Hotta et al. 2013). Les patients masculins sont plus souvent touchés par cette maladie avec un sex-ratio de 4 garçons pour 1 fille (Badner, Sieber et al. 1990). HSCR se caractérise par une aganglionose du côlon, qui provient de l'absence de SNE de l'anus jusqu'à une partie plus ou moins étendue de l'intestin. Cette absence de SNE résulte d'une colonisation incomplète des CCNEs. Les muscles intestinaux n'étant plus innervés, le péristaltisme ne se fait plus et ces derniers sont en contraction permanente. Cette aganglionose empêche donc l'évacuation des fèces, ce qui conduit à des constipations sévères. Les symptômes de la maladie de HSCR impliquent des occlusions intestinales néonatales, des constipations sévères, une distension abdominale (mégacôlon) des vomissements ainsi qu'une sévère inflammation intestinale (entérocolite). Si elle est non traitée, la maladie de HSCR peut être létale (Heuckeroth and Schafer 2016). Il existe deux cas d'apparition de la maladie : les cas dit isolés (70% des cas) qui surviennent de manière sporadique, avec une transmission héréditaire complexe et non Mendélienne, et les cas associés à des syndromes (30%), tel que le syndrome de Waardenburg, ou associés à des anomalies de types chromosomiques (la trisomie 21 par exemple) (Amiel, Sproat-Emission et al. 2008; Obermayr, Hotta et al. 2013). Tous les syndromes connus à ce jour comme étant associés à HSCR sont listés dans la revue de (Amiel, Sproat-Emission et al. 2008). Il existe 3 formes cliniques de la maladie, caractérisées par la longueur de l'aganglionose : la forme totale (Fekete, Ricour et al. 1986), la plus grave car tout l'intestin est touché ; la forme longue, étendue au côlon entier (Fekete, Ricour et al. 1986), et la forme courte dite recto-sigmoïde (Neilson and Yazbeck 1990).

Les études de génétique humaine et de modèles murins «spontanés », ont permis les premières identifications des gènes impliqués et des types de mutations responsables de la maladie de HSCR (Fig. 10). Ainsi les premiers gènes majeurs identifiés ont été : le gène **Ret**, codant pour un récepteur transmembranaire tyrosine kinase, qui est touché dans 50% des cas familiaux et dans 15-20 % des cas sporadiques (Edery, Lyonnet et al. 1994; Romeo, Ronchetto et al. 1994; Schuchardt, D'Agati et al. 1994), le gène codant son ligand, le **Gdnf**,

qui est muté dans <5% des cas (Angrist, Bolk et al. 1996); le gène codant un récepteur couplé aux protéines G, l'*Ednrb* (Endothéline receptor-B), retrouvé dans 5% des cas isolés (Puffenberger, Hosoda et al. 1994; Auricchio, Casari et al. 1996; Chakravarti 1996) ainsi que le gène codant son ligand, l'*Edn3* (Endothéline-3) (Baynash, Hosoda et al. 1994; Hosoda, Hammer et al. 1994) et le gène codant son enzyme de conversion, *ECE1*, mais dans de très rares cas (Yanagisawa, Yanagisawa et al. 1998; Hofstra, Valdenaire et al. 1999); enfin, les gènes *Sox10* (Pingault, Bondurand et al. 1998) et *Phox2b* (Trochet, O'Brien et al. 2005) codant des facteurs de transcription et que l'on retrouve mutés dans les HSCR syndromiques. Il est important de noter cependant que l'expressivité de HSCR est variable, c'est à dire que pour une même mutation, il existe une variabilité phénotypique de l'aganglionose, qui peut être plus ou moins sévère. De même, certaines mutations présentent une pénétrance incomplète, par exemple, une mutation du gène *Gdnf*, ne conduit pas nécessairement à l'apparition de HSCR, ce qui signifie qu'il n'y a pas de corrélation stricte entre le génotype et le phénotype. Très souvent les patients atteints d'une mutation de *Gdnf* déclarant un HSCR possèdent en plus une mutation sur *Ret* ou une trisomie 21 (Angrist, Bolk et al. 1996; Salomon, Attie et al. 1996). La déclaration de la maladie de HSCR (=pénétrance) et sa gravité (=expressivité variable) vont donc dépendre d'autres gènes éventuellement touchés que l'on nomme gènes modificateurs⁷, ce qui met en lumière l'importance des interactions génétiques.

L'utilisation de modèles murins mutants en parallèle a permis d'élargir l'éventail connu de gènes comme étant impliqués dans le développement du SNE (Fig. 10A). De plus, même si les données manquent encore chez l'Homme, concernant les facteurs non génétiques pouvant affecter les risques de HSCR (seulement une étude épidémiologique réalisée à ce jour sur l'augmentation du risque de HSCR associé à la trisomie 21 par la prise de café et la fièvre durant le premier trimestre de grossesse (Torfs and Christianson 1999)), des données sur les modèles animaux, dont le poisson zèbre, indiquent que certaines molécules thérapeutiques (l'ibuprofène notamment) peuvent bloquer la colonisation des CCNEs (Schill, Lake et al. 2016). HSCR est donc une maladie complexe, multigénique et probablement multifactorielle (Heuckeroth and Schafer 2016).

⁷ Un gène modificateur est un gène qui lorsqu'il est seul muté, n'est pas suffisant pour induire une pathologie, mais couplé à un autre gène muté peut déclencher ou aggraver une maladie.

Ainsi, l'étude de la maladie de HSCR et celles menées sur les modèles murins ont ouvert l'accès à une meilleure compréhension des acteurs moléculaires régulant l'ontogénèse du SNE ainsi que de leurs interactions génétiques et fonctionnelles (Fig. 10B). Elles ont également mis en lumière la complexité des mécanismes orchestrant la colonisation des CCNEs.

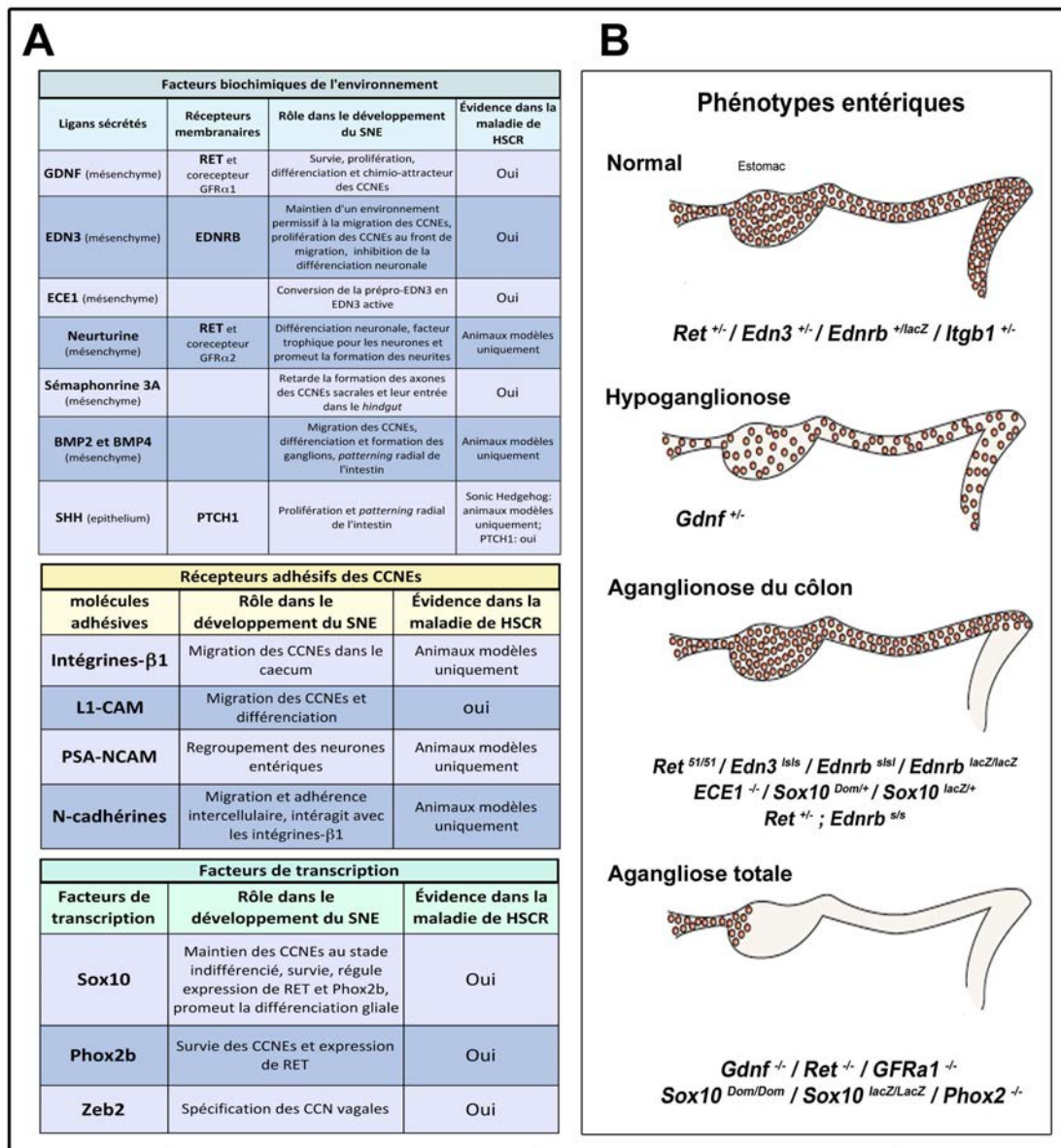


Figure 10 : Les gènes impliqués dans la maladie de HSCR et les phénotypes associés

A- Tableau des acteurs moléculaires impliqués dans la maladie de HSCR chez l'Homme, ainsi qu'une partie de ceux découverts chez les modèles murins spontanés (*Ret^{+/-}*, *Edn3^{lsls}*, *Ednrb^{sIsl}*, *Sox10^{Dom}*) et transgéniques (souches LacZ notamment). B- Schémas illustrant les phénotypes entériques, représentés par l'étendue de la colonisation des CCNEs, et les génotypes associés (Heanue and Pachnis 2007).

II - B: Les voies de signalisation principales

II - B - a : La voie de signalisation GDNF/RET

RET (*Rearranged during Transfection*) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase. L'activation de RET se fait via un co-récepteur de type GFR α (*GDNF family receptor α -component*), ancré à la membrane par un groupement GPI (Glycosyl-phosphatidyl-Inositol). Il existe 4 sous-types de GFR α , de GFR α 1 à GFR α 4, mais seules les expressions des GFR α 1 et GFR α 2 ont été rapportées au niveau du SNE (Heuckeroth, Lampe et al. 1998; Schiltz, Benjamin et al. 1999). Les ligands se fixant sur le co-récepteur sont : le GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*), la Neurturine, la Perséphine et l'Artémine (Sariola 2003). Au niveau du SNE, le GDNF se fixe préférentiellement au GFR α 1 et la Neurturine au GFR α 2, cependant cette seconde voie ne semble pas directement impliquée dans le contrôle de la colonisation des CCNEs mais seulement comme facteur trophique pour les neurones post-mitotiques, elle ne sera donc pas décrite (Heuckeroth, Enomoto et al. 1999). Bien que la présence d'Artémine ait été démontrée par immunomarquages d'intestins embryonnaires chez l'oiseau, très peu de données sont disponibles concernant les autres modèles animaux et jusqu'à présent la présence de Perséphine au niveau de l'intestin embryonnaire n'a pas été démontrée (Maruccio, Lucini et al. 2008).

RET est exprimé très tôt par les CCNEs prémigratoires (CCN vagues), avant leur entrée dans le *foregut* et est maintenu tout au long de leur colonisation (Pachnis, Mankoo et al. 1993). Plus tard au cours du développement, son expression est exclusivement restreinte aux neurones (Pachnis, Mankoo et al. 1993; Young, Bergner et al. 2003). GFR α 1 est quant à lui exprimé à la fois par les CCNEs et les cellules mésenchymateuses intestinales qui sécrètent le GDNF dans le mésenchyme (Chalazonitis, Rothman et al. 1998; Young, Hearn et al. 2001).

Les modèles murins homozygotes invalidés pour RET, GDNF et GFR α 1, présentent un phénotype similaire d'aganglionose complète de l'intestin, avec seulement quelques ganglions entériques présents au niveau du *foregut* rostral (œsophage et estomac) (Fig. 10B et 11A) (Schuchardt, D'Agati et al. 1994; Moore, Klein et al. 1996; Sanchez, Silos-Santiago et al. 1996; Cacalano, Farinas et al. 1998; Enomoto, Araki et al. 1998). Ce phénotype entérique

est dû à l'apoptose des CCNEs à leur arrivée dans le *foregut*, qui conduit à une déplétion trop importante du nombre de CCNEs nécessaires à la colonisation intestinale (Taraviras, Marcos-Gutierrez et al. 1999).

Cette même étude confirme *in vivo* l'hypothèse du rôle essentiel de la voie de signalisation GDNF /RET dans le maintien d'un pool suffisant de CCNEs (Taraviras, Marcos-Gutierrez et al. 1999). En effet, cette hypothèse avait déjà été émise auparavant, par plusieurs équipes ayant démontré *in vitro* l'effet très net du GDNF sur **la survie et la prolifération** des CCNEs entériques (Chalazonitis, Rothman et al. 1998; Heuckeroth, Lampe et al. 1998; Taraviras, Marcos-Gutierrez et al. 1999). Ce rôle a par ailleurs été confirmé de nouveau *in vivo* quelques années plus tard (entre autre par des analyses d'incorporation de BrdU chez les hétérozygotes *Gdnf*^{+/-} (Fig. 11B) et comptage des neurones. Ces hétérozygotes, malgré une colonisation complète de l'intestin, présentent en réalité une hypoganglionose) (Fig. 10B) (Shen, Pichel et al. 2002; Gianino 2003).

Parallèlement, toutes ces études rapportent un effet positif du GDNF sur la **différenciation neuronale** des CCNEs *in vitro* (Chalazonitis, Rothman et al. 1998; Hearn, Murphy et al. 1998; Heuckeroth, Lampe et al. 1998; Taraviras, Marcos-Gutierrez et al. 1999). Cependant les conditions de cultures de ces différentes études ne permettent pas réellement de distinguer l'effet du GDNF sur la prolifération de celui sur la différenciation (cultures de CCNEs P75^{NTR+} ou Ret⁺ isolées par immuno-sélections ou cultures primaires d'intestins embryonnaires dissociés) ; **y a t'il plus neurones car le GDNF contrôle le nombre de cellules, sans pour autant changer leur capacité a se différencier, ou bien parce qu'il stimule leur différenciation?** L'effet direct sur la différenciation neuronale et la pousse axonale sera validé, toujours *in vitro*, mais par l'utilisation de cultures clonales de progéniteurs entériques indifférenciés, isolés par la technique des neurosphères (Fig. 11C) (Bondurand, Natarajan et al. 2003). De plus, cette étude, de manière intéressante, rapporte que l'effet du GDNF sur la différenciation des progéniteurs entériques dépend du milieu de culture (ie : avec ou sans extrait embryonnaire de poulet) suggérant que certains facteurs présents dans le milieu peuvent moduler l'effet du GDNF (Bondurand, Natarajan et al. 2003).

Deux études ont démontré *in vitro* **l'effet chimio-attractant du GDNF** sur les CCNEs (Fig. 11D) et suggèrent que leur entrée dans le *foregut* est guidée par le GDNF dont l'ARN messager (ARNm) est très fortement exprimé au niveau du mésenchyme de l'estomac, peu avant leur arrivée (E8.5-9.5) (Fig. 11E) (Young, Hearn et al. 2001; Natarajan, Marcos-

Gutierrez et al. 2002). Leurs analyses ont permis de déterminer l'expression spatio-temporelle de l'ARNm du GDNF au moment de la colonisation des CCNEs (Fig. 11E).

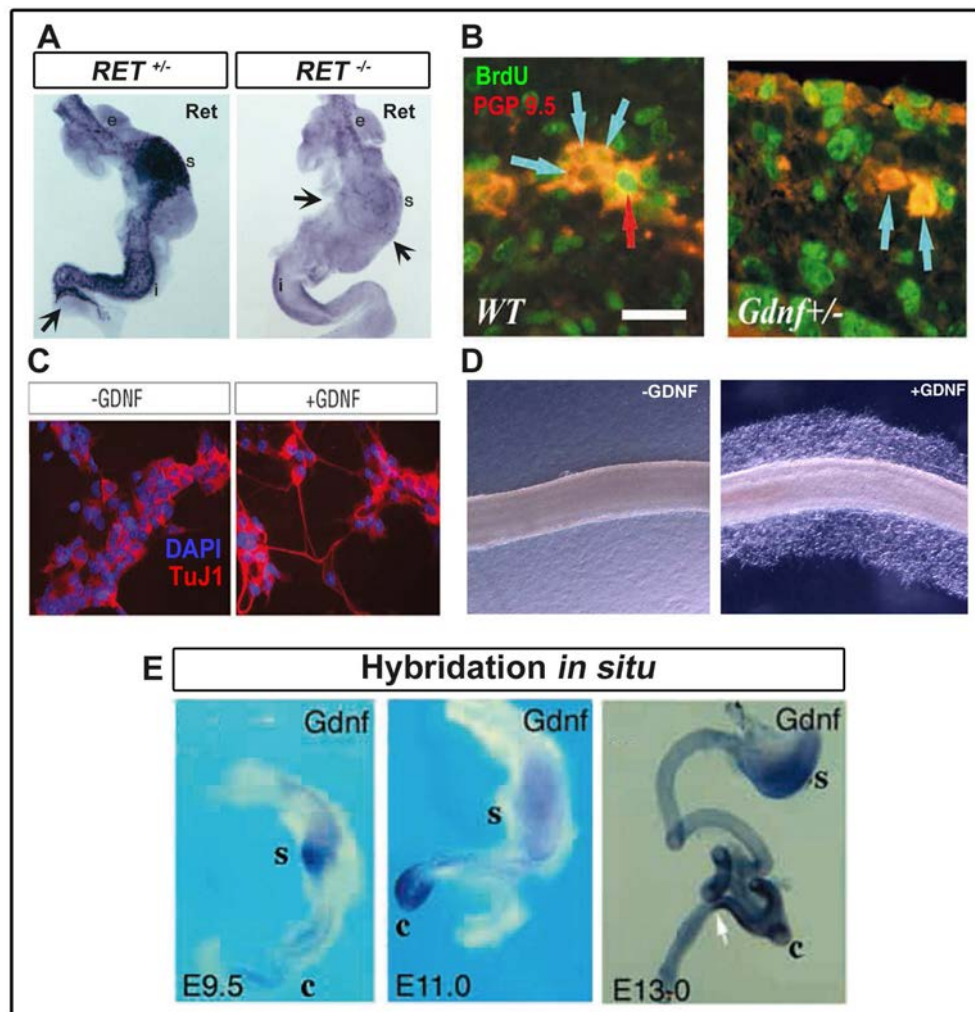


Figure 11 : La voie GDNF/RET et son implication dans le développement du SNE

A- Hybridations *in situ* de l'ARNm de *RET* exprimé par les CCNEs. Les mutants *RET*^{-/-} présentent un retard précoce de migration des CCNEs. Seulement quelques CCNEs sont présentes dans le *foregut* et l'estomac à E11.5 (flèches noires) alors que chez le contrôle, elles ont atteint le cæcum (flèche noire) (Durbec, Larsson-Blomberg et al. 1996). **B-** Immunomarquages illustrant le défaut de prolifération chez les CCNEs *Gdnf*^{+/-}. Des CCNEs (PGP9.5, rouge, flèches bleues) ayant incorporé du BrdU (flèche rouge) sont présentes chez le contrôle mais absente chez l'hétérozygote, échelle : 20 µm (Gianino 2003). **C-** Immunomarquages de colonies clonales issues de progéniteurs indifférenciés. Le GDNF induit la différenciation neuronale des progéniteurs entériques (marquage neuronal TuJ1 (rouge) augmenté et présence de neurofilament dans les colonies traitées) (Bondurand, Natarajan et al. 2003). **D-** Effet chimio-attracteur du GDNF. Les CCNEs provenant d'un intestin embryonnaire de poulet, sortent et envahissent le gel de collagène uniquement en présence de GDNF (Nagy and Goldstein 2006) **E-** Hybridations *in situ* du GDNF à différents stades de développement. Le signal est visible sur toute la longueur de l'intestin mais est très marqué au niveau du *foregut* et de l'estomac au moment de l'entrée des CCN vagales dans l'intestin. Puis le signal devient plus intense au niveau du cæcum à E11 et enfin diffuse vers le *hindgut* proximal (flèche blanche) à E13. S= estomac, c= cæcum (Natarajan, Marcos-Gutierrez et al. 2002).

Tout d'abord, lors de la colonisation du *midgut*, le signal de l'ARNm du GDNF diminue dans le *foregut* mais devient très intense au niveau du *cæcum* vers E10.5/E11 (Fig. 11E), peu avant l'arrivée des CCNEs au niveau de ce dernier (E11.5) (Natarajan, Marcos-Gutierrez et al. 2002). Ensuite, le signal de l'ARNm du GDNF reste assez marqué au niveau du *cæcum* et s'estompe au niveau du *hindgut* proximal entre E11.5 et E13 (Fig. 11E) (Natarajan, Marcos-Gutierrez et al. 2002). Les auteurs émettent ainsi l'hypothèse que le GDNF pourrait jouer un rôle de chimio-attracteur pour guider la colonisation rostro-caudale des CCNEs au moins jusqu'à la jonction iléo-caecale. Cette hypothèse a également été validée *in vivo*, soulignant en plus le rôle du signal dans la migration des CCNEs vers le plexus sous-muqueux (Uesaka, Nagashimada et al. 2013). Le signal chimio-attractant du GDNF serait également impliqué dans la migration transmésentérique des CCNEs (Nishiyama, Uesaka et al. 2012).

Ainsi, les études à la fois *in vivo* et *in vitro* ont mis en avant l'effet pléiotropique de la voie GDNF/RET/GFR α 1 durant l'ontogénèse du SNE. De plus, il est important de souligner les deux rôles essentiels de cette dernière durant la colonisation des CCNEs. Premièrement, elle assure le maintien d'une population suffisante de CCNEs capables de coloniser l'intestin en favorisant la survie et la prolifération des CCNEs et deuxièmement, elle est directement impliquée dans le contrôle directionnel de la migration des CCNEs de par les propriétés chimio-attractives du GDNF.

II - B - a : La voie de signalisation EDN3/EDNRB

La famille des endothélines comprend trois ligands, l'EDN1, l'EDN2 et l'EDN3, dont la forme mature de 21 acides aminés est produite par le clivage de leurs précurseurs respectifs par l'enzyme de conversion ECE1 (Inoue, Yanagisawa et al. 1989). Il existe deux récepteurs spécifiques à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G : l'EDNRA et l'EDNRB. L'EDN1 et l'EDN2 se fixent avec la même affinité sur les deux récepteurs mais l'EDN3 présente une affinité plus forte pour l'EDNRB que pour l'EDNRA (Davenport, Hyndman et al. 2016).

Tout comme le GDNF, l'EDN3 est sécrétée par le mésenchyme intestinal (Wu, Chen et al. 1999). De même, les hybridations *in situ* d'intestins embryonnaires de poulet et de souris révèlent un patron dynamique d'expression de l'EDN3 (Fig. 12A). À E10, le signal est tout d'abord faible sur toute la longueur du *midgut* et du *hindgut* puis il devient très marqué au niveau du *cæcum* et du *hindgut* proximal à partir de E10.5/E11, soit peu avant et au moment

de la colonisation des CCNEs. Enfin, le signal reste fort dans cette zone jusqu'à la fin de la colonisation (Fig. 12A) (Leibl, Ota et al. 1999; Barlow, de Graaff et al. 2003; Nagy and Goldstein 2006). Chez le poulet et la souris, l'EDNRB est exprimé par les CCN vagues dès leur délamination, expression qui est maintenue par les CCNEs tout au long de leur migration (Nataf, Amemiya et al. 1998; Wu, Chen et al. 1999; Barlow, de Graaff et al. 2003; Lee 2003; Nagy and Goldstein 2006). Les cellules mésenchymateuses intestinales de souris, au niveau du *midgut*, expriment également le récepteur mais le signal de l'ARNm de ce dernier est plus faible que pour les CCNEs (Wu, Chen et al. 1999 ; Barlow, de Graaff et al. 2003). Bien que le signal de l'ARNm ne soit pas détecté dans le mésenchyme au niveau du *cæcum* et du *hindgut*, il semblerait que la protéine soit tout de même exprimée au niveau des cellules mésenchymateuses du *hindgut* proximal à E15.5 (Barlow, de Graaff et al. 2003; Druckenbrod and Epstein 2009). En revanche, le mésenchyme intestinal d'embryon de poulet n'exprime pas quant à lui l'EDNRB (Nagy and Goldstein 2006).

Les gènes *Edn3* et *Ednrb* ont été identifiés chez des modèles murins « naturels », *Ednrb^{sls}* (*piebald lethal*) et *Edn3^{sls}* (*lethal spotting*) (Baynash, Hosoda et al. 1994; Hosoda, Hammer et al. 1994) puis montrés comme également touchés chez certains patients HSCR (Fig. 10) (Puffenberger, Hosoda et al. 1994; Chakravarti 1996; Edery, Attie et al. 1996; Hofstra, Osinga et al. 1996). Les mutants *Edn3^{sls}* sont porteurs d'une mutation homozygote ponctuelle qui abolit la conversion de la prépro-EDN3 en EDN3 active par l'ECE1 (Baynash, Hosoda et al. 1994) tandis que les mutants *Ednrb^{sls}*, sont porteurs d'une délétion complète du gène (Hosoda, Hammer et al. 1994). Ces mutants murins présentent des phénotypes similaires d'aganglionose du côlon (de longueur variable), associés à des défauts de pigmentation du pelage (Fig. 12B et C) (Lane 1966; Baynash, Hosoda et al. 1994; Hosoda, Hammer et al. 1994). Chez ces mutants, le phénotype résulte de la colonisation incomplète des CCNEs qui ne s'étend pas au-delà de la jonction iléo-caecale (Fig. 12D). Ce défaut est nettement visible entre E11.5 et E12.5 au niveau du *cæcum* où les CCNEs sont retardées dans leur colonisation (Fig. 12D) (Kapur, Yost et al. 1992; Kapur, Sweetser et al. 1995; Lee 2003; Zhu, Lee et al. 2004; Druckenbrod and Epstein 2009).

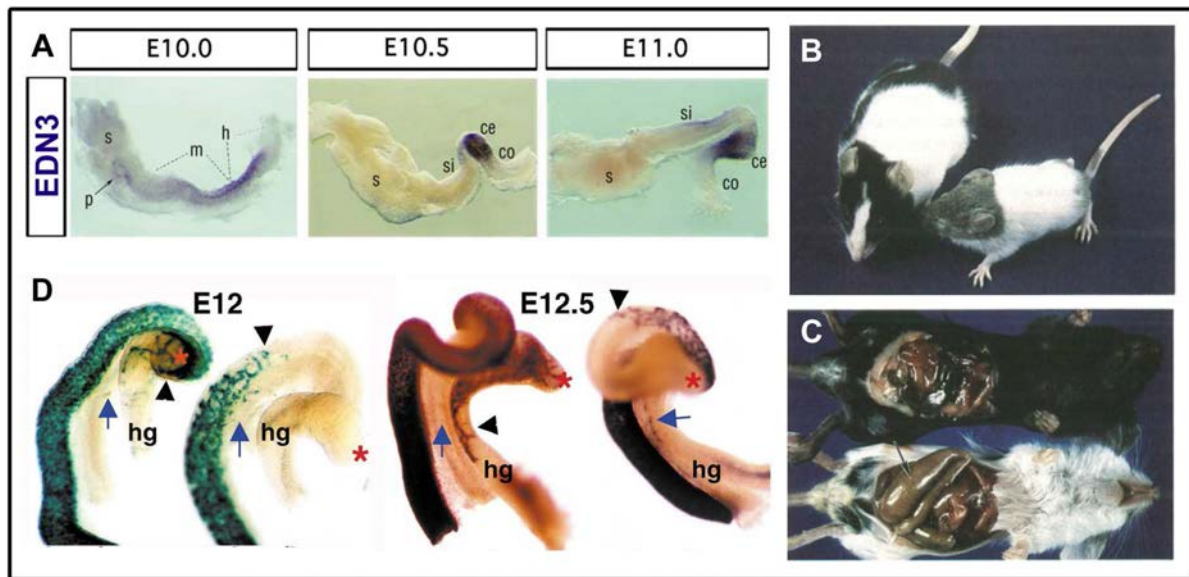


Figure 12 : La voie EDN3/EDNRB est essentielle au développement du SNE

A- Hybridations *in situ* révélant le patron dynamique de l'expression de l'EDN3 au cours du développement. Le signal est très intense au niveau du cæcum et du *hindgut* proximal à partir de E10.5 et E11 ; s= estomac, p= pancréas ; si= petit intestin ; ce= cæcum ; co= côlon (Barlow, de Graaff et al. 2003). **B,C-** Phénotypes des mutants *Edn3^{sls}*. Défaut de pigmentation (B) et mégacôlon dû à l'absence de SNE innervant le côlon distal (C) (Baynash, Hosoda et al. 1994). **D-** Retard de colonisation des CCNEs révélé par coloration X-Gal d'intestins provenant d'embryons aux stades E12 et E12.5, mutés pour *Ednrb* (lignée *Ednrb^{lacZ/LacZ}*). Chez ces mutants, les CCNEs présentent un défaut de colonisation du *midgut* distal et du cæcum (astérisques rouges) ; hg= *hindgut* (Lee 2003).

L'une des première hypothèse avancée pour expliquer ce phénotype, serait celle d'un environnement du *hindgut* non permissif à la migration des CCNEs et qui serait lié à l'accumulation anormale de Laminine $\alpha 1$ et de Collagène IV observée chez les souris mutantes *Edn3^{sls}* (Fig. 13A) (Payette, Tennyson et al. 1988; Rothman, Chen et al. 1996). De plus, des expériences de greffes montrent que les CCNEs contrôles, provenant d'un bout de cæcum ou de *midgut*, ne sont capables de coloniser qu'une petite partie du *hindgut Edn3^{sls}* aganglionique donneur au même stade embryonnaire (Fig. 13B) (Hotta, Anderson et al. 2010). L'EDN3 jouerait donc un rôle essentiel dans le **maintien d'un environnement permissif** à la migration des CCNEs. Des résultats d'apparence contradictoire ont cependant été obtenus lors de greffes de CCNEs contrôles de rats dans des *hindguts* de rats *Ednrb^{sls}* (Kruger, Mosher et al. 2003). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que chez le rat *Ednrb^{sls}*, aucune différence dans l'expression des protéines de la MEC du côlon (y compris la Laminine) chez les mutants n'ait été détectée (Newgreen and Hartley 1995).

Une deuxième hypothèse pour expliquer ce retard de colonisation observés chez les mutants, serait que la voie de signalisation EDN3/EDNRB **maintien les progéniteurs**

entériques à l'état indifférencié, puisque les CCNEs engagées dans la différenciation neuronale présentent des capacités migratoires réduites (Hao, Anderson et al. 2009). Cette hypothèse est premièrement soutenue par le fait que l'expression de la Laminine, qui favorise la différenciation neuronale des CCNEs, est augmentée chez les mutants *Edn3^{Isls}* (Payette, Tennyson et al. 1988; Chalazonitis, Tennyson et al. 1997). Deuxièmement, plusieurs résultats *in vitro* obtenus chez la souris et le poulet, montrent que l'EDN3 inhibe la différenciation neuronale et gliale. Ces résultats ont été obtenus à la fois sur des cultures mixtes de CCNEs dissociées et des cultures clonales de progéniteurs entériques purifiés mis en présence d'EDN3 (Fig. 13C) (Wu, Chen et al. 1999; Bondurand, Natarajan et al. 2006). En revanche, plusieurs études obtiennent des résultats contradictoires quant au rôle de l'EDN3 sur la différenciation neuronale *in vivo*. En effet, une étude utilisant les mutants *Edn3^{Isls}* (dont la YFP est spécifiquement exprimée par les CCN) rapporte une augmentation de la différenciation neuronale *in vivo*, indiquée par le pourcentage plus élevé de CCNEs YFP⁺/Tuj1⁺ (marqueur neuronal), mais seulement au front de migration à E11.5 à l'entrée du cæcum (Bondurand, Natarajan et al. 2006). Seulement, deux autres études n'observent pas d'augmentation *in vivo* de la différenciation neuronale : l'une utilisant des rats mutants *Ednrb^{Isls}* et l'autre des souris mutantes conditionnelles *Ednrb^{flex3flex3}* (Kruger, Mosher et al. 2003; Druckenbrod and Epstein 2009). Concernant la première étude, cette différence peut s'expliquer par (1) l'espèce (rat versus souris), (2) l'utilisation d'un marqueur neuronal différent (la Périphérine et non Tuj1) ou (3) le phénotype des CCNEs analysées (progéniteurs entériques indifférenciés P75⁺/intégrine $\alpha 4^+$ chez le rat versus CCNEs YFP⁺ chez la souris, soit toute la population dans son hétérogénéité). De plus les auteurs rapportent qu'*in vitro*, ils n'observent pas d'inhibition de la différenciation neuronale induite par le BMP4, car l'EDN3 inhibe la différenciation induite par le GDNF, comme nous le verrons dans le chapitre §II - D-a (Kruger, Mosher et al. 2003). Pour la deuxième étude, le marqueur neuronal analysé est également différent (Hu) mais en revanche le phénotype des CCNEs est le même (CCNEs YFP⁺ provenant de souris possédant la même construction transgénique que celle de l'étude de Bondurand et al, (Bondurand, Natarajan et al. 2006))(Druckenbrod and Epstein 2009). Enfin, il est important de noter pour cette deuxième étude, que seules les CCNEs sont mutées pour le récepteur EDNRB, ce qui signifie que l'environnement intestinal n'est pas touché. On ne peut donc pas négliger un effet additif des changements de l'environnement

(i.e la MEC) chez les mutants *Edn3^{Isls}* sur la différenciation qui ne serait pas présent dans les conditions décrites ci-dessus (Druckenbrod and Epstein 2009).

Les mêmes effets contradictoires ont été observés concernant le rôle de l'EDN3 sur la prolifération des CCNEs. Deux articles rapportent la diminution du taux de prolifération des progéniteurs entériques, par comptage de cellules Sox10⁺ ayant incorporées soit du phospho-histone-3 soit du BrdU provenant de cultures sur temps court d'intestins *Edn3^{Isls}* dissociés (Barlow, de Graaff et al. 2003; Bondurand, Natarajan et al. 2006). Cette diminution est encore plus nette *in vivo* au front de migration, comme révélé par comptages d'intestins marqués *in toto* (Bondurand, Natarajan et al. 2006). Ces résultats sont corroborés par une autre analyse réalisée chez l'embryon de poulet, montrant qu'un traitement à l'EDN3 induit une hyperganglionose qui est due à une augmentation de la prolifération des CCNEs (Nagy and Goldstein 2006). Néanmoins, l'étude de Kruger *et al* mentionnée précédemment et réalisée chez des rats *Ednrb^{Isls}*, bien que rapportant une réduction de 60% de la fréquence des progéniteurs entériques P75⁺/intégrine $\alpha 4^+$ à E12.5⁸, ne détecte aucun défaut de prolifération chez ces mutants entre E12.5 et E14.5 (analyses du cycle cellulaire et incorporation de BrdU par cytométrie de flux sur les progéniteurs P75⁺/intégrine $\alpha 4^+$ provenant d'intestins fraîchement dissociés) (Kruger, Mosher et al. 2003). Cependant, dans cette étude, le front de migration n'a pas été spécifiquement analysé et on ne peut, une fois de plus, exclure des différences inter-espèces. Il est donc communément admis que cette voie de signalisation est nécessaire au **maintien d'un pool de progéniteurs entériques suffisant**, d'une part **en retardant leur différenciation neuronale** et d'autre part en **maintenant un taux de prolifération suffisant au front de migration**, permettant ainsi l'extension de la colonisation.

Une étude réalisée chez des souris transgéniques, porteuses d'une construction permettant de moduler à différents stades de développement l'expression d'*Ednrb* (mis sous le contrôle d'un transactivateur tétracycline dépendant), a montré que cette voie de signalisation est requise suivant une fenêtre temporelle précise, entre E10.5 et E12.5 (Shin, Levorse et al. 1999). Cependant, nos résultats (étude des double-mutants *Edn3^{Isls}* et *Itgb1-null*) suggèrent un rôle plus précoce de cette voie de signalisation (Voir partie Résultats). De plus, dans leur étude de 2009 utilisant les mutants conditionnels *Ednrb^{flex3flex3}*, Druckenbrod

⁸Le stade E12.5 chez le rat correspond au stade embryonnaire E11.5 chez la souris

et al, rapportent un retard de colonisation visible dès E10.5 dans le *foregut* provenant probablement d'un défaut plus précoce réduisant le pool de CCNEs débutant leur colonisation (Druckenbrod and Epstein 2009). Par ailleurs, dans cette même étude, où seules les CCNEs sont mutées pour *Ednrb*, il est montré (1) que la migration des CCNEs est perturbée à leur entrée dans le *hindgut* proximal (vitesse diminuée et formation des chaînes abolie) et (2) qu'une augmentation physiologique de laminine dans le *hindgut* se produit également, reflétant la maturation normale du tissu (Druckenbrod and Epstein 2009). Cette étude met donc en avant le fait que, de manière physiologique, le tissu intestinal distal, en se développant, devient réfractaire à la migration des CCNEs, caractère accentué par l'absence d'EDN3. Ainsi, les CCNEs présentant un retard de colonisation, de par un défaut de prolifération et/ou une différenciation neuronale précoce, se verraient confrontées à un environnement non permissif, qui perturberait les processus migratoires et la formation des chaînes, empêchant toute colonisation du côlon.

Enfin, le principal argument pour expliquer le phénotype des mutants *Edn3* et *Ednrb* est celui d'un rôle de cette voie de signalisation dans les processus migratoires des CCNEs. Contrairement au GDNF, l'EDN3 n'est pas un chimio-attractant (Kruger, Mosher et al. 2003). Néanmoins, la vitesse de migration des CCNEs mutantes pour l'*Ednrb* est significativement diminuée à leur entrée dans le cæcum par rapport aux cellules contrôles (Druckenbrod and Epstein 2009). De plus l'utilisation d'un antagoniste spécifique de l'EDNRB (BQ788), sur des intestins *ex-vivo*, montre clairement un effet rapide et transitoire sur la migration des CCNEs dans le *hindgut*, qui se traduit par une diminution de leur vitesse de migration individuelle, une dissociation des chaînes, des changements morphologiques (arrondissement) et une perte de directionnalité (Fig. 13D) (Druckenbrod and Epstein 2009; Young, Bergner et al. 2014). La voie de signalisation EDN3/EDNRB semble donc également jouer **un rôle direct sur la migration des CCNEs**. Aux vues des effets rapides de l'antagoniste sur la morphologie des CCNEs, indiquant une perte d'adhérence cellules-matrice et inter-cellulaire, **il est raisonnable de penser que l'EDN3 joue également un rôle sur l'adhérence des CCNEs et cette question, qui n'a jamais été adressée directement, a fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse qui sera présenté dans la partie résultats.**

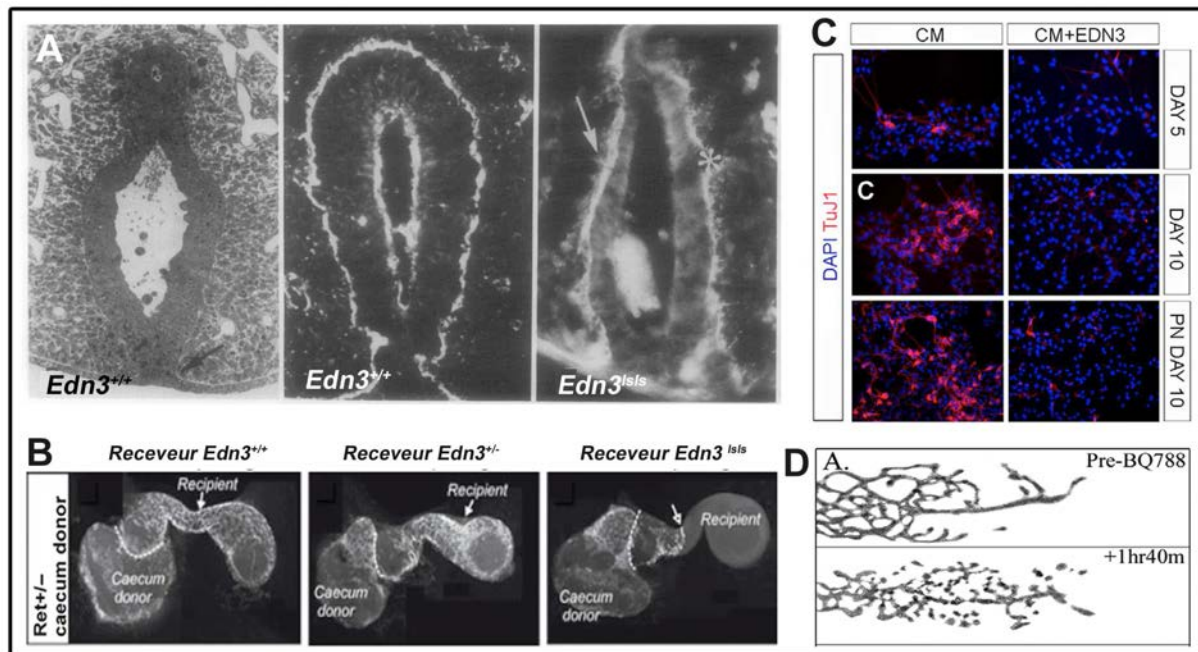


Figure 13 : La voie EDN3/EDNRB contrôle différents processus de la colonisation des CCNEs
A- Accumulation anormale de Laminine (astérisque) et épaissement de la lame basale (flèche) chez le mutant $Edn3^{sls/sls}$ révélée par immunomarquage de coupes de *hindgut* de souris à E11 (Payette, Tennyson et al. 1988). **B-** Greffes entre un cæcum (E11.5) donneur (*donor*) provenant souris contrôles $Ret^{+/-}$ (dont les CCNEs expriment spécifiquement la GFP) et un *hindgut* mutant $Edn3^{sls/sls}$ (E11.5) receveur (*recipient*). Les CCNEs contrôles colonisent sur une moins grande distance les *hindguts* mutants que les *hindguts* contrôles, indiquant que l'environnement du futur côlon est moins permissif à la migration chez le mutant $Edn3^{sls/sls}$ (Hotta, Anderson et al. 2010). **C-** Immunomarcages de colonies clonales issues de progéniteurs indifférenciés. Le traitement à l'EDN3 inhibe la différenciation neuronale des progéniteurs entériques (marquage neuronal Tuj1 (rouge)) (Bondurand, Natarajan et al. 2006). **D-** Effet de l'antagoniste de l'EDNRB (BQ788) sur la migration des CCNEs. Les chaînes de se dissocient très rapidement sous l'effet du traitement, les CCNEs se détachent les unes des autres et adoptent une morphologie ronde, le tout conduisant à un arrêt transitoire de leur migration (Druckebrodt and Epstein 2009).

II - C : Les autres facteurs impliqués dans le développement du SNE

II - C - a : Les facteurs de transcriptions

Sox10 (*SRY related HMG box*) est un facteur de transcription possédant un domaine HMG (Hight-Motility-Group) de liaison à l'ADN, dont la séquence est proche de celle du facteur de détermination sexuelle SRY (*Sex-determining Region of Y chromosome*) (Pingault, Bondurand et al. 1998). Sox10 est exprimé au niveau de la crête neurale et par toutes les CCN en délamination du tube neural, ce qui en fait un marqueur commun des CCN. Les progéniteurs entériques indifférenciés expriment donc également Sox10 lorsqu'ils colonisent l'intestin mais son expression ne sera ensuite maintenue que par les cellules gliales (Kuhlbrodt, Herbarth et al. 1998; Young, Bergner et al. 2003; Anderson, Stewart et al. 2006).

D'abord identifié chez le modèle murin spontané *Dom* (*Dominant megacolon*), (Lane and Liu 1984; Herbarth, Pingault et al. 1998; Southard-Smith, Kos et al. 1998), *Sox10* a également été découvert comme muté chez les patients atteints du syndrome de Waardenburg (de type 4) associé à un HSCR (Pingault, Bondurand et al. 1998). Les mutations à l'état homozygote de *Sox10*, chez les souris *Dom* (allèle dominant négatif) comme chez le modèle transgénique de perte de fonction *Sox10^{LacZ}* (*Knock-out*), conduisent à une aganglionose intestinale totale associée à de multiples autres défauts des dérivés de la crête neurale tels qu'une dépigmentation partielle du pelage (Lane and Liu 1984; Kapur 1999; Britsch, Goerich et al. 2001). Ce phénotype est dû à l'apoptose des CCN vagues en migration dans la région ventrale de l'embryon, avant qu'elles n'aient pu atteindre le *foregut* (Southard-Smith, Kos et al. 1998; Kapur 1999). *Sox10* est donc indispensable à la survie des CCNEs. Cependant, à l'état hétérozygote, les mutations conduisent à un phénotype moins sévère, à savoir une aganglionose distal du côlon responsable du mégacôlon, dont la pénétrance varie, ce qui est une caractéristique typique de HSCR, (Herbarth, Pingault et al. 1998; Southard-Smith, Kos et al. 1998; Paratore, Eichenberger et al. 2002). Chez ces mutants, bien qu'aucun défaut de prolifération n'ait été détecté, l'haploinsuffisance de *Sox10* est responsable d'une différenciation neuronale prématurée. Cette dernière conduit à une réduction du pool de progéniteurs capables d'auto-renouvellement et de migration efficace, les neurones différenciés présentant des capacités migratoires et prolifératives réduites (Paratore, Eichenberger et al. 2002; Young, Turner et al. 2005; Hao, Anderson et al. 2009; Walters, Cantrell et al. 2010; Corpening, Deal et al. 2011). De plus, il a été montré *in vitro* que l'expression de *Sox10* permet le maintien des CCNEs dans un état indifférencié par l'inhibition de la différenciation neuronale (Bondurand, Natarajan et al. 2006).

Sox10 contrôle également l'expression de deux gènes cibles, eux-mêmes essentiels à la formation du SNE et à la survie des CCNEs: ***Ret*** (Lang, Chen et al. 2000) et ***Ednrb*** (Zhu, Lee et al. 2004). L'activation de *Ret* nécessite l'association de *Sox10* avec PAX3 (Lang, Chen et al. 2000).

En parallèle, des études de double-mutants ont permis d'identifier en partie le réseau d'interactions génétiques impliquant *Sox10* et d'autres gènes importants du développement du SNE tels que les facteurs de transcription ***Zeb2*** (Stanchina, Van de Putte et al. 2010), ***Sox8*** (Maka, Claus Stolt et al. 2005) et ***Phox2b*** (Owens, Broman et al. 2005). Les double-mutants étant caractérisés par une aggravation du phénotype entérique (i.e un retard de la

colonisation des CCNEs) par rapport aux simples mutants respectifs et aux contrôles, ce qui correspond à la définition d'une interaction génétique. Il est également important de noter que des interactions génétiques entre *Sox10*, *Edn3* et *Ednrb* ont été mises en évidence (Stanchina, Baral et al. 2006) et seront décrites dans le chapitre § II - D- a. Enfin, Nadège Bondurand et Yuli Watanabe (INSERM U955, Créteil) en collaboration avec notre équipe ont également montré pour la première fois l'existence d'une interaction génétique entre *Sox10* et *Itgb1* (gène codant la sous unité $\beta 1$ des intégrines) ainsi que le rôle de *Sox10* dans l'adhérence des CCNEs (Fig. 15) (Watanabe, Broders-Bondon et al. 2013). Ces dernières interactions seront présentées le chapitre §III, paragraphe III - D. Enfin, **L1CAM**, codant des molécules d'adhérence intercellulaires, agit comme gène modificateur de *Sox10* (Wallace, Schmidt et al. 2010).

Phox2b est un facteur de transcription à homéodomaine de type « *paired* ». Il est exprimé par tous les précurseurs neuronaux du système nerveux autonome dont les CCN vagales, chez qui l'expression précède celle de *Sox10* (Pattyn, Morin et al. 1999; Anderson, Stewart et al. 2006) . Ainsi comme indiqué dans le paragraphe §II - A - b, toutes CCNEs expriment *Phox2b* (Young, Hearn et al. 1998). Chez l'homme, des mutations de *Phox2b* génèrent le syndrome central d'hypoventilation associé à un HSCR avec des neuroblastomes et glioblastomes (Amiel, Laudier et al. 2003). Les souris transgéniques *Phox2b^{lacZ}* présentent quant à elle une aganglionose totale, y compris de l'estomac, due à un défaut de survie précoce des CCNEs avant et pendant leur colonisation du *foregut* (Pattyn, Morin et al. 1999). Enfin, le contrôle de la survie des CCNEs par *Phox2b* se ferait par la régulation directe de l'expression de *Ret* (Pattyn, Morin et al. 1999).

II - C - b : Les morphogènes

Les **BMPs** sont des morphogènes sécrétés de la famille des TGF- β , dont la liaison aux récepteurs va induire la cascade de signalisation SMAD (Zwijnsen, Verschueren et al. 2003). Comme mentionné précédemment, les BMPs sont impliquées dans l'induction de la crête neurale, dans les interactions bi-directionnelles entre le mésenchyme et l'épithélium intestinal et font partie des acteurs moléculaires importants du *patterning* longitudinal et de la différenciation radiale de l'intestin embryonnaire. Les BMPs sont également impliquées dans l'ontogénèse du SNE (Fig. 10A) (De Santa Barbara, Williams et al. 2005; Goldstein, Brewer et al. 2005). En effet, les BMPs moduleraient la migration des CCNEs et leur réponse

au GDNF, bien que des effets contradictoires du blocage de cette voie aient été observés entre le poulet (Goldstein, Brewer et al. 2005) et la souris (Fu, Vohra et al. 2006). Elles contrôleraient également la densité des ganglions entériques, leur agrégation et la fasciculation des neurites (Chalazonitis 2004; De Santa Barbara, Williams et al. 2005; Fu, Vohra et al. 2006). Pour aller dans le même sens, il a été montré *in vitro* chez le rat, que de faibles concentrations de **BMP-4** ou **BMP-2** induisent la différenciation neuronale des CCNEs (mais de façon transitoire), l'agrégation des ganglions et que le BMP-4 interagirait fonctionnellement avec le GDNF pour limiter la taille des ganglions entériques (Chalazonitis 2004)

SHH est un autre morphogène également exprimé par l'épithélium intestinal et qui diffuse dans le mésenchyme adjacent formant un gradient de concentration radial (Fu 2004; Nagy, Barad et al. 2016). Tout comme les BMPs, **SHH** est essentiel à la morphogénèse de l'intestin embryonnaire ainsi qu'au développement du SNE (Roberts, Johnson et al. 1995; Ramalho-Santos, Melton et al. 2000). Il a été montré chez le poulet, par des techniques d'ablation d'épithélium intestinal, que ce dernier pouvait inhiber la formation des ganglions entériques (Sukegawa, Narita et al. 2000). Les auteurs de cette étude proposent que cette inhibition se fait via SHH, car son blocage conduit à une augmentation du nombre de ganglions et à leur localisation ectopique, proche de l'épithélium, où ils ne se trouvent pas en temps normal (Sukegawa, Narita et al. 2000). Ces dernières observations sont également faites chez des souris mutantes *Shh*^{-/-} (Ramalho-Santos, Melton et al. 2000). Une autre étude réalisée chez la souris, démontre que SHH joue un rôle direct sur les CCNEs qui expriment le récepteur à SHH (Ptc1). SHH inhibe à la fois l'effet chimio-attractant du GDNF et son effet sur la différenciation neuronale des CCNEs et induit leur prolifération (Fu 2004). De plus, le rôle indirect du SHH sur la migration des CCNEs a également été démontré très récemment chez le poulet (Nagy, Barad et al. 2016). Dans cette étude, les auteurs montrent que la surexpression de SHH conduit à l'aganglionose du *hindgut*. Cette inhibition de la colonisation se ferait indirectement par l'augmentation de l'expression de protéines de la MEC non permissives à la migration des CCNEs tel que le Collagène IX, Versicane ou encore les chondroïtines sulfates (Nagy, Barad et al. 2016).

Nous pouvons également citer d'autres morphogènes impliqués dans la formation du SNE tels que les nétrines (**Netrine-1 et -3**), impliquées dans la migration radiale des CCNEs pour la formation du plexus sous-muqueux (Jiang 2003) ; les sémaphorines (**Sema3A**), dont

l'effet répulsif sur les CCNEs permet leur rétention dans le plexus pelvien avant que ces dernières ne colonisent le *hindgut* distal (Anderson, Bergner et al. 2007) et enfin l'**acide rétinolique** qui est nécessaire à la migration des CCNEs (Fu, Sato et al. 2010).

II - C – c : Les molécules d'adhérences

Le mode de migration collectif des CCNEs, qui se fait par contacts transitoires répétés entre les CCNEs voisines, ainsi que la formation de chaînes labiles au front de migration sont des processus faisant appels aux molécules d'adhérence intercellulaire.

Les **L1CAM** sont exprimées par les CCNEs dès E10.5 et permettent en partie la formation des chaînes et l'adhérence des CCNEs entre elles (Anderson, Turner et al. 2006). Bien que les souris invalidées pour ce gène ne présentent pas d'aganglionose intestinale, une mutation a tout de même été décrite chez un patient présentant HSCR associé à une hydrocéphalie liée au chromosome X renforçant l'idée que cette molécule joue un rôle dans le développement du SNE. De plus, il a été montré que *L1CAM* agit comme un gène modificateur de *Sox10* influençant la pénétrance de la mutation (Wallace, Schmidt et al. 2010).

Les **NCAM** sont d'autres molécules d'adhérence intercellulaire exprimées par les CCNEs et les cellules mésenchymateuses (Fu, Vohra et al. 2006). L'ajout post-traductionnel d'acide polysialique (PSA) aux NCAM (**PSA-NCAM**) a été montré comme diminuant leurs adhérences homophiliques et pouvant réduire la migration des CCNEs *in vitro* (Fu, Vohra et al. 2006). Cette même étude suggère que l'effet négatif du BMP-4 sur la migration des CCNEs souris (pour rappel, ce phénomène n'est pas observé chez le poulet) serait dû à l'activation de la polysialylation des NCAM des CCNEs (Fu, Vohra et al. 2006). Les PSA-NCAM jouent également un rôle dans l'agrégation des ganglions entériques (Fu, Vohra et al. 2006)

Notre équipe a montré que la **N-Cadhérine** est également exprimée par les CCNEs et que l'ablation conditionnelle du gène, réduit leur adhérence intercellulaire et modifie leur directionnalité de migration *in vivo*. En revanche, la vitesse de migration ne semble pas impactée (Broders-Bondon, Paul-Gilloteaux et al. 2012). De plus, nous avons très récemment montré que la N-Cadhérine joue un rôle important dans la migration collective des CCNEs en réponse au complément anaphylatoxine C3a, dont elles expriment le récepteur (C3aR) (Broders-Bondon, Paul-Gilloteaux et al. 2016). Chez le xénope, la balance entre la co-attraction régulée par C3a, agissant de façon paracrine sur les CCN, et la redirection de

migration après contact dépendante de la N-cadhérine joue un rôle important dans le contrôle de la migration collective des CCN crâiales (Carmona-Fontaine, Theveneau et al. 2011). Nous avons pu mettre en évidence pour la première fois chez la souris que ce type de processus joue également un rôle durant la colonisation de l'intestin embryonnaire par les CCNEs.

Enfin, notre équipe a mis en évidence il y a quelques années, que les intégrines- $\beta 1$, principaux récepteurs à la MEC, sont également indispensables à la colonisation des CCNEs (Fig. 10B) (Breau, Pietri et al. 2006; Breau and Dufour 2009). La famille des intégrines et leur rôle dans le développement du SNE seront détaillés dans le chapitre §III.

II – D : Interactions fonctionnelles et génétiques de la voie EDN3/EDNRB

II - D- a: Interactions génétiques et fonctionnelles entre les voies EDN3/EDNRB et GDNF/RET

Le cæcum et le *hindgut* proximal présentent donc une forte expression du GDNF (Fig. 11E et 12A) (Natarajan, Marcos-Gutierrez et al. 2002). Le GDNF étant un chimio-attractant pour les CCNEs, **comment expliquer que ces dernières poursuivent la colonisation du futur côlon distal une fois la zone la plus concentrée en chimio-attractant atteinte?** De manière intéressante, ces zones sont également riches en EDN3 et il a été montré que l'EDN3 pouvait neutraliser l'effet chimio-attractant du GDNF *in vitro*, résultat qui illustre les interactions fonctionnelles entre ces deux voies de signalisation (Fig. 14A) (Barlow, de Graaff et al. 2003; Kruger, Mosher et al. 2003; Nagy and Goldstein 2006). Plusieurs études ont montré que la voie EDN3/EDNRB module les effets de la voie GDNF/RET/GFR α . Par exemple, en plus de son effet inhibiteur sur la chimio-attraction du GDNF, l'EDN3 inhibe également la différenciation neuronale induite par ce dernier (Fig. 14A et B, Fig. 15B) (Hearn, Murphy et al. 1998; Wu, Chen et al. 1999). L'EDN3 augmente également l'effet proliférateur du GDNF sur les CCNEs progénitrices, comme démontré *in vitro* par l'augmentation du taux de CCNEs Ret⁺/Tuj1⁻ marquées par la phospho-histone3 (marqueur mitotique) provenant de cultures de cæcums dissociés à E11.5 doublement traités par le GDNF et l'EDN3 (Fig. 14C) (Barlow, de Graaff et al. 2003). Ainsi, bien que la voie EDN3/EDNRB ait un effet antagoniste sur la migration et la différenciation neuronale induite par le GDNF, il semblerait que les deux voies de signalisation agissent en synergie *in vitro* pour augmenter la prolifération des CCNEs. Ce processus est indispensable pour assurer la colonisation de toute la longueur de l'intestin.

Cette synergie a également été mise en évidence *in vivo* chez la souris et chez l'Homme (Carrasquillo, McCallion et al. 2002; Barlow, de Graaff et al. 2003; McCallion, Stames et al. 2003). Par exemple, les double-mutants $Ret^{51/51}; Edn3^{ls/ls}$ (Ret^{51} est un isoforme hypomorphe de RET (de Graaff, Srinivas et al. 2001) présentent un phénotype aggravé par rapport aux intestins sauvages et simples mutants respectifs, avec une colonisation qui ne dépasse pas l'estomac chez les double-mutants (Fig. 14D) (Barlow, de Graaff et al. 2003). Une fois de plus, un phénotype entérique aggravé est la signature d'une synergie entre les deux voies et démontre une interaction génétique entre les loci *Ret* et *Edn3*. De plus, ce phénotype renforce l'idée que la voie EDN3/EDNRB n'est pas simplement requise pour la colonisation du cæcum et du *hindgut* mais qu'elle agit également plus tôt, lors de la colonisation du *midgut*.

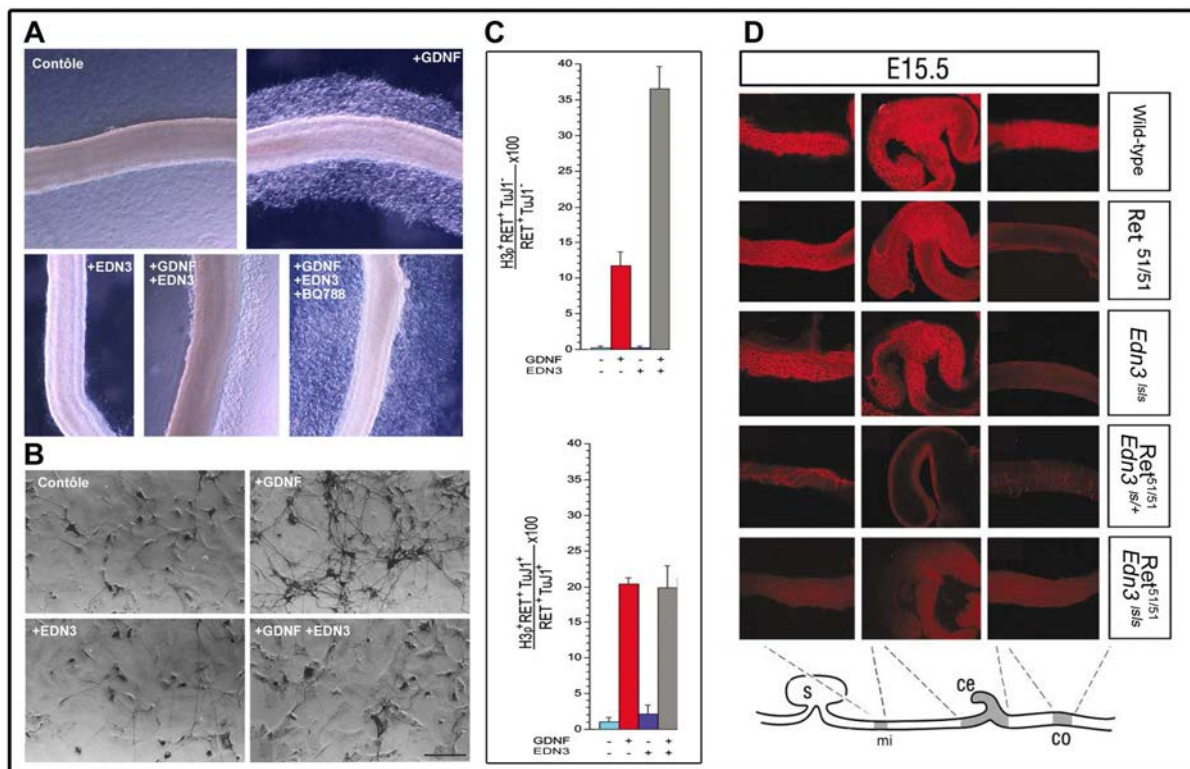


Figure 14 : Interactions génétiques et fonctionnelles entre les voies EDN3/EDNRB et GDNF/RET

A- L'EDN3 inhibe l'effet chimio-attractant du GDNF. *Hindgut* embryonnaire de poulet mis en culture dans un gel de collagène (Nagy and Goldstein 2006). **B-** L'EDN3 inhibe la différenciation neuronale induite par le GDNF. Marquage NF (neurones) de cultures de CCNEs dissociées, provenant de *midguts* de poulet (E4.5) et triées par billes magnétiques à l'aide de l'anticorps HNK-1 (Hearn, Murphy et al. 1998). **C-** Effet synergique du GDNF et de l'EDN3 sur la prolifération des CCNEs. Pourcentage de CCNEs progénitrices ($Ret+/Tuj1-$; graph du haut) neurones entériques immatures ($Ret+/Tuj1+$; graph du bas) en prolifération ($H3p+$, phospho-Histone H3) provenant de cultures de cæcum de souris à E11.5. **D-** Interaction génétique entre *Ret* et *Edn3*. Immunofluorescence Tuj1 d'intestins embryonnaires de souris. Le schéma du bas représente l'intestin et les zones grisées les prises de photos (s : estomac ; mi : *midgut* ; ce : cæcum ; co : côlon) (Barlow, de Graaff et al. 2003).

II - D- b: Interactions génétiques entre les voies EDN3/EDNRB et les autres gènes du développement du SNE

Dans leur étude parue en 2004, Zhu et al, ont montré que **l'enhanceur d'Ednrb possédait 3 sites de fixation de Sox10 (I, II et III)** situés entre 1,2 kPb et -160pb en amont de l'ATG, dont le site II est indispensable à l'activation de son expression qui se produit peu avant l'invasion du cæcum entre E10.5 et E12.5 (Fig. 15B) (Zhu, Lee et al. 2004).

Cependant, tout comme avec la voie de signalisation GDNF/RET, **une interaction génétique entre l'Edn3, l'Ednrb et Sox10** a également été mise en évidence lors du développement du SNE et d'autres dérivés de la crête neurale par deux équipes (Cantrell 2004; Stanchina, Baral et al. 2006). Tous les double-mutants testés, $Sox10^{Dom/+}; Ednrb^{sls}$ (Cantrell 2004), $Sox10^{Dom/+}; Ednrb^{s/s}$ (mutation « piebald » hypomorphe d'EDNRB conduisant à la production de seulement 30% du transcrit) $Sox10^{Dom/+}; Edn3^{sls}$ (Stanchina, Baral et al. 2006) présentent une aggravation du phénotype entérique à la naissance et ne survivent pas plus de quelques dizaines de jours. Dans leur étude visant à analyser les défauts cellulaires à l'origine de cette sévérité du phénotype entérique, Stanchina *et al*, ont montré que la colonisation était retardée chez les double-mutants $Sox10^{Dom/+}; Edn3^{sls}$ et $Sox10^{Dom/+}; Ednrb^{s/s}$ à E13.5, chez qui les CCNEs atteignent seulement la sortie de l'estomac (Fig. 15A) (Stanchina, Baral et al. 2006). Ce défaut de colonisation est visible dès E10 et peut s'expliquer en partie par une apoptose des CCNEs entre E9.5 et E10 à leur entrée dans le *foregut*, ce qui réduit le pool de cellules disponibles (Stanchina, Baral et al. 2006).

Ainsi Sox10 et la voie EDN3/EDNRB agissent en synergie très tôt au cours du développement du SNE, entre la délamination du tube neural et avant l'entrée dans l'intestin des CCN vagues pré-entériques. Cette étude nuance donc une fois de plus les conclusions obtenues par les deux équipes mentionnées précédemment qui ont analysées la fenêtre temporelle durant laquelle la voie EDN3/EDNRB serait nécessaire, soit entre E10.5 et E12.5, au moment de la colonisation du cæcum et du *hindgut* par les CCNEs (Shin, LeVorse et al. 1999; Zhu, Lee et al. 2004).

Enfin, **L1CAM agit également comme gène modificateur d'Edn3 et Ednrb**, les double-mutants présentant une aggravation de l'aganglionose du côlon qui remonte jusqu' au *midgut* distal (Fig. 15B) (Wallace, Tan et al. 2011).

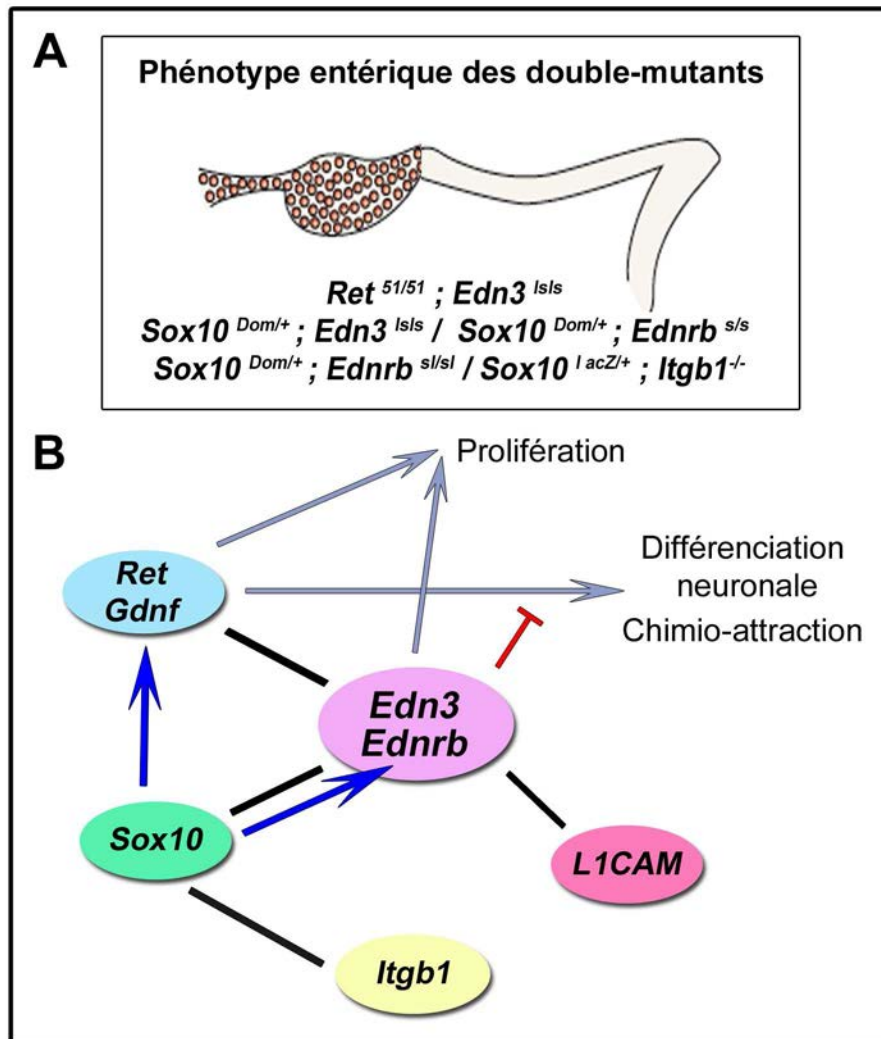


Figure 15 : Interactions génétiques et fonctionnelles entre de l'EDN3/EDNRB et certains acteurs moléculaires du développement du SNE.

A- Schéma illustrant le défaut entérique des double-mutants (Sasselli, Pachnis et al. 2012). **B-** Schéma récapitulant certaines interactions génétiques et fonctionnelles de l'EDN3 au cours du développement du SNE. Les traits noirs indiquent les interactions génétiques, les flèches bleues indiquent un contrôle de l'expression génétique, les flèches grises et rouges les interactions fonctionnelles.

En conclusion, les études de génétique humaine et des modèles murins de HSCR ont permis de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires et des interactions génétiques gouvernant le développement du SNE. Entre autres, plusieurs facteurs de transcriptions (Sox10), des morphogènes (SHH et BMPs), des molécules d'adhérence intercellulaires (L1CAM et N-Cadhérine) et deux voies de signalisations primordiales (GDNF/RET et EDN3/EDNRB) sont mises en exergue quant à leurs rôles sur la survie, la prolifération, la migration et la différenciation des CCNEs. **Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons plus particulièrement à la voie EDN3/EDNRB.** Bien que son rôle dans la colonisation des CCNEs fasse consensus, certains résultats concernant son effet sur la prolifération et la différenciation des CCNEs ainsi que la fenêtre spatio-temporelle durant laquelle elle semble requise divergent selon les études.

Pour réconcilier les résultats décrits et discutés précédemment concernant cette voie de signalisation, nous pouvons proposer le modèle suivant: (1) EDN3/EDNRB agit en synergie avec Sox10 et la voie GDNF/RET avant et au moment de l'entrée des CCN vagues pré-entériques dans le *foregut*. Ces coopérations assurent ainsi leur survie et permettent l'expansion d'un pool suffisant de CCNEs capables de coloniser tout l'intestin embryonnaire. Ensuite, (2) entre E10.5/E12.5, EDN3/EDNRB est nécessaire et indispensable à l'invasion du cæcum et du *hindgut* proximal, où l'EDN3 et le GDNF sont fortement exprimés. *Ednrb* est « surexprimé » à ce moment-là par Sox10, ce qui permet (3) de préserver les CCNEs au front de migration de la différenciation neuronale précoce induite par le GDNF et de réduire son effet chimio-attractant pour permettre la poursuite de la colonisation de ces dernières. (4) EDN3/EDNRB permet également le maintien d'un environnement permissif du côlon en régulant l'expression de protéines de la MEC telles que la Laminine. Enfin (5) L'EDN3 semble également influencer directement les capacités migratoires et d'adhérence des CCNEs.

Cependant, l'impact de l'EDN3 sur les propriétés adhésives des CCNEs à la MEC n'a jamais été caractérisé. De même, alors qu'une interaction génétique entre l'EDN3 et les molécules d'adhérence intercellulaires L1CAM a été établie, aucune étude n'a été réalisée à ce jour concernant les interactions génétiques et fonctionnelles entre l'EDN3 et les récepteurs adhésifs à la MEC que sont les intégrines- β 1. Pourtant, les intégrines sont également indispensables au développement du SNE, comme nous allons le décrire à présent. En effet, de manière intéressante, le phénotype des mutants *Itgb1* ressemblent aux mutants *Edn3^{Isls}* et *Ednrb^{-/-}*.

III - Les intégrines et le développement du SNE

III – A : Famille et structure des intégrines

Les intégrines sont les principaux récepteurs adhésifs des cellules impliqués dans la liaison à la MEC. Elles peuvent également former des adhérences cellules-cellules en interagissant avec des protéines appartenant à d'autres classes de récepteurs adhésifs (Tamkun, Simone et al. 1986; Hynes and Lander 1992). Les intégrines sont des hétérodimères constitués d'une chaîne α et d'une chaîne β associées de manière non covalente. Chez les mammifères, on dénombre 18 chaînes α et 8 chaînes β , qui s'associent pour former 24 combinaisons, déterminant ainsi les 24 types d'intégrines. C'est la combinaison de ces deux chaînes $\alpha\beta$ qui assigne la reconnaissance spécifique du ligand de la MEC. Les sous-unités α et β ainsi que leurs associations et leurs spécificités à la MEC sont listées dans la figure (Fig. 16A). Chacune de ces 24 intégrines semblent avoir des fonctions spécifiques, comme attesté par les différences de phénotypes observées lorsque l'expression de chacune des sous-unités α ou β est perdue chez les souris invalidées pour les gènes correspondant ou « *knock-out* » (Bouvard, Brakebusch et al. 2001; Hynes 2002). Le phénotype le plus sévère et le plus précoce est observé lorsque le gène *Itgb1* codant la sous-unité $\beta1$ est invalidé, causant la létalité péri-implantatoire de l'embryon (au stade E5.5) (Fässler and Meyer 1995; Stephens, Sutherland et al. 1995). La gravité de ce phénotype s'explique par le fait que la sous-unité $\beta1$ est celle pouvant se combiner avec le plus de sous-unités α (12 sous-unités) et parce qu'elle est exprimée de manière quasi-ubiquitaire. Cependant, en fonction de leur type cellulaire, les cellules n'expriment pas toutes les sous-unités et possèdent ainsi un répertoire spécifique d'intégrines. Par exemple, les sous-unités $\beta2$ et $\beta7$ ne sont exprimées que par les cellules leucocytaires.

Les intégrines possèdent un domaine N-terminal extracellulaire portant des sites de liaison à la MEC, un seul domaine transmembranaire et un court domaine C-terminal cytoplasmique associé au cytosquelette d'actine via un groupement protéique complexe que nous décrivons un peu bas dans le paragraphe III - B-c (Tamkun, Simone et al. 1986). Les intégrines forment donc un lien physique entre la MEC et le cytosquelette d'actine de la cellule (Hynes 2002).

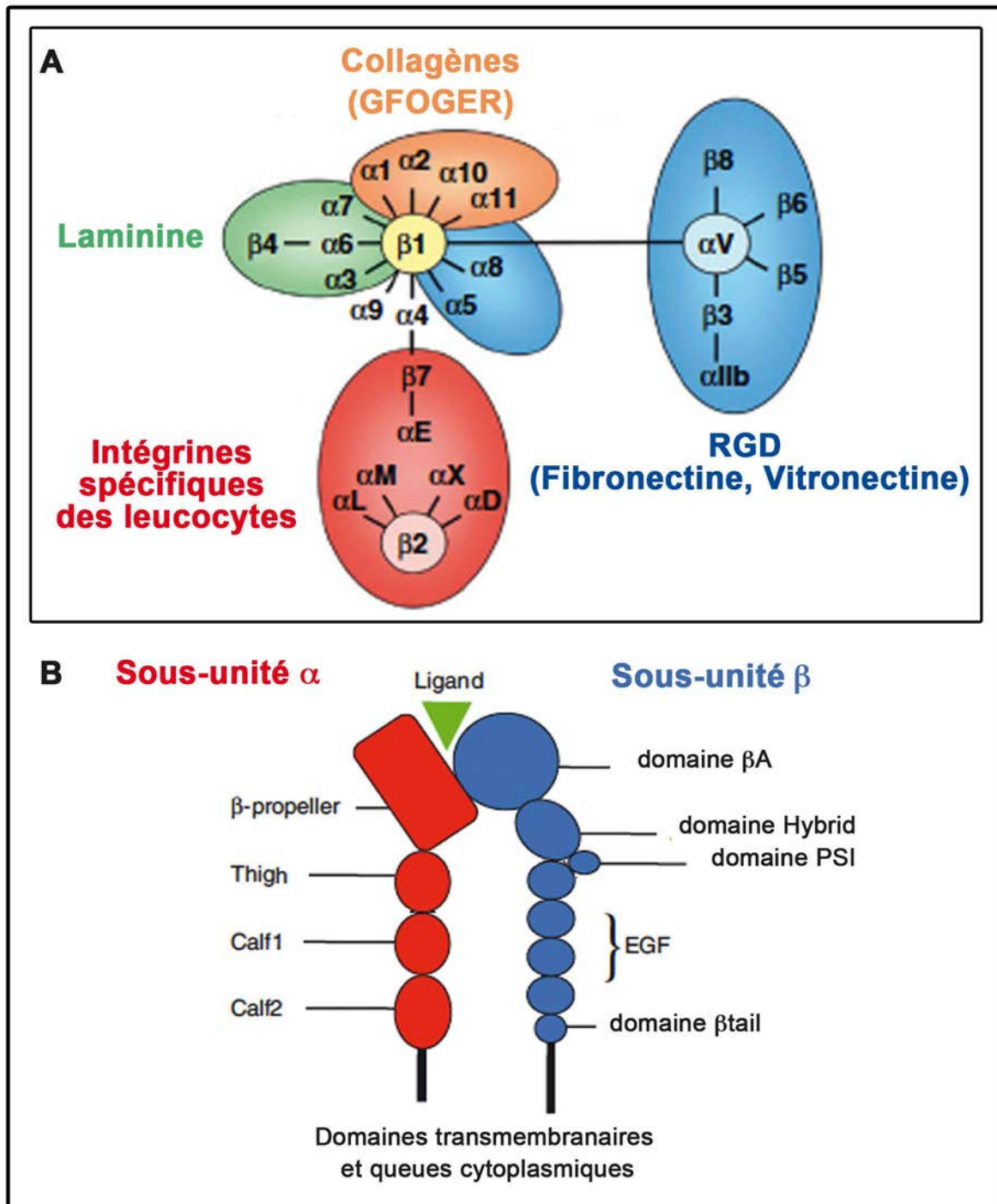


Figure 16 : La famille des intégrines et leur structure protéique

A- Schéma représentant les 24 hétérodimères d'intégrines et leur ligand spécifique principal. La Fibronectine et la Vitronectine représentent les principales protéines de la MEC possédant un motif RGD. La reconnaissance des Collagènes se fait par le motif GFOGER (Margadant, Monsuur et al. 2011). B- Structure détaillée du domaine extracellulaire des intégrines. La liaison du ligand se fait à cheval entre les domaines β -propeller et βA . Les domaines transmembranaires et cytoplasmiques sont représentés en noir mais non détaillés (Askari, Buckley et al. 2009)

Les données de cristallographie et de microscopie électronique ont permis de résoudre les structures des parties extracellulaires de certaines intégrines telles que : $\alpha V\beta 3$ (Xiong, Stehle et al. 2001; Xiong, Stehle et al. 2002) ; $\alpha II_b\beta 3$ (Zhu, Luo et al. 2008) et $\alpha 5\beta 1$ liée à la Fibronectine (Takagi, Strokovich et al. 2003; Nagae, Re et al. 2012). En se basant sur la structure de la sous-unité $\alpha V\beta 3$, nous pouvons décrire les différents domaines composant les sous-unités α et β (Fig. 16B), de la partie externe vers le domaine cytoplasmique, comme suit :

- **La partie extracellulaire de la sous-unité α** (Fig. 16B) est composée d'un domaine **β -propeller**, d'un domaine **Tight** puis de deux domaines **Calf** (« *Calf-1 et Cal-2 domains* ») (Argraves, Pytela et al. 1986; Xiong, Stehle et al. 2001). Cependant et contrairement à la sous-unité αv , 9 des 18 sous-unités α présentent un domaine supplémentaire inséré dans le domaine β -propeller, le **domaine I/A** contenant un motif **MIDAS** (*Metal Ion Dependant Adhesion Site*) qui est le site de liaison du ligand et participe à la coordination des cations bivalents (Mg^{2+} , Mn^{2+}) (Lee, Rieu et al. 1995).

- **La partie extracellulaire de la sous-unité β** (Fig. 16B) est composée d'un **domaine βA** qui est homologue au domaine I/A (contenant un motif **MIDAS** avec en plus un motif **ADMIDAS** adjacent), suivi d'un **domaine Hybrid**, d'un **domaine PSI** (pour pléxine-sémaphorine-intégrines, car il présente des homologies de séquences), puis de 4 **domaines EGF** successifs (de EGF-1 à-4), riches en cystéines et présentant des homologies de séquences avec le facteur de croissance EGF et enfin du domaine βTD (*tail domain*) (Xiong, Stehle et al. 2001).

La reconnaissance spécifique par les intégrines de certaines protéines de la MEC fait intervenir des motifs tri-peptidiques tels que le motif **RGD** (Arginine-Glycine-Acide Aspartique (Danilov and Juliano 1989)) de la Fibronectine et de la Vitronectine, ainsi que le motif **GFOGER** du collagène natif (Glycine-Phénylalanyne-Hydroxyproline-Glycine-Arginine (Knight, Morton et al. 2000)). La séquence RGD se fixe spécifiquement sur le domaine I/A via le motif MIDAS de la sous-unité α lorsque que ce domaine est présent. Sinon, pour les intégrines dont la sous-unités α ne comporte pas le domaine I/A, la liaison de la séquence peptidique RGD se fait à cheval entre les domaines β -propeller de la sous-unité α et le domaine βA via les motifs MIDAS et ADMIDAS, comme le révèle la structure

cristallographique de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ en complexe avec le peptide ligand cyclo-RGD (Fig. 16B et Fig. 17B) (Xiong, Stehle et al. 2002)

- **Pour les parties transmembranaires et cytoplasmiques des sous-unités α et β** , chacune d'elle possède un seul domaine transmembranaire, dont les séquences sont très conservées entre les différentes sous-unités, associé à une queue cytoplasmique courte (une cinquantaine de résidus, à l'exception de la sous-unité $\beta 4$) (Larson, Corbi et al. 1989; Hughes, Diaz-Gonzalez et al. 1996; Lau, Kim et al. 2009). Toutes les sous-unités α possèdent dans leur queue cytoplasmique un motif très conservé **GFFKR**, situé proche du domaine transmembranaire, et qui serait le site potentiel de la formation d'un pont salin avec la sous-unité β bien qu'une étude fine de la structure de ces domaines ne rapporte pas la présence de ponts-salins (Hughes, O'Toole et al. 1995; De Melker, Kramer et al. 1997; Zhu, Luo et al. 2009). Ce motif a été montré comme essentiel à la dimérisation de la sous-unité $\alpha 6$ avec la sous-unité $\beta 1$, ce qui permet l'adressage à la membrane de l'intégrine et son maintien en état de basse affinité pour les ligands (O'Toole, Katagiri et al. 1994; De Melker, Kramer et al. 1997).

Les parties cytoplasmiques ne possèdent pas d'activité catalytique intrinsèque, cependant la queue cytoplasmique de la sous-unité β possède des motifs de liaisons **NPxY** (Asparagine-Proline-x-Tyrosine) reconnus par le domaine **PBT** (*Phosphotyrosine binding domain*) portés de nombreuses protéines partenaires des intégrines telles que la Taline et les Kindlines qui régulent l'activité et les voies de signalisations induites par ces dernières (Calderwood, Yan et al. 2002)

III – B : Activation et signalisation des intégrines

III – B-a : Les changements conformationnels conduisant à l'activation des intégrines

Les intégrines sont des protéines allostériques, puisque leur affinité de liaison dépend de leur conformation (Sims, Ginsberg et al. 1991). Cependant, il ne fut pas aisé d'établir un lien direct entre une conformation donnée et la capacité de liaison au ligand, ni de déterminer si les changements conformationnels étaient de type «tout ou rien» ou bien s'il existait plusieurs états conformationnels intermédiaires du récepteur.

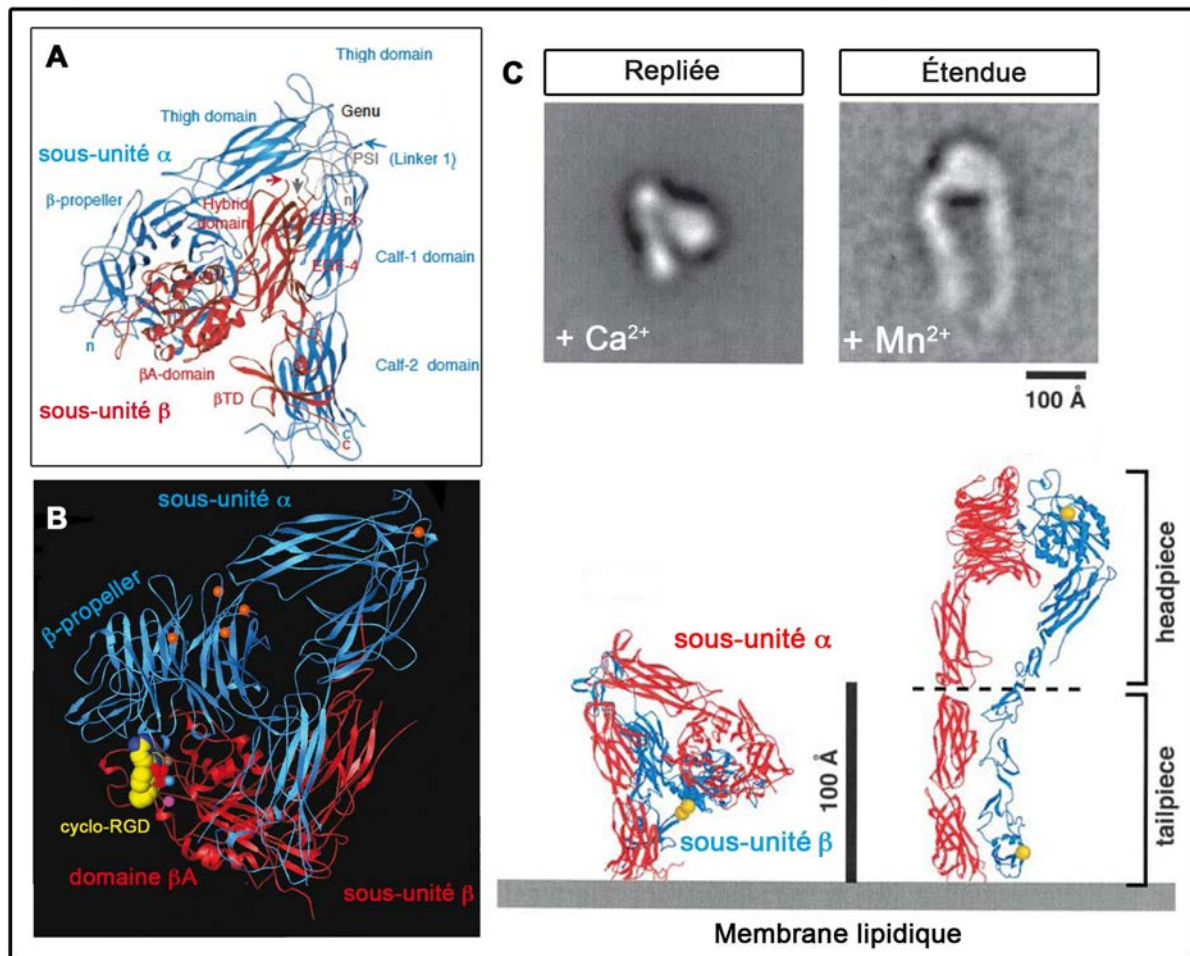


Figure 17 : Les changements conformationnels des intégrines

A- Structure cristallographique repliée du domaine extracellulaire des $\alpha\text{V}\beta3$ activées dépourvues des domaines transmembranaires et cytoplasmiques. «*genu*» représente le point de courbure de la structure (Xiong, Stehle et al. 2001). **B-** Cette conformation repliée permet bien la fixation du ligand artificiel cyclo-RGD via les domaines β -propeller et βA , ce qui ne modifie que très peu la conformation repliée comme montré sur cette structure cristallographique (Xiong, Stehle et al. 2002). **C-** Conformation repliée (en présence de Ca^{2+}) et dépliée (en présence de Mn^{2+}) des intégrines $\alpha\text{V}\beta3$ possédant les domaines transmembranaires et cytoplasmiques visualisées par microscopie électronique. Dans le panneau du bas, à gauche est présentée la même structure représentée en A, et à droite, sa conformation alternative dépliée visualisée en présence de Mn^{2+} . La barre grise du bas symbolise la position de la membrane plasmique (Takagi, Petre et al. 2002).

Par exemple, les données structurales de cristallographie de la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha\text{V}\beta3$ activée (**i.e dans le sens de capable de fixer un ligand**), dépourvue de ses parties transmembranaire et cytoplasmique, montrent **une conformation repliée**, dont les domaines β -propeller et βA sont proches des domaines Calfs (Fig. 17A) (Xiong, Stehle et al. 2001). Les auteurs stipulent clairement que cette conformation correspond à la conformation « activée », mais si on extrapole ce repliement à la surface de la cellule, cela rapproche de la membrane plasmique le site de fixation du ligand, ce qui ne semble pas être favorable à la fixation des protéines de la MEC. Les mêmes auteurs l'année suivante

confirment leurs résultats, et démontrent que cette conformation permet bien **la fixation d'un court ligand artificiel** (cyclo-RGD). De manière surprenante, cette fixation ne modifie que très peu la conformation repliée (Fig. 17B) (Xiong, Stehle et al. 2002). Pour autant, ces analyses de cristallographie sont réalisées sur des intégrines dépourvues de domaines transmembranaires et cytoplasmiques, qui par ailleurs jouent un rôle important dans la physiologie et les changements de conformation de intégrines. Se pose donc la question suivante: **les intégrines repliées sont-elles inactives ou actives en condition physiologique?** Dans une très élégante étude publiée en parallèle, Il a été montré par l'utilisation d'un modèle plus physiologique (des intégrines $\alpha V\beta 3$ possédant une partie C-terminale cytoplasmique et exprimées à la surface membranaire de cellules), que le blocage en conformation repliée⁹ de ces dernières réduisait dramatiquement la liaison à la Fibrinogène (Takagi, Petre et al. 2002). Ceci est dû au fait que la conformation repliée, contrairement la conformation étendue présente une plus faible affinité pour les ligands physiologiques de types Fibrinogène et Vitronectine, (Takagi, Petre et al. 2002). Dans la même étude, les auteurs rapportent également que l'activation de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ par les cations Mn^{2+} ou par le cyclo-peptide RGD induit un changement conformationnel d'un état replié à étendu (Fig. 17C). Ces changements conformationnels sont facilités par la rupture des liaisons entre les queues cytoplasmiques des chaînes α et β , rupture qui induit également l'augmentation de l'affinité pour les ligands physiologiques (Takagi, Petre et al. 2002). Les différences de changements de conformation observées entre ces études peuvent s'expliquer en partie par le fait que la structure cristalline de l'intégrine stabilise sa conformation repliée, limitant les degrés de mouvements de la protéine une fois liée au ligand (Takagi, Petre et al. 2002). En outre, toujours dans la même étude, les auteurs rapportent que 10% des intégrines maintenues en condition de faible affinité pour le ligand (i.e en présence de Ca^{2+} et avec liaison des parties cytoplasmiques par pont disulfure) présentaient une conformation moins compacte que les autres et que celle observée par Xiong *et al.*, adoptant plutôt une forme en V (Takagi, Petre et al. 2002).

Par ailleurs, l'utilisation de la technique FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) a permis de mesurer le mouvement d'éloignement de la partie terminale des

⁹ Le blocage se fait par la formation d'un pont disulfure entre le domaine β -propeller de la sous-unité α et le domaine EGF-4 de la sous-unité $\beta 3$, ce qui maintient l'intégrine en conformation repliée. La formation du pont-disulfure est rendue possible par le remplacement d'un acide-aminé dans chacun des domaines cités précédemment par une cystéine.

intégrines $\alpha 4\beta 1$ de la membrane (i.e le passage d'une conformation repliée à ouverte) lorsqu'elles sont soumises à plusieurs agonistes tels que les cations Mn^{2+} ou bien par stimulation *inside-out* via l'activation du « *Formyl peptide receptor* » (Chigaev, Buranda et al. 2003). Il semblerait que la fixation du ligand par les intégrines ne nécessite pas nécessairement une extension complète de la conformation repliée, de même que le degré de dépliage de l'intégrine varie en fonction du type de stimulation (Chigaev, Buranda et al. 2003).

Il est donc important de noter qu'un modèle dichotomique de l'activation des intégrines où les intégrines en conformation repliée sont inactives et celles en conformation étendue sont actives est à nuancer. En effet, nous venons de montrer qu'un certain pourcentage d'intégrines « inactivées » présentaient une conformation moins compacte, en forme de V, de même que des intégrines activées peuvent fixer des ligands mimétiques de type cyclo-RGD tout en restant en conformation compacte ($\alpha V\beta 3$) ou partiellement repliée ($\alpha 4\beta 1$) (Fig. 17B). En revanche, il semblerait que ce soit la conformation étendue qui présente le degré le plus haut d'affinité pour les ligands physiologiques de plus grosses tailles telles que le fibrinogène et la Vitronectine. La conformation repliée présentant quant à elle une très faible affinité pour ces ligands dans les mêmes conditions. Ainsi, il semblerait que la conformation ne détermine pas tant l'état d'activation mais plutôt le degré d'affinité pour la liaison au ligand. On peut cependant résumer trois états conformationnels majeurs : une conformation repliée de faible affinité pour le ligand, une conformation dépliée de forte affinité et enfin la conformation liée au ligand, dite « occupée », bien qu'il existe des états intermédiaires, de conformations partiellement dépliées (Askari, Buckley et al. 2009; Xu, Kim et al. 2016).

III – B-b: Activation et signalisation «inside-out»/«outside-in» des intégrines

La régulation dynamique et réversible de l'affinité des intégrines pour leurs ligands est cruciale pour le déclenchement de processus biologiques uniquement lorsque les besoins sont présents. Un des exemples très souvent cité pour illustrer le rôle crucial de cette régulation est le cas des plaquettes sanguines. Ces dernières expriment les intégrines $\alpha IIb\beta 3$, qui doivent être constitutivement maintenues inactives, pour n'être activées qu'au moment des lésions endothéliales où les plaquettes vont se lier au Fibrinogène soluble et s'agglutiner au niveau de la liaison pour éviter l'hémorragie. À l'inverse, la perte de contrôle

pathologique de cette activation peut conduire à la formation de thrombus et au déclenchement de thrombose (i.e formation de caillot sanguin par agrégation des plaquettes). Pour les autres types d'intégrines, cette activation pathologique est associée à des maladies inflammatoires et à la progression tumorales des carcinomes par exemple (Bouvard, Pouwels et al. 2013). **Comment sont donc régulés les changements conformationnels des intégrines par la cellule elle-même ?**

Premièrement, l'une des particularités des intégrines est ce que l'on appelle la **signalisation «inside-out»** qui permet à la cellule de réguler de manière fine l'activation des intégrines qu'elle exprime à sa membrane par des signaux intracellulaires (Fig. 18).

Comme mentionné précédemment, l'association des sous-unités α et β à la fois au niveau cytoplasmique (par des interactions dénommées « claps » via le motif GFFKR de la sous-unité α et les pont-salins) et transmembranaire (par deux points d'interactions intramembranaires dénommés IMC et OMC¹⁰) stabilisent la conformation repliée de faible affinité des intégrines (Fig. 18-1, premier encadré) (Hughes, Diaz-Gonzalez et al. 1996; Lau, Kim et al. 2009). **Un des mécanismes de l'activation des intégrines se fait par la dissociation des domaines transmembranaires et cytoplasmiques.** En effet, la rupture de ces liaisons et l'éloignement de ces domaines déstabilisent les parties extracellulaires de l'hétérodimère, par la propagation des changements conformationnels au travers de la membrane ce qui facilite le passage à une conformation dépliée de plus haute affinité (Kim, Carman et al. 2003; Luo, Springer et al. 2004; Lau, Kim et al. 2009).

Une des protéines cytoplasmiques fondamentales de l'activation *inside-out* des intégrines est la **Taline** (Calderwood, Zent et al. 1999). Cette dernière active les intégrines en se fixant sur le motif NPXY de la sous-unité β via son site PBT contenu dans le sous-domaine F3 (lui-même contenu dans le domaine FERM) ce qui a pour conséquence la séparation des parties transmembranaires α et β et le dépliement des parties extracellulaires (Fig. 18-2, deuxième encadré) (Calderwood, Zent et al. 1999; Calderwood, Yan et al. 2002; Tadokoro, Shattil et al. 2003; Wegener, Partridge et al. 2007; Anthis, Wegener et al. 2009; Ye, Hu et al. 2010). La Taline stabilise également la conformation dépliée des intégrines de par la formation d'une liaison supplémentaire à la membrane plasmique via un autre sous-domaine F2 contenu lui aussi dans le domaine FERM (Anthis, Wegener et al. 2009; Lau, Kim

¹⁰ IMC et OMC : Inner and Outer Membrane Association Motifs

et al. 2009). Enfin, la Taline se lie directement au cytosquelette d'actine et à la Vinculine via son large domaine C-terminal ROD, faisant ainsi partie des protéines principales formant un lien physique entre les intégrines et le cytosquelette d'actine (Fig. 18) (Critchley 2009).

De même, comme démontré par des études à la fois *in vivo* et *in vitro*, les Kindlines (dont la famille comporte les trois membres suivant : Kindline-1, -2 et -3) sont également des régulateurs important de l'activation des intégrines et qui agissent en synergie avec la Taline (Kloeker, Major et al. 2004; Ma, Qin et al. 2008; Montanez, Ussar et al. 2008; Moser, Nieswandt et al. 2008). Les Kindlines comportent également un domaine FERM et se fixent également sur le domaine cytoplasmique de la sous-unité β via le deuxième motif **NPxY** (Kloeker, Major et al. 2004; Harburger, Bouaouina et al. 2009; Moser, Bauer et al. 2009).

Enfin, il est important de noter qu'il existe également des inhibiteurs cytoplasmiques de l'activation des intégrines, telles que les protéines **ICAP-1** (*Integrin Cytoplasmic domain Associated Protein 1*), la **Filamine**, qui entrent directement en compétition avec la fixation sur la queue cytoplasmique β de la Taline et les Kindlines, ainsi que des protéines inhibitrices se fixant sur la sous-unité α comme la **Sharpine** (Régent, Planus et al. 2011; Pouwels, Nevo et al. 2012).

Deuxièmement, les intégrines peuvent également être activées par des signaux extérieurs, comme la liaison aux protéines de la MEC, qui entraînent le dépliement du domaine extracellulaire comme mentionné précédemment (Takagi, Petre et al. 2002; Chigaev, Buranda et al. 2003). Cette activation par le ligand conduit également à la propagation du changement conformationnel au travers de la membrane plasmique et à la séparation des domaines transmembranaires et cytoplasmiques des deux sous-unités (Kim, Carman et al. 2003). Cette séparation a été montrée comme indispensable aux déclenchements des signalisations intracellulaires dites **signalisation «outside-in»** (Zhu, Carman et al. 2007). En effet, les intégrines ne possédant pas d'activité catalytique intrinsèque, la libération des queues cytoplasmiques permet le recrutement, en particulier au niveau de la sous-unité β , de plusieurs protéines cytoplasmiques partenaires formant un large complexe protéique dénommé **«adhésome»** qui interagit avec le cytosquelette et permet la transduction des signaux intracellulaires (Zaidel-Bar, Itzkovitz et al. 2007; Bouvard, Pouwels et al. 2013).

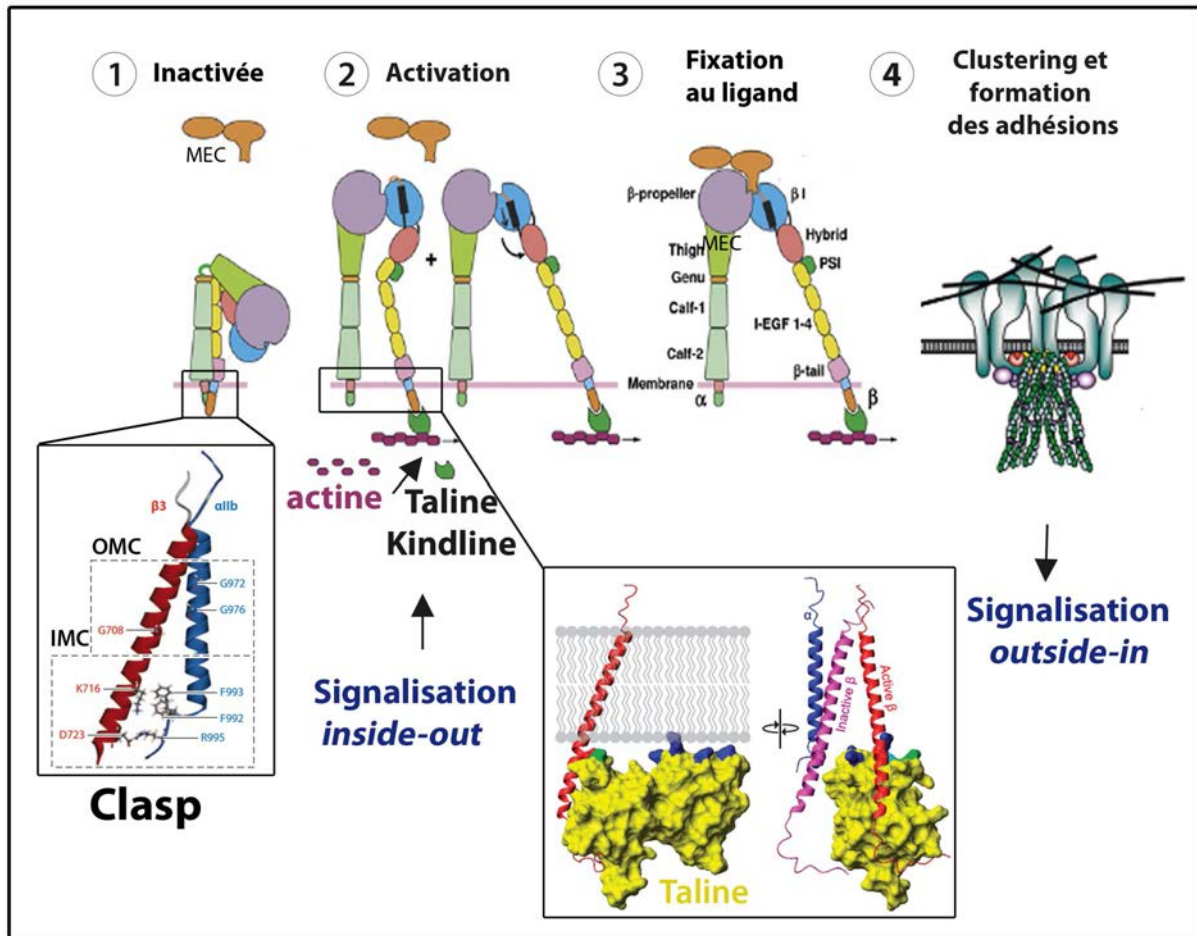


Figure 18 : Les étapes de l'activation *inside-out* des intégrines

Les intégrines sont en conformation de basse affinité (1) avec le domaine extracellulaire replié. Cet état est stabilisé par les associations IMC et OMC des domaines transmembranaires illustrés dans le premier encadré. La signalisation *inside-out* conduit à la fixation des Kindlines et de la Taline sur la queue cytoplasmique de la sous-unité β (deuxième encadré) ce qui conduit à la séparation des domaines transmembranaires et cytoplasmiques des deux sous-unités, induisant le dépliement du domaine extracellulaire et le passage à une conformation de haute affinité pour les ligands de la MEC. Cette étape correspond à l'activation des intégrines (2). La fixation à la MEC peut alors se produire ainsi que la liaison au cytosquelette d'actine (3) se qui stabilise l'état activé et qui entraîne le rapprochement ou « *clustering* » des intégrines, la formation des adhésions, le recrutement des autres partenaires cytoplasmiques ainsi que le déclenchement de la signalisation *outside-in* (4) (Zhu, Luo et al. 2008; Anthis, Wegener et al. 2009; Kim, Ye et al. 2011; Margadant, Monsuur et al. 2011)

III – B-c: L'Adhésome : complexe protéique associé aux intégrines et voies de signalisation

Dans une revue parue récemment, combinant une analyse des données de la littérature et des bases de données numériques, il est montré que plus de 200 partenaires forment le vaste réseau protéique qu'est l'adhésome. C'est protéines interagissent également entre elles pour moduler leurs activités ou affinités pour d'autres partenaires cytoplasmiques. **Environ 140 protéines résident au niveau du site d'adhérence** et plus de 80 ne s'associent que transitoirement avec ce dernier (Winograd-Katz, Fassler et al. 2014).

Cependant, environ une soixantaine de protéines sont fréquemment retrouvées et constituent « **l'adhésome consensus** », dont un sous-ensemble de protéines peut être recruté spécifiquement selon le contexte physiologique, les types d'intégrines engagées ou les ligands. Les sites d'adhérence intégrines-MEC représentent donc de véritables plateformes moléculaires d'une incroyable complexité (Byron and Frame 2016).

Parmi les protéines de l'adhésome consensus on retrouve les protéines qui jouent un rôle crucial dans la maturation, le désassemblage et le renouvellement ou « *turnover* » ainsi que dans la signalisation des sites d'adhérence, telles que :

- La **Taline** qui est essentielle à l'activation des intégrines, à la formation des adhérences de par sa liaison au cytosquelette d'actine et au recrutement d'autres protéines de l'adhésome en particulier la Vinculine (Anthis, Wegener et al. 2009; Anthis and Campbell 2011).
- La **Vinculine**, qui se lie également au filament d'actine et à l' **α -actinine** (Goldmann 2016). La Taline associée à la Vinculine joue un rôle primordial dans la formation et la stabilisation des adhérences intégrines-MEC (Goldmann 2016).
- La **Paxilline** se fixe directement à la Vinculine et aux intégrines et participe à leur activation. Elle possède plusieurs domaines d'interactions protéines-protéines et des sites de phosphorylation, ce qui fait qu'elle est la cible de plusieurs partenaires protéique, les « attirant » ainsi au niveau des sites d'adhérences tels que **ILK** (*Integrin-linked Kinase*) ou encore **JNK** (*Jun N-terminal kinase*) (Deakin and Turner 2008; Vicente-Manzanares, Choi et al. 2009) .
- La **Zyxine**, qui possède un domaine LIM comme la Paxilline, est essentielle à la formation et la stabilisation des fibres de stress d'actine rattachées aux contacts focaux et permet le recrutement de plusieurs partenaires comme l' **α -actinine**. De plus c'est une protéine sensible aux forces mécaniques (Smith, Hoffman et al. 2014) .
- La **FAK** (*Focal Adhesion Kinase*) qui possède une activité tyrosine kinase et se lie également directement à la Taline. Avec **Src**, elles sont indispensables pour la régulation d'autres protéines comme la Paxilline notamment.

Ainsi les intégrines, par le biais de cet adhésome dont nous n'avons décrit qu'une infime partie, déclenchent de nombreuses voies de signalisations qui régulent également de nombreux processus cellulaires fondamentaux comme l'adhérence, la polarité, la migration, la survie/l'apoptose, la prolifération, l'expression génétique et la différenciation (Fig. 18) (Hynes 2002). En outre, certaines voies de signalisations sont communes à celles pouvant être déclenchées par des facteurs de croissance, telles que la voie Ras-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), la voie PI3K-AKT (phosphoinositide 3-kinase), la voie des Rho-GTPases et la voie JNK (Fig. 19) (Hynes 2002; Ivaska and Heino 2011).

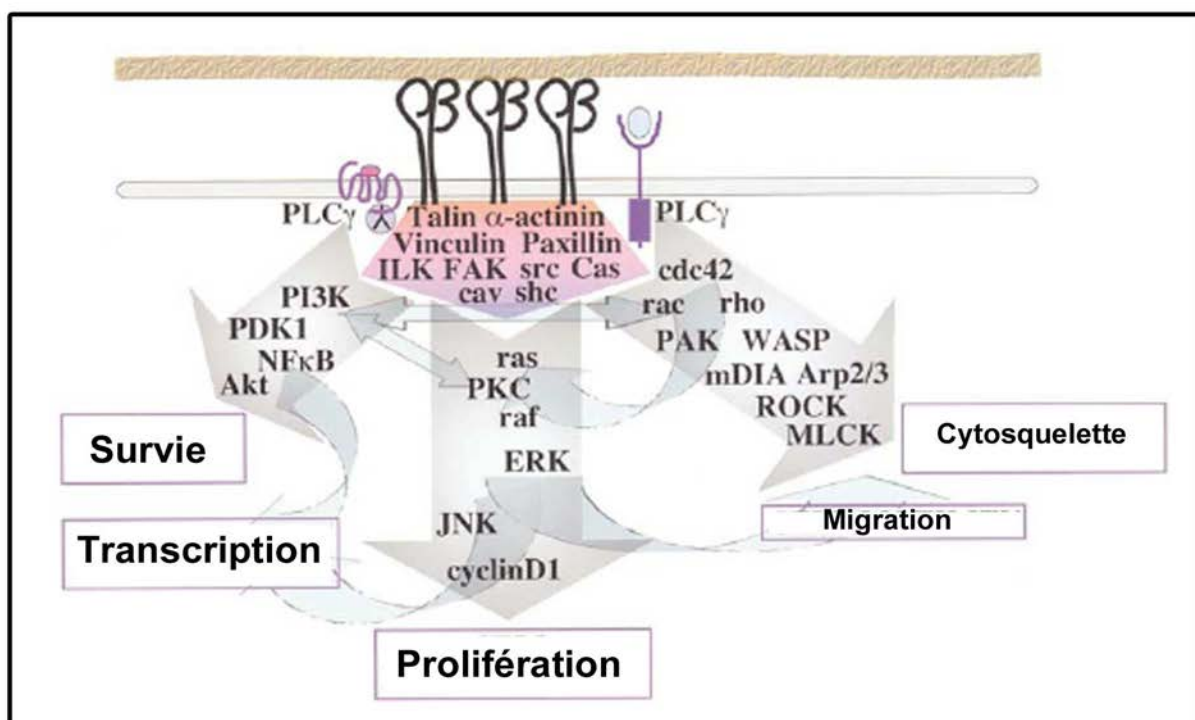


Figure 19 : Exemples de voies de signalisation *outside-in* déclenchées par l'activation des intégrines.

Certaines voies de signalisation sont communes à d'autres récepteurs comme les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G et les récepteurs tyrosine kinase. Dans l'encadré rose sont représentées certaines protéines de l'adhésome (Hynes 2002).

En conclusion, les intégrines **transmettent des signaux bidirectionnels** de part et d'autre de la membrane plasmique. L'activation *inside-out* des intégrines et/ou leur liaison à la MEC vont permettre de réguler de nombreux processus cellulaires clés par le déclenchement de nombreuses voies de signalisation (*outside-in*). Ainsi les intégrines et l'adhérence des cellules à la MEC font parties des acteurs fondamentaux de la physiologie

cellulaire. Nous allons nous concentrer à présent sur les structures d'adhérence formées par les intégrines et leurs rôles dans la migration cellulaire.

III– C : Les intégrines, l'adhérence et la migration cellulaire

III – C-a: Les structures d'adhérence à la MEC dépendantes des intégrines

La liaison à la MEC et l'activation des intégrines va conduire au *clustering* de ces dernières, étape indispensable au recrutement du complexe protéique cytoplasmique, à la liaison au cytosquelette d'actine et à la formation de structures d'adhérence dites **adhérences focales** (Fig. 18) (Miyamoto, Akiyama et al. 1995). Les études de cellules en culture 2D sur des supports rigides, ont permis de caractériser en partie les étapes dynamiques de la formation de ces adhérences focales. Basés sur leur localisation subcellulaire, leur taille et leur composition moléculaire, les adhérences focales ont ainsi pu être classées selon plusieurs types (Scales and Parsons 2011). Il faut cependant garder à l'esprit que la distinction entre ces types n'est pas stricte et que la notion de continuum est préférable (Fig. 20A encadré) (Parsons, Horwitz et al. 2010).

Les adhérences naissantes formées par les intégrines $\alpha V\beta 3$, sont les plus immatures, d'aspect ponctiforme ($<1\mu\text{m}$), se forment en bordure du lamellipode des cellules en migration (Fig. 20A, astérisque et C). Ces adhérences naissantes possèdent un *turnover* rapide (cycle d'assemblage/désassemblage) d'environ 60 secondes (Choi, Vicente-Manzanares et al. 2008). Leur formation est dépendante de Rac1 (protéines de la familles des Rho-GTPases) car elle conduit à la production de PIP2 indispensable au recrutement et à l'activation de la Taline elle-même indispensable à la formation des adhérences (Auer and Jacobson 1995; Nobes and Hall 1995; Tolia, Cantley et al. 1995; Martel, Racaud-Sultan et al. 2001). Cela conduit au recrutement d'autres protéines de l'adhésome consensus telles la Vinculine et l' α -actinine qui lient également les intégrines à l'actine corticale puis la Paxilline et la FAK (Choi, Vicente-Manzanares et al. 2008). La maturation de certaines adhérences naissantes en complexes focaux serait en partie due au couplage des intégrines au flot rétrograde d'actine¹¹ qui induit un stress mécanique de traction sur les adhérences naissantes des cellules en migration. En effet, l'inhibition de ce flot par la Cytochalasine D¹²

¹¹ Voir paragraphe III – C-b suivant pour le détail du flot rétrograde.

¹² Bloque la polymérisation de l'actine.

bloque leur maturation, de même que l'inhibition de la myosine II. Cependant seule la maturation est dépendante de la myosine II mais non les premières étapes de la formation des sites adhésifs (Alexandrova, Arnold et al. 2008; Choi, Vicente-Manzanares et al. 2008; Gardel, Sabass et al. 2008)

Les complexes focaux sont localisés plus en arrière du lamellipode à la bordure du lamellum (Fig. 20C). Ils sont un peu plus allongés (1 à 2 μ m) et leur durée de vie est légèrement augmentée (<5 minutes). Les immunomarquages ont révélé qu'ils contiennent α V β 3, la Taline et la Paxilline, qui semblent être recrutées en premier, suivi de la Vinculine et la FAK (qui semblent présentes en moindre concentration). Ils ne contiennent cependant pas la Tensine et la Zyxine (Zaidel-Bar 2003). Leur formation est également dépendante de Rac1 (Nobes and Hall 1995; Rottner, Hall et al. 1999). Les adhérences naissantes et les complexes focaux sont associés à l'actine présente dans le lamellipode.

Les contacts focaux représentent les adhérences cellulaires les mieux caractérisées. Au niveau du lamellum, ils proviennent de la maturation de certains complexes focaux, dont la taille augmente (de 3 à 10 μ m) ainsi que le *turnover* (>10 minutes). Leur composition est enrichie en α 5 β 1, Paxilline, Vinculine, FAK et ils contiennent également la Zyxine et la Tensine alors absentes des autres adhérences (Fig. 20A flèche blanche, B et C) (Rottner, Hall et al. 1999; Zamir, Katz et al. 1999; Zamir, Katz et al. 2000; Zaidel-Bar 2003). La maturation des complexes focaux en contacts focaux est dépendante de RhoA (un membre de la famille des Rho-GTPases), via son action sur ROCK qui de manière directe et indirecte active la myosine II. Ceci génère la contractilité intracellulaire dont dépend à la fois la formation de fibres de stress et des contacts focaux qui leurs sont associés (Nobes and Hall 1995; Chrzanowska-Wodnicka and Burridge 1996; Rottner, Hall et al. 1999; Watanabe, Kato et al. 1999). La contractilité intracellulaire générée par la myosine II associée au cytosquelette d'actine induit des forces de traction sur les contacts focaux qui sont directement transmises à la MEC ou au support (Balaban, Schwarz et al. 2001). **Ainsi, c'est par le biais de ces adhérences que les cellules «sondent» les propriétés mécaniques de leur support et adaptent leur comportement, ce qui fait des contacts focaux des acteurs de la mécanosensation et de la mécanotransduction** (Wang, Butler et al. 1993). Ces phénomènes sont détaillés dans le chapitre § IV.

Les **adhérences fibrillaires** sont composées quant à elles des intégrines α 5 β 1 mais comportent moins de Paxilline et de Vinculine (Fig. 20A) (Zamir, Katz et al. 1999). Elles ne

sont observées que sur des supports de Fibronectine. Ces adhérences sont retrouvées plus au centre de la cellule et sont de taille plus fine et allongée que les contacts focaux dont elles proviennent, par translocation centripète des $\alpha 5\beta 1$ et leur association avec la Tensine le long des fibres de stress d'actine (Fig. 20A) (Pankov, Cukierman et al. 2000; Zamir, Katz et al. 2000). Cette translocation est une fois de plus dépendante de la contractilité intracellulaire (générée par la myosine II et les Rho-GTPases) qui créent des forces de tension au niveau des adhérences fibrillaires, ce qui a pour conséquence l'étirement de la Fibronectine, le dévoilement de ses sites cryptiques et son assemblage à la surface cellulaire en fibrilles (Pankov, Cukierman et al. 2000; Zamir, Katz et al. 2000; Mao and Schwarzbauer 2005). **Les adhérences fibrillaires sont donc des sièges de la fibrillogénèse.**

Enfin, nous pouvons également citer la famille des **invadosomes comprenant les podosomes** qui arborent une forme d'anneau organisée autour d'un cœur d'actine et dont les constituants protéiques sont proches de ceux retrouvés chez les autres structures d'adhérences citées précédemment. Ils sont particulièrement observés chez les dérivés monocytaires et sont impliqués dans le remodelage de la MEC (Fig. 20A) (Geiger and Yamada 2011).

La caractérisation de ces structures d'adhérences s'est majoritairement faite sur des cellules en 2D, mais les cellules évoluent naturellement dans des environnements tridimensionnels. Des études ont été réalisées sur des cellules intégrées dans des supports 3D de type gel de collagène purifié, matrigel ou déposées sur des matrices extracellulaires 3D produites en culture in vitro. Dans ces conditions, les cellules forment un type d'adhérence regroupant des caractéristiques identifiées pour les différents types d'adhérences décrites en 2D (Fig. 20A). Les protéines impliquées dans l'adhérence 2D sont donc retrouvées dans les **adhérences 3D**. Les différences proviennent principalement des proportions retrouvées (co-localisation bien plus importante de la Paxilline et des intégrines $\alpha 5\beta 1$ par exemple dans des matrices comportant de la Fibronectine), du niveau plus faible de phosphorylation de la FAK ou encore de la durée de vie des adhérences qui semble plus importante en 3D (Doyle and Yamada 2016).

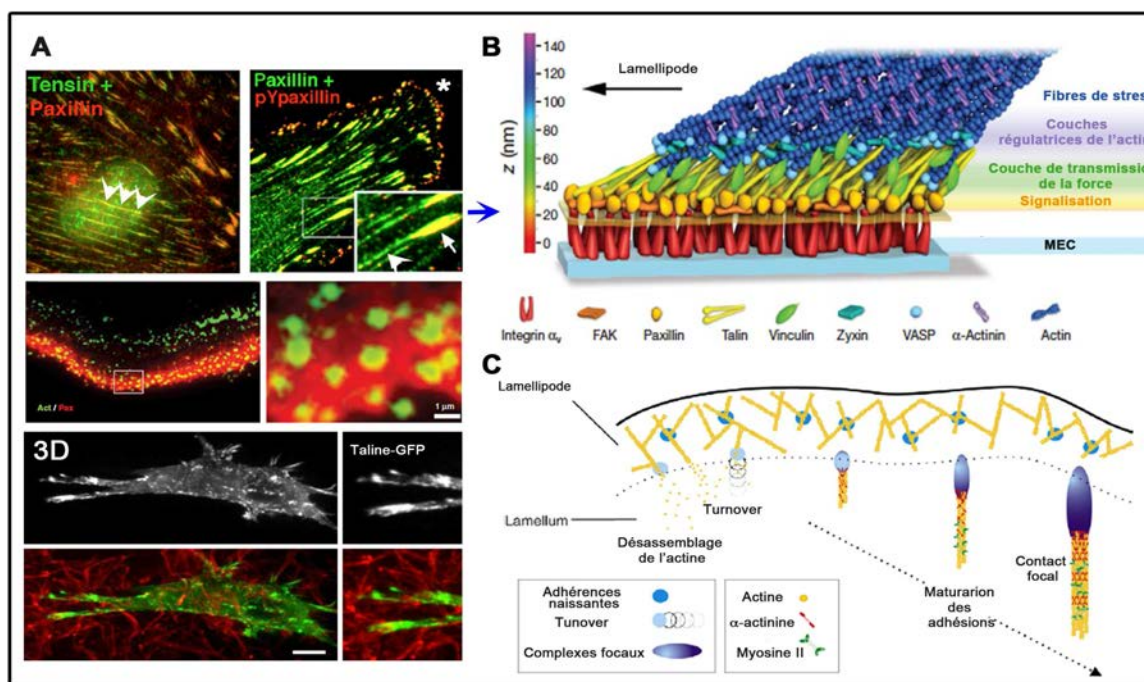


Figure 20 : Les adhérences focales formées par la liaison des intégrines à la MEC

A- Immunofluorescence illustrant les différents types d'adhérence formés par les cellules. Dans les deux premiers panneaux sont visualisées les adhérences naissantes (*, panneau de droite), les contacts focaux (flèche) associés aux adhérences fibrillaires (pointe de flèche). Les adhérences fibrillaires sont positives pour la Tensine (pointes de flèches, panneau de gauche) (Geiger and Yamada 2011). Les panneaux intermédiaires montrent des podosomes. Les panneaux du bas représentent les adhérences focales en 3D de fibroblastes humains dans un gel de collagène. Echelle: 10 μm (Doyle and Yamada 2016). **B-** Reconstitution 3D de la structure des contacts focaux à l'échelle du nanomètre permettant de visualiser l'agencement des différentes couches du complexe protéique associé aux intégrines (Kanchanawong, Shtengel et al. 2010). **C-** Schémas de la maturation des adhérences focales situées dans la zone du lamellum (Vicente-Manzanares, Choi et al. 2009)

III – C-b: Les adhérences dépendantes des intégrines et la migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus fondamental que l'on retrouve dans plusieurs phénomènes biologiques physiologiques tels que la réponse immunitaire et inflammatoire, la réparation tissulaire et l'embryogénèse. En outre, le dérèglement de la migration cellulaire est impliqué dans différentes pathologies, de même que l'acquisition d'un phénotype migratoire durant le processus de cancérogenèse favorise la dispersion des métastases.

Bien que plusieurs types de migration ont été décrits, comme la migration amiboïde (Friedl and Wolf 2010), nous ne développerons dans cette partie que le cas de la migration 2D de type mésenchymateuse. Cette migration se fait par un cycle de plusieurs étapes distinctes qui se répètent : **la protrusion, l'adhérence, la traction et la rétraction** (Fig. 21A). Premièrement, la cellule étend une protrusion membranaire, le lamellipode. Les

lamellipodes sont des structures instables qui s'étendent et se rétractent. Pour que la migration se fasse, le lamellipode doit se stabiliser et la formation d'adhérences naissantes à sa périphérie participe à cette stabilisation. Ces adhérences forment des points d'ancrages et de traction pour les cellules, qui vont mûrir et permettre à ces dernières de se propulser. Enfin, à l'arrière de la cellule, le désassemblage des adhérences à la MEC et la rétraction du corps de la cellule lui permettent d'avancer, ce qui complète ainsi le cycle (Fig. 21A) (Nobes and Hall 1995; Webb, Parsons et al. 2002).

L'élongation du lamellipode produite par la polymérisation de l'actine corticale se fait notamment par le **complexe ARP2/3**, qui en associant des monomères d'actine sur des filaments d'actine préexistants, génère de nouveaux branchements (Reinhard, Jouvenal et al. 1995; Krause and Gautreau 2014). La polymérisation de l'actine à l'avant du lamellipode génère le **flot rétrograde d'actine**, par la combinaison des effets (1) de la « résistance » de la membrane qui crée une « poussée » sur le réseau d'actine préexistant vers l'arrière et (2) des forces de traction créées par la myosine II, associée à ce même réseau d'actine plus au centre de la cellule (Fig. 21B, schémas du haut) (Alexandrova, Arnold et al. 2008; Lai, Szczodrak et al. 2008; Yang, Zhang et al. 2012). **Les adhérences focales, par leur association au cytosquelette d'actine, freinent ce flot rétrograde en « encaissant » les forces de traction qu'il génère et qu'elles transmettent ainsi à la MEC en « tirant » dessus** (Giannone, Mège et al. 2009). **La tension ainsi créée permet en partie leur maturation** (Fig. 21B, schémas du bas) (Giannone, Mège et al. 2009). Cela permet la protrusion du lamellipode, l'avancée de la cellule et un ancrage suffisant pour que la rétraction arrière se produise.

Le complexe ARP2/3 est recruté et activé à la membrane par un autre complexe protéique, le **complexe WAVE**, qui comporte notamment la protéine WAVE2 à laquelle se lie ARP2/3 (Padrick, Cheng et al. 2008; Ti, Jurgenson et al. 2011). Il est important de noter qu'ARP2/3 peut également être activé par d'autres complexes de la même famille que WAVE comme N-WASP (Krause and Gautreau 2014). La co-activation de WAVE se fait par PIP₃ et par Rac dans sa forme prénylée¹³ (Lebensohn and Kirschner 2009).

¹³ Qui permet son interaction avec la membrane plasmique.

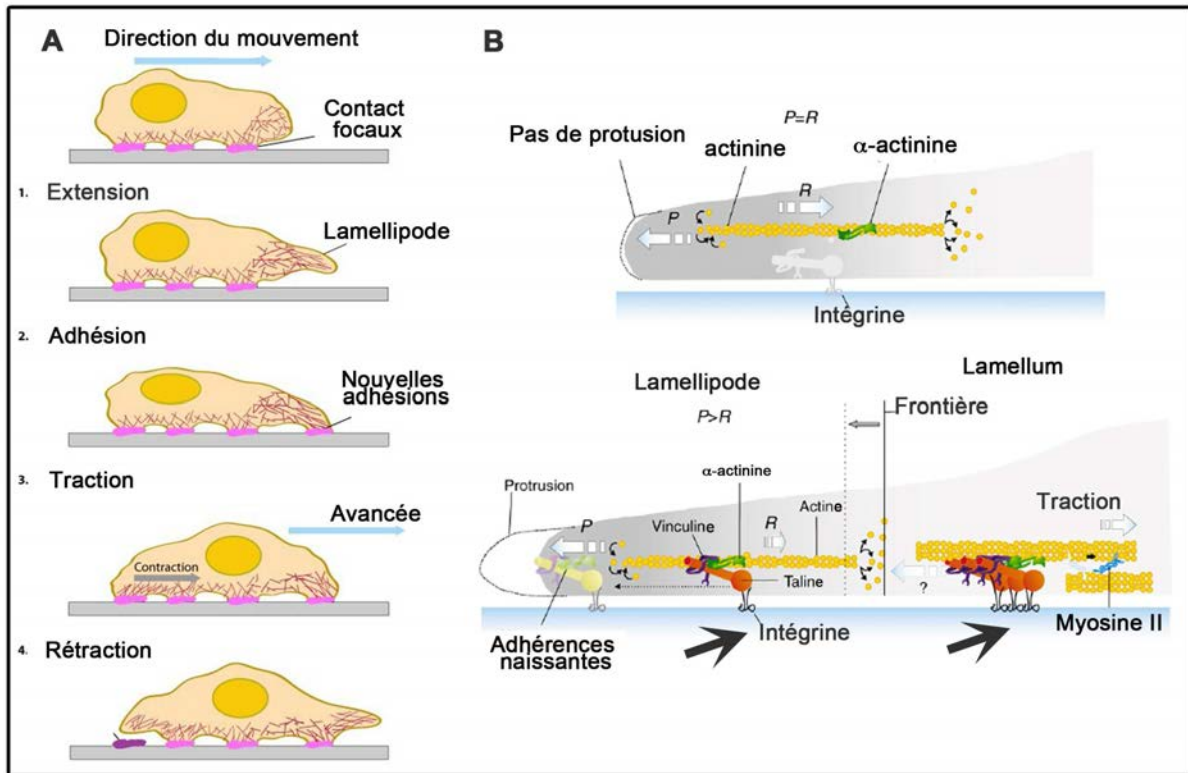


Figure 21 : La migration cellulaire

A- Les étapes conservées de la migration cellulaire (Tiré et adapté de « MBIInfo contributors. Conserved steps in cell spreading and movement. In MBIInfo Wiki, Retrieved 10/21/2014 from <http://mbinfo.mbi.nus.edu.sg/figure/1384242961310/> »). **B-** Le flot rétrograde d'actine et la migration cellulaire. Dans le schéma du haut, le cytosquelette d'actine n'est pas ancré à la MEC par l'intermédiaire des intégrines. La force générée par la polymérisation de l'actine et la tension membranaire (P) est annulée par les forces de contraction générées par la myosine II (R). Dans cette situation, le flot rétrograde d'actine ainsi créé ne favorise pas l'élongation du lamellipode. Dans le schéma du bas, la formation des adhésions naissantes à la périphérie du lamellipode et donc l'ancrage du cytosquelette à la MEC par les intégrines, permet de freiner ce flot rétrograde ce qui induit: (1) des forces de traction au niveau des adhésions focales qui se transmettent au substrat (flèches noir obliques), (2) la maturation des adhésions naissantes et (3) la force de polymérisation (P) va excéder la force de contraction de la myosine II (R) ce qui permet l'avancement du lamellipode. Au niveau du lamellum, les forces de traction intracellulaires générées par le cytosquelette d'actine et la myosine II permettent la maturation des complexes focaux en contacts focaux, et la formation des fibres de stress auxquelles ils sont associés (Vicente-Manzanares, Choi et al. 2009).

Ainsi, les protéines de la famille des Rho-GTPases sont également des acteurs moléculaires centraux de la migration. Rac1, en plus de jouer un rôle dans la formation des adhésions naissantes, représente également un acteur clé de formation du lamellipode, de par le fait qu'il active plusieurs effecteurs de la polymérisation de l'actine dont WAVE (Fig. 22A). Une fois le complexe WAVE activé, Rac1 à faible concentration est également impliqué dans les boucles de rétroaction positive régulant la persistance du lamellipode; et lorsque sa concentration atteint un certain seuil, elle régule la rétraction de celui-ci par des boucles de

rétroaction négative (Nobes and Hall 1995; Lebensohn and Kirschner 2009; Dang, Gorelik et al. 2013; Krause and Gautreau 2014).

Les intégrines, en plus de freiner le flot rétrograde, participent également aux boucles positives, par l'intermédiaire de plusieurs protéines phosphorylées de l'adhésome consensus qui permettent à la fois le recrutement et l'activation de Rac1 à la membrane (Vicente-Manzanares, Choi et al. 2009; Krause and Gautreau 2014). **La Paxilline** notamment apparaît comme régulateur des Rho-GTPases au niveau des adhérences focales. Premièrement, une fois la Paxilline phosphorylée par Src et FAK, **elle recrute le complexe activateur de Rac1: Crk-II + DOCK180 + ELMO** (Fig. 22A) (Schaller and Parsons 1995; Brugnera, Haney et al. 2002; Valles, Beuvin et al. 2004). De plus, un autre complexe protéique peut être recruté par la Paxilline, **le complexe GIT-PIX-PAK-NCK** qui active également Rac1 (Fig. 22A) bien qu'il puisse aussi la réguler négativement (Deakin and Turner 2008; Vicente-Manzanares, Choi et al. 2009). La Paxilline peut également réguler négativement RhoA, ce qui est essentiel au *turnover* des adhérences focales, puisque RhoA favorise la maturation des complexes focaux (Deakin and Turner 2008; Vicente-Manzanares, Choi et al. 2009). De manière paradoxale, RhoA favorise également le désassemblage des adhérences focales à l'arrière de la cellule ce qui facilite la rétraction du corps cellulaire et permet le recyclage des protéines des adhérences vers les nouvelles adhérences qui se forment à l'avant de la cellule au niveau du lamellipode (Worthylake, Lemoine et al. 2001). Ainsi, la maturation, le *turnover* et le désassemblage des adhérences focales sont des paramètres clés de la migration cellulaire. Il a par ailleurs été mis en évidence **une corrélation bi-phasique entre la taille des contacts focaux (leurs aires) et la vitesse de migration** arborée par la cellule : plus la taille des contacts focaux augmente et plus la vitesse de migration est augmentée, jusqu'à une certaine taille limite au-delà de laquelle la vitesse de migration diminue (Fig. 22B) (Kim and Wirtz 2013).

Enfin, il a été montré qu'ARP2/3 pouvait se lier de manière transitoire à la Vinculine, au niveau des adhérences naissantes, ce qui optimise la formation du lamellipode (Fig. 22C) (DeMali, Barlow et al. 2002). De même, ARP2/3 peut se fixer à la FAK (lorsque cette dernière est inactivée) ce qui permet son recrutement à la membrane (Fig. 22C). Il a par ailleurs été montré que les cellules déficientes pour la FAK ou pour lesquelles le domaine FAK de liaison à ARP2/3 est perturbé, présentent des défauts d'étalement et de formation du lamellipode (Serrels, Serrels et al. 2007). De même, FAK et Src jouent un rôle important dans le contrôle

du *turnover* des adhérences focales au niveau du lamellipode, *turnover* essentiel à la migration cellulaire (Webb, Donais et al. 2004).

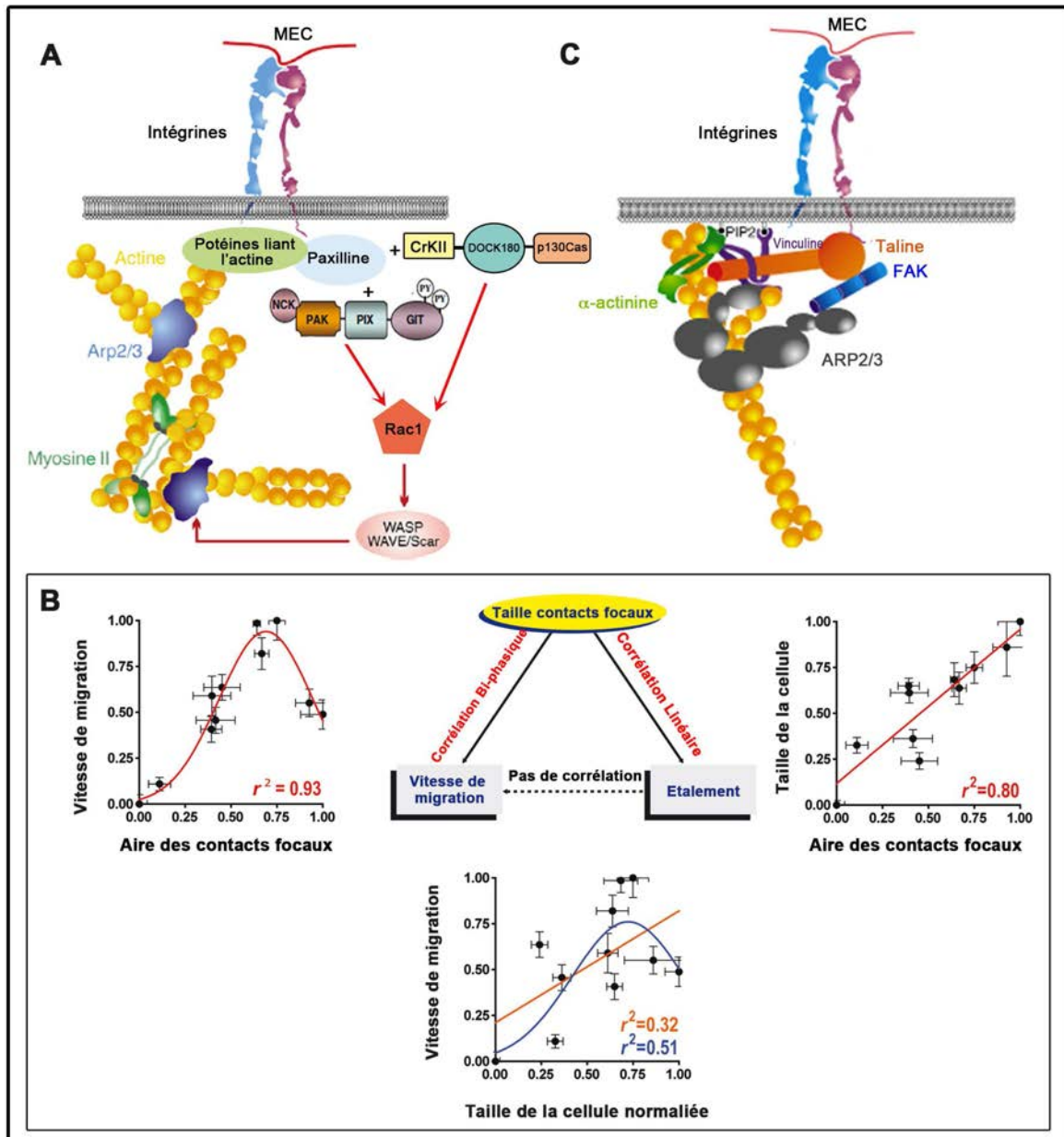


Figure 22 : Les adhérences intégrines-dépendantes et la migration cellulaire

A- La Paxilline se lie directement à la sous-unité β des intégrines et joue un rôle central de plateforme protéique. Elle recrute notamment plusieurs complexes protéiques tels que GIT-PIX-PAK-NCK et CrkII-DOCK80-p130Cas, qui recrutent et activent Rac1 à la membrane. En retour, Rac1 contrôle l'activation du complexe WAVE (autrement dénommé WAVE/SCAR), dont l'activité est essentielle à la polymérisation de l'actine et à la formation du lamellipode. À noter cependant que la co-activation de WAVE se fait par Rac1 dans sa forme prénylée et par le PIP₃, situation qui n'est pas représentée sur la figure par soucis de clarté visuelle (Vicente-Manzanares, Choi et al. 2009). **B-** Après normalisation, la taille des contacts focaux présente une corrélation bi-phasique avec la vitesse de migration des cellules et une corrélation linéaire avec l'étalement de la cellule. En revanche aucune corrélation n'a été détecté entre l'étalement et la vitesse de migration normalisée des

cellules (Kim and Wirtz 2013). C- La Vinculine et FAK se lient et recrutent ARP2/3 à la membrane au niveau des adhérences focales (Vicente-Manzanares, Choi et al. 2009).

III – D : Les intégrines et le développement du SNE

La migration des CCN pour atteindre leurs tissus cibles et celles des CCNEs lors de la formation du SNE représentent les évènements de migration les plus conséquents du développement embryonnaire. Le dérèglement de leur migration peut conduire à des malformations congénitales comme la maladie de HSCR. Durant la colonisation de l'intestin embryonnaire, les CCNEs expriment plusieurs sous-unités d'intégrines: $\alpha 4$, $\alpha 6$, αV et $\beta 1$, $\beta 3$, et $\beta 5$ (Dufour, Broders-Bondon et al. 2015). **Cependant, le rôle que joue ce répertoire dans la régulation des comportements des CCNEs et son impact sur le développement du SNE commencent tout juste à être appréhendés.**

Premièrement, la létalité péri-implantatoire des embryons invalidés pour *Itgb1* (gène codant la sous-unité β), rendait impossible l'analyse du rôle de cette sous-unité dans les phases plus tardives du développement comme celle du SNE (Fässler, Pfaff et al. 1995; Stephens, Sutherland et al. 1995). L'étude du rôle des intégrines $\beta 1$ lors de la colonisation des CCNEs a été réalisée dans notre laboratoire grâce à la création de la lignée transgénique *Ht-PA::Cre* chez laquelle l'expression de la recombinaison Cre est placée sous le contrôle du fragment de 3kb du promoteur Ht-PA¹⁴. L'expression de la recombinaison Cre n'est activée que dans les CCN au moment où celles-ci délaminent du tube neural (Pietri, Eder et al. 2003). L'expression de la Cre est plus tardive que chez les souris de la lignée *Wnt1::Cre* (E7.5) et plus spécifique, puisqu'elle n'induit pas de recombinaison dans le tube neural dorsal (Pietri, Eder et al. 2003). Le croisement des souris *Ht-Pa::Cre; $\beta 1^{neo/+}$* (Pietri, Eder et al. 2004) avec des souris *$\beta 1^{fl/fl}; YFP^{fl/fl}$* a permis à la fois l'invalidation conditionnelle de la sous-unité $\beta 1$ spécifiquement dans toutes les CCN et donc également dans les CCNEs ainsi que l'expression de la YFP par ces cellules lors de la colonisation de l'intestin embryonnaire (Breau, Pietri et al. 2006). La YFP permet ainsi de distinguer les CCNEs au sein du tissu intestinal embryonnaire et de suivre leur comportement migratoire par imagerie time-lapse (Breau, Dahmani et al. 2009).

Chez les souris *Ht-PA::Cre; $\beta 1^{neo/fl}$* (que nous dénommerons à présent $\beta 1^{null}$), l'expression des intégrines $\beta 1$ des CCNEs est fortement diminuée à E9.5 au moment de

¹⁴ Promoteur Humain de l'activateur tissulaire du plasminogène (à vos souhaits!)

l'invasion du *foregut* et n'est plus détectable à E11.5 (Breau, Pietri et al. 2006). Contrairement aux contrôles hétérozygotes $\beta 1^{fl/+}$, **les embryons $\beta 1^{null}$ présentent une aganglionose du côlon, phénotype entérique typique de la maladie HSCR, ainsi qu'une organisation altérée du réseau nerveux des parties colonisées** (Fig. 23A) (Breau, Pietri et al. 2006). Cette colonisation incomplète de l'intestin distal n'est pas due à des défauts de survie, de proliférations ou de différenciation des CCNEs $\beta 1^{null}$, mais à des défauts de migration qui se déclarent à E11.5 au moment de l'invasion du cæcum (Fig. 23A et B) (Breau, Pietri et al. 2006). En effet, les CCNEs $\beta 1^{null}$ présentent une diminution significative de leur vitesse, de leur persistance¹⁵ et de leur directionnalité rostro-caudale de migration, comme révélé par des analyses en vidéo-microcinématographie réalisées sur des cultures d'intestins *ex-vivo* (Fi. 22B) (Breau, Dahmani et al. 2009).

Il existe un gradient d'expression de deux protéines de la MEC, la Fibronectine (FN) et la Ténascine-C (TNC), le long de l'axe rostro-caudal de l'intestin embryonnaire nettement visible au niveau du cæcum lors de son invasion par les CCNEs (Fig. 23C) (Breau, Dahmani et al. 2009). Les altérations de la migration des CCNEs $\beta 1^{null}$ s'expliquent en partie par le fait que la TNC est un support beaucoup moins permissif à l'adhérence et à la migration des CCNEs murines que la FN. La présence des intégrines- $\beta 1$ est nécessaire pour outrepasser cette inhibition et promouvoir la migration des CCNEs sur la FN. De même, les CCNEs $\beta 1^{null}$ présentent des défauts d'adhérence et de migration lorsqu'elles sont mises en culture dans du matrigel, composé essentiellement de Laminine-1 et du Collagène IV, qui sont des composants de la MEC également exprimés par l'intestin embryonnaire, tout comme la Vitronectine (Breau, Dahmani et al. 2009; Dufour, Broders-Bondon et al. 2015). Nous pouvons faire remarquer que le cæcum exprime également fortement le GDNF ainsi que l'EDN3 deux effecteurs importants du développement du SNE. De manière intéressante, les CCNEs $\beta 1^{null}$ ne répondent plus à l'effet chimio-attractant du GDNF (Breau, Pietri et al. 2006).

¹⁵ La persistance de migration désigne la capacité d'une cellule à migrer suivant la même direction ou à poursuivre selon une même trajectoire.

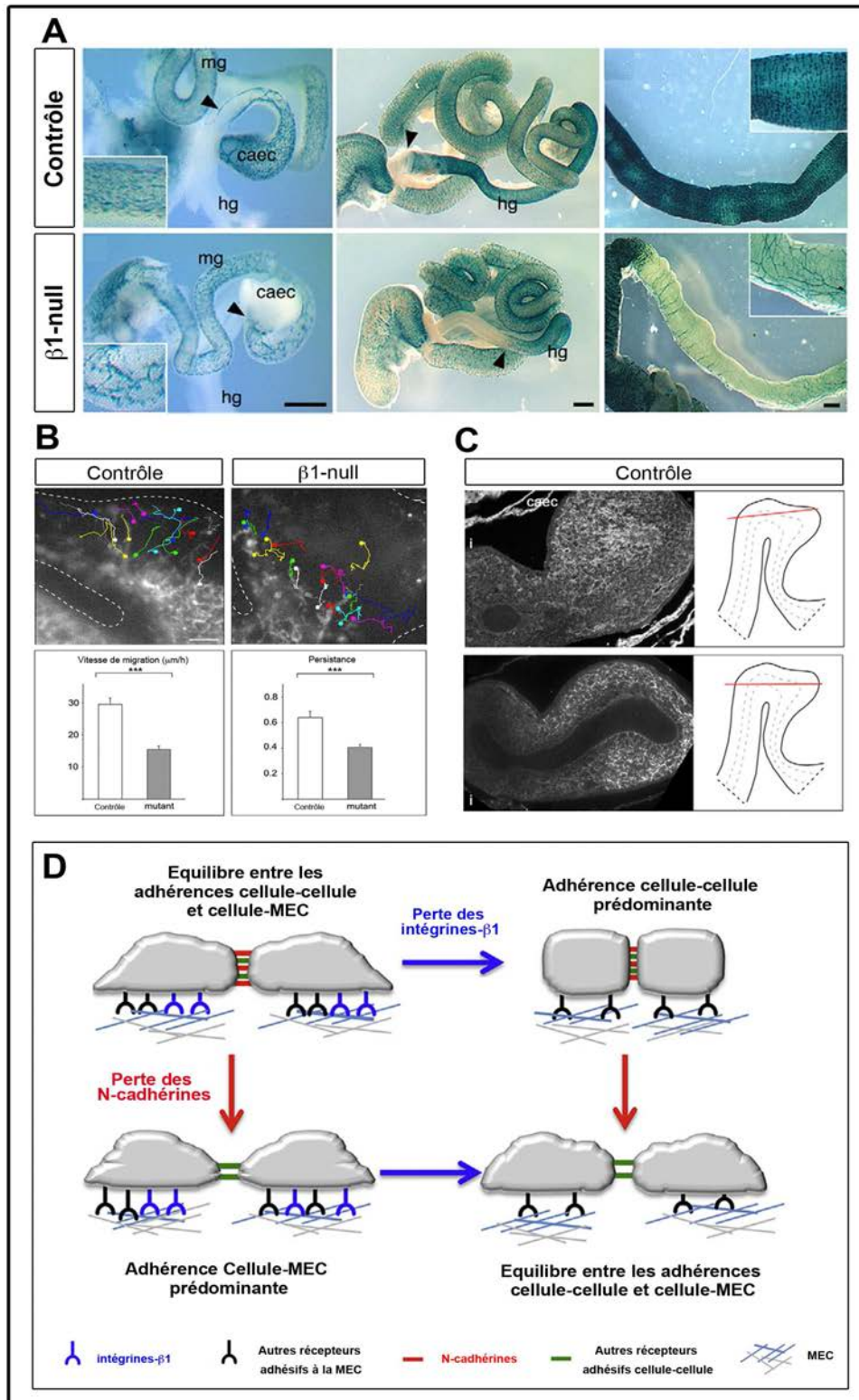


Figure 23 : Rôle des intégrines- $\beta 1$ et des N-cadhérines dans le développement du SNE

A- L'inactivation conditionnelle de *Itgb1* conduit au phénotype de HSCR. Marquages β -galactosidase d'intestin embryonnaire de souris à différents stades du développement montrant le défaut de colonisation des mutants $\beta 1^{\text{null}}$; mg= *midgut*, hg= *hindgut*, caec= *cæcum*; la flèche noire indique la position du front de colonisation. Échelles= 500 μm (Breau, Pietri et al. 2006). **B-** Analyses des trajectoires et des capacités migratoires des CCNEs contrôles et $\beta 1^{\text{null}}$ envahissant le cæcum (Breau, Dahmani et al. 2009). **C-** Immunomarquages de coupes congelées de cæcum provenant d'intestins embryonnaires contrôles au stade E11.5 montrant le gradient de FN et TNC; échelle= 50 μm (Breau and Dufour 2009). **D-** Modèle d'interaction entre les intégrines- $\beta 1$ et la N-

cadhérine dans la modulation de l'équilibre entre les propriétés adhésives cellule-MEC et cellule-cellule des CCNEs (Dufour, Broders-Bondon et al. 2015).

Récemment, *Phatcr-4* a été identifié comme un nouveau régulateur négatif des intégrines $\beta 1$ durant le développement du SNE (Zhang, Kim et al. 2012). Les souris mutantes *Phatcr-4*^{humdy/humdy} présentent un phénotype entérique d'hypoganglionose du *hindgut*, imputé au défaut de migration collective des CCNEs mutantes dont la formation des chaînes de CCNEs est perturbée ainsi que leur directionnalité de migration rostro-caudale (Zhang, Kim et al. 2012). Le traitement d'explants *Phatcr-4*^{humdy/humdy} par des inhibiteurs de ROCK (ROCK favorisant la maturation des contacts focaux) permet de restaurer une migration physiologique. Il semblerait donc que chez les mutants *Phatcr-4*^{humdy/humdy} l'activité des intégrines soit anormalement élevée et que *Phatcr-4* régule négativement l'activation des intégrines au cours de la migration des CCNEs (Zhang, Kim et al. 2012).

Par ailleurs, la présence chez ces mutants de plusieurs CCNEs solitaires, éloignées des chaînes et très motiles, renforce l'idée que les interactions cellules-cellules sont perturbées lorsque les interactions cellules-matrices sont augmentées. Notre laboratoire a par ailleurs montré que la N-Cadhérine est impliquée dans la colonisation des CCNEs de par son rôle dans la formation des chaînes au front de migration (Broders-Bondon, Paul-Gilloteaux et al. 2012). En effet, les mutants conditionnels *Ht-PA::Cre* pour la N-Cadhérine (que nous dénommerons *NCad*^{null}), présentent un délai dans la colonisation des CCNEs lié aux défauts de formation des chaînes, l'adhérence cellules-cellules étant perturbée chez ces mutants (Broders-Bondon, Paul-Gilloteaux et al. 2012). A l'inverse, chez les mutants $\beta 1$ ^{null} l'adhérence intercellulaire semble renforcée, puisque les CCNEs forment de gros agrégats en culture 2D sur des supports permissifs¹⁶ (Breau, Pietri et al. 2006). De même, les analyses quantitatives du réseau neuronal du SNE, par marquage *Tuj1* chez les intestins $\beta 1$ ^{null}, ont révélé que ces derniers comportaient significativement plus d'agrégats neuronaux et de zones dépourvues de cellules en comparaison avec l'hétérozygote contrôle. Chez les doubles mutants conditionnels $\beta 1$ ^{null}; *NCad*^{null} la colonisation de l'intestin par les CCNEs est partielle. Elle est aggravée par rapport à celle observée chez les mutants simples. Cependant, dans la zone colonisée le défaut d'organisation du réseau SNE est partiellement restauré chez les $\beta 1$ ^{null} ;

¹⁶ Tels que la Vitronectine, afin d'engager les autres intégrines exprimées par les CCNEs qui ne sont pas perturbées par la délétion de $\beta 1$, comme $\beta 3$ notamment.

NCad^{null} (Broders-Bondon, Paul-Gilloteaux et al. 2012). **Ensemble, ces résultats montrent que les intégrines-β1 et la N-Cadhérine coopèrent lors de la colonisation des CCNEs et que cette dernière requiert une régulation fine de la balance entre l'adhérence cellules-matrice et intercellulaires** (Fig. 23D) (Broders-Bondon, Paul-Gilloteaux et al. 2012; Dufour, Broders-Bondon et al. 2015).

Enfin, Nadège Bondurand et Yuli Watanabe (INSERM U955, Créteil) en collaboration avec notre laboratoire ont montré pour la première fois **qu'il existait une interaction génétique entre Sox10 et Itgb1 lors du développement du SNE** (Watanabe, Broders-Bondon et al. 2013). Les double-mutants *β1*^{null}; *Sox10*^{LacZ} présentent un retard de colonisation des CCNEs drastiquement aggravé par rapport aux simples mutants respectifs. Les double-mutants présentent également un défaut d'organisation du réseau neuronal du SNE qui se traduit par un maillage plus lâche, montrant que les zones non peuplées par les CCNEs sont plus larges (Watanabe, Broders-Bondon et al. 2013). Les CCNEs double-mutantes sont dramatiquement perturbées dans leurs comportements migratoires (diminution significative de leur vitesse, de leur persistance et de leur directionnalité de migration) mais ne présentent pas de défaut supplémentaire de prolifération ou d'apoptose en comparaison des mutants *Sox10*^{LacZ/+} (Watanabe, Broders-Bondon et al. 2013). Sox10 étant un facteur de transcription, il a été testé s'il contrôlait l'expression d'*Itgb1*. Les résultats de QPCR réalisés chez des cellules Neuro-2a transfectées par un vecteur Sox10-GFP indiquent que ce dernier n'est pas un gène cible de Sox10 (Watanabe, Broders-Bondon et al. 2013). En revanche, la surexpression de Sox10 dans les cellules Neuro-2a induit une diminution significative de la quantité d'intégrines-β1 exprimée à la membrane plasmique (analyses quantitatives réalisées en cytométrie de flux, FACS). Des analyses par FACS des CCNEs après dissociation d'intestins embryonnaires montrent néanmoins que le niveau d'expression des intégrines-β1 à la membrane n'est pas modifié entre les hétérozygotes *β1* et les double-hétérozygotes *Ht-Pa ::Cre*; *β1*^{fl/+}; *Sox10*^{LacZ/+} à E14.5. Cependant, des cultures d'explants d'intestin *Sox10*^{LacZ/+} à E12.5 sur FN montrent que les CCNEs présentent une augmentation de la taille des adhérences focales (Watanabe, Broders-Bondon et al. 2013). Ainsi, si Sox10 ne régule pas directement l'expression génétique des intégrines-β1, il semblerait néanmoins qu'il régule indirectement et négativement la maturation des contacts focaux (puisque l'haploinsuffisance de Sox10 induit une augmentation de la taille des contacts focaux).

En conclusion, les intégrines sont les **principaux récepteurs adhésifs de la MEC** formés par l'association spécifique entre une sous-unité α et une sous-unité β . Leur affinité de liaison au ligand dépend de leur état conformationnel. L'état de basse affinité (état inactivé) correspond à l'état conformationnel replié du domaine extracellulaire, qui est stabilisé par la présence de liaisons entre les domaines transmembranaire et cytoplasmique des deux sous-unités. La dissociation de ces liaisons permet en revanche le passage à une conformation dépliée de haute affinité (état activé). La régulation de l'état d'activation des intégrines est un mécanisme crucial pour la cellule. Elle se fait par le biais de **la signalisation *inside-out***, qui correspond à l'activation des intégrines par des protéines cytoplasmiques se liant directement à la queue cytoplasmique de la sous-unité β . Cette activation conduit, en parallèle, au regroupement des intégrines et au recrutement de nombreuses protéines cytoplasmiques partenaires (appelé adhésome) permettant à la fois leur liaison au cytosquelette d'actine, la formation de différents types d'adhérences ainsi que le déclenchement d'une **signalisation cytoplasmique**. **Les intégrines forment un lien mécanique entre la MEC et le cytosquelette d'actine et transmettent des signaux bidirectionnels de part et d'autre de la membrane plasmique**. De plus, les intégrines régulent de nombreux processus cellulaires comme la survie, l'apoptose et la différenciation.

Les intégrines jouent également un rôle primordial dans la migration cellulaire. En effet, elles stabilisent le lamellipode et régulent des protéines de la famille des Rho-GTPases, qui contrôlent la polymérisation de l'actine à l'avant du lamellipode et la rétraction du corps cellulaire à l'arrière. De plus, **les adhérences focales couplées au cytosquelette d'actine freinent le flot rétrograde d'actine**, ce qui se traduit en forces de tractions exercées sur la MEC. Ces forces de tractions ainsi générées par la cellule via les adhérences focales lui permettent de se propulser mais également **de sonder les propriétés mécaniques de son environnement, telle que l'élasticité**. **Les adhérences focales sont donc le siège de la mécanosensation**.

Si le rôle indispensable des intégrines $\beta 1$ dans les processus migratoires des CCNEs a été mis en évidence par notre laboratoire, ainsi que ses interactions génétiques et fonctionnelles avec Sox10 et la N-cadhérine durant la formation du SNE, **le rôle de la mécanosensation des CCNEs et son impact sur leur comportement et le développement du SNE n'ont pas été caractérisés**.

IV - Mécanotransduction et influence des propriétés mécaniques de l'environnement sur les comportements cellulaires

Au sein de leur environnement, les cellules sont en permanence exposées à des signaux mécaniques. Ils proviennent soit de la contractilité intracellulaire générée par la cellule elle-même, soit de leurs cellules voisines, de la MEC, ou encore des fluides circulant. Depuis plusieurs années maintenant, il est admis que les cellules détectent ces signaux mécaniques (mécanosensation) et y répondent (mécanotransduction) tout comme elles le font pour les signaux biochimiques. **Quels sont les acteurs moléculaires de cette mécanosensation? Comment se fait la mécanotransduction, c'est à dire la conversion d'un signal mécanique en stimuli chimiques ?** Certains canaux ioniques dont l'activation dépend de forces mécaniques, participent à la mécanotransduction des cellules sensorielles car ils transforment des stimuli mécaniques en signal électrique (Marshall and Lumpkin 2012). Il faut cependant noter que la mécanotransduction n'est pas uniquement l'apanage des cellules sensorielles mais est une caractéristique également partagée avec de nombreux types cellulaires tels que les cellules adhérentes, comme nous l'avons mentionné précédemment. Pour ces dernières, les adhérences focales jouent un rôle essentiel dans la capacité des cellules à sonder les propriétés mécaniques de leur environnement et à y répondre.

IV – A : Les Adhérences focales sont des mécanocapteurs

IV – A-a: Mise en évidence du phénomène au niveau des adhérences focales

Les forces de tensions intracellulaires générées par le cytosquelette d'actine associé à la myosine II induisent une traction au niveau des adhérences focales qui se transmettent au substrat, comme mentionné dans le paragraphe §III – C-a (Fig. 24A). L'utilisation d'inhibiteurs de la contractilité cellulaire (tels que le ML-7 qui bloque la phosphorylation de la myosine II, ou le BDM (2,3-butanedione monoxime) qui bloque l'interaction de la myosine II avec l'actine) bloquent les tractions exercées par la cellule sur le support, la formation de nouveaux contacts focaux et déstabilisent ceux précédemment formés (Fig. 24B et C) (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge 1996; Rottner, Hall et al. 1999; Balaban, Schwarz et al. 2001). De plus, la diminution rapide de la taille des adhérences focales est concomitante à la

diminution de la force de traction qui leur est associée au cours du temps (phénomène de relaxation) (Fig. 24D) (Balaban, Schwarz et al. 2001). Ces derniers résultats ont pu être quantifiés par l'utilisation de supports calibrés déformables en polymère (PDMS¹⁷), sur lesquels des fibroblastes ont été mis en culture et par la technique appelée microscopie de force de traction (TFM). Cette technique permet de visualiser les déformations du support induites par ces fibroblastes, avec ou sans traitement au BDM, bloquant la contractilité cellulaire (Fig. 24) (Balaban, Schwarz et al. 2001). Il est intéressant de constater que la contrainte exercée sur le support par un contact focal est proportionnelle à sa taille, la pente de la courbe de données (taille et force) ainsi obtenue étant sensiblement identique quelle que soit la technique ou le type cellulaire utilisé (environ 5 Nn/μm²) (Balaban, Schwarz et al. 2001; Bershadsky, Balaban et al. 2003). Par exemple, par l'utilisation d'un autre type de support, les micropiliers de PDMS, le groupe de Benoît Ladoux a montré que la force exercée par les cellules épithéliales MDCK était entre 1,6 Nn/μm² (en bordure d'une monocouche de cellule) et 3.8 Nn/μm² (pour une cellule isolée) (du Roure, Saez et al. 2005).

De même, **les adhérences focales peuvent également répondre à des forces provenant de l'extérieur**. Par exemple, à l'aide d'une fine pipette de verre Riveline *et al* ont montré que l'application d'une force locale de cisaillement, sur la face apicale d'une cellule, déclenchait l'élongation des complexes focaux et leur maturation en contacts focaux (visualisé par l'augmentation du marquage Vinculine) (Riveline, Zamir et al. 2001). Ces résultats ont été corroborés à l'aide d'une technique différente, celle de billes micrométriques recouvertes de fragments de Fibronectine. Cette technique permet l'application d'une force locale en piégeant la bille dans un champ électromagnétique (généré par des pinces optiques (*optical tweezer*)) ce qui renforce l'ancrage de ces adhérences au cytosquelette (Choquet, Felsenfeld et al. 1997; Galbraith, Yamada et al. 2002). Ce phénomène est appelé phénomène de renforcement des adhérences focales sous contrainte (Choquet, Felsenfeld et al. 1997; Galbraith, Yamada et al. 2002).

¹⁷ PDMS : polydiméthylsiloxane, dérivé du silicone

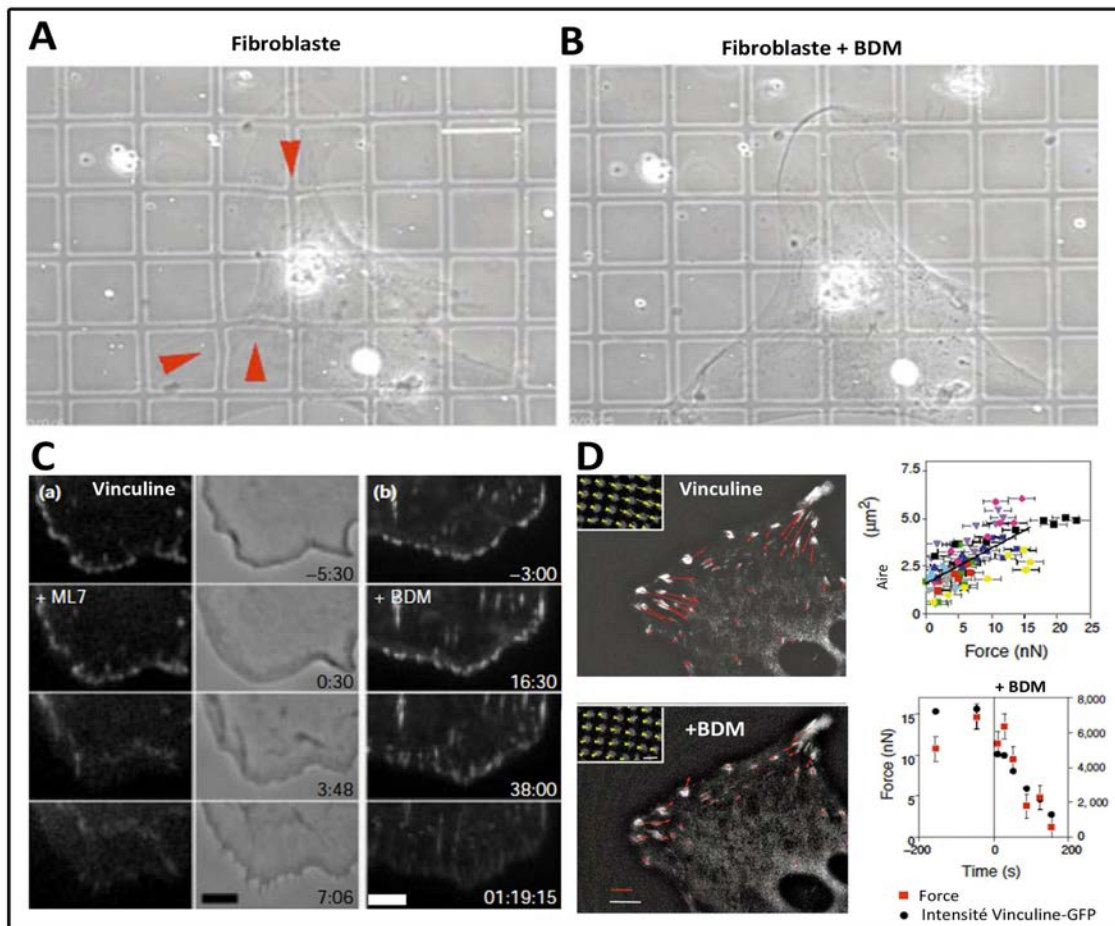


Figure 24 : Les cellules exercent des forces de tractions sur le support via les adhérences focales et générées par le cytosquelette d'actine couplé à la myosine II

A, B- Fibroblaste cardiaque déformant un support de PDMS ($E=18$ kPa) sur lequel il a été déposé. Les déformations exercées par le fibroblaste sont générées par la contraction intracellulaire et le cytosquelette d'actine, phénomène inhibé après 10 min de traitement au BDM (Balaban, Schwarz et al. 2001). **C-** Images extraites d'un film *time-lapse* montrant l'effet des inhibiteurs de la contractilité intracellulaire (ML7 et BDM) générée par le cytosquelette d'actine et la myosine II. Ces derniers déstabilisent et bloquent la formation des adhérences focales visualisées par la Vinculine-GFP. (a) et (b) : avant traitement, échelle= $5\mu\text{m}$ (Rottner, Hall et al. 1999). **D-** Analyses de microscopie de force de traction des adhérences focales Vinculine-GFP de fibroblastes déposés sur du PDMS avant et après traitement au BDM. La longueur des vecteurs de forces (rouge) est proportionnelle à la force exercée sur le support par l'adhérence. Les encadrés contenant les points et les flèches jaunes représentent les déplacements des billes fluorescentes insérées dans le polymère sous l'effet de traction exercée par la cellule ; échelle= $4\mu\text{m}$. Le graphique du haut représente la force exercée par une adhérence en fonction de son aire. Le graphique du bas montre le phénomène de relaxation de la force appliquée par les adhérences après traitement au BDM au cours du temps (Balaban, Schwarz et al. 2001).

IV – A-b: Mécanismes moléculaires de la mécanosensation et mecanotransduction au niveau des adhérences focales

Quels sont les mécanismes moléculaires responsables de ces modulations induites par des stress mécaniques (internes ou externes)? Une partie de la réponse nous est apportée par l'étude de Galbraith *et al*, dans laquelle les auteurs rapportent que le phénomène de renforcement de l'ancrage des complexes focaux soumis à l'application

d'une force locale extérieure est très probablement dû à l'accumulation de la Vinculine (Galbraith, Yamada et al. 2002). En effet, il a été montré que la tension exercée au niveau des adhérences focales est nécessaire à la rétention et au maintien de l'activation de la Vinculine (i.e maintien en conformation activée) (Carisey, Tsang et al. 2013; Dumbauld, Lee et al. 2013). **La Vinculine est donc elle-même sensible aux forces mécaniques qu'elle subit au niveau des adhérences focales.** La présence de la Vinculine stabilise les adhérences focales car elle stabilise la Taline en conformation dépliée (Case, Baird et al. 2015). Cette dernière est indispensable (1) au maintien de la conformation activée des intégrines ce qui augmente leur affinité de liaison à la MEC et (2) pour former la liaison entre le cytosquelette d'actine et les intégrines (Case, Baird et al. 2015). La Vinculine favorise d'autant plus la stabilisation et la maturation des adhérences qu'elle permet le couplage physique entre plusieurs fibres de stress au niveau des clusters d'intégrines (de par sa liaison à l'actine) (Fig. 25A) (Humphries, Wang et al. 2007; Goldmann 2016). Cependant, pour que la Vinculine subisse ces forces de tension et stabilise les adhérences focales encore faut il qu'elle soit localisée au niveau de ces dernières. **Comment une force de tension appliquée au niveau des adhérences permet le recrutement de la Vinculine ?**

Il a été montré que la Taline est une des premières protéines présente au niveau des adhérences focales en formation et qu'elle est indispensable au recrutement de la Vinculine (Zhang, Jiang et al. 2008; Sen, Ng et al. 2012). De manière intéressante, **la Taline est aussi une protéine allostérique sensible aux stimuli mécaniques.** En effet, sa conformation peut être directement impactée par des forces mécaniques qui lui sont appliquées, permettant ainsi le dévoilement de domaines de liaison aux protéines partenaires. Plusieurs méthodes indépendantes ont permis de mettre en évidence des changements conformationnels du domaine ROD induit par l'application de force qui libèrent l'accès aux domaines de fixation de la Vinculine (Fig. 25B). Ces méthodes sont la « *Steered Molecular Dynamics* » permettant d'appliquer une force sur un ou plusieurs atomes choisis (Lee, Kamm et al. 2007; Hytonen and Vogel 2008) et les pinces optiques (del Rio, Perez-Jimenez et al. 2009). Il a de plus été montré que l'activation de la Taline par des stimuli mécaniques conduisait à l'activation et à la translocation dans le noyau du régulateur transcriptionnel YAP (Elosegui-Artola, Oria et al. 2016). Ainsi, tout comme les stimuli biochimiques, les stimuli mécaniques permettent l'activation de la Taline par le dépliement du domaine ROD, le recrutement et l'activation de la Vinculine au niveau des adhérences focales. La Vinculine conduit ainsi à l'augmentation

des forces de tractions exercées par les adhérences focales sur le support (Fig. 25C) (Dumbauld, Lee et al. 2013)

De plus, nous pouvons ajouter à cela le **phénomène de « catch bond »**. Ce phénomène correspond au renforcement de la force de liaison entre les intégrines et la Fibronectine sous l'effet d'une tension, tension qui induit la formation d'une liaison supplémentaire au niveau d'un site synergique de la Fibronectine (Friedland, Lee et al. 2009). Les intégrines peuvent par ailleurs être elles-mêmes directement activées par l'application d'une force de traction qui induit des changements conformationnels de haute affinité (Chen, Lou et al. 2012).

Des études de protéomique ont montré que l'application croissante d'une tension au niveau des sites adhésifs conduisait au recrutement de protéines porteuses d'un domaine LIM telles que la Paxilline et la Zyxine (Hytonen and Wehrle-Haller 2016). L'état de phosphorylation de la Paxilline semble également pouvoir être régulé positivement ou négativement en fonction du type de stress appliqué sur des cellules en cultures. En effet, un étirement cyclique du support augmente la phosphorylation de cette dernière alors que des forces de cisaillements semble réduire son état de phosphorylation et diminuer son *turnover* (Horton, Astudillo et al. 2016).

De même, la **FAK semble également directement impliquée dans la mécanosensation** des fibroblastes en migration (Wang, Dembo et al. 2001). Des fibroblastes mis en culture sur des gels de polyacrylamides souples ne répondent plus aux stimuli mécaniques lorsque l'expression de la FAK est abolie. Si le support est localement comprimé ou étiré, les fibroblastes non mutés changent leur polarité et migrent dans la direction opposée à la force de compression. Les fibroblastes contrôles forment également des adhérences focales dans la direction de la force d'étirement. En revanche, les fibroblastes n'exprimant plus la FAK ne semblent pas stimulés (notons que ces mutants conservent tout même leur capacité à former des adhérences focales) (Wang, Dembo et al. 2001).

La **protéine p130Cas** est également une protéine de l'adhésome pouvant être activée sous l'effet de forces de tractions exercées sur les cellules, qui induisent la phosphorylation cette dernière et l'activation subséquente de voie de signalisation (Sawada, Tamada et al. 2006)

Si l'augmentation de la tension favorise le maintien et le recrutement de certaines protéines au niveau des adhérences focales, à l'inverse, la réduction de la tension au niveau

des fibres de stress est corrélée à la perte de la Vinculine et de la Taline des adhérences focales, ce qui conduit à une diminution de la force d'adhérence au support (Dumbauld, Shin et al. 2010).

En conclusion, les adhérences focales sont des mécanocapteurs à part entière. La modulation dynamique de l'assemblage des adhérences focales en réponse à des forces mécaniques peut en partie s'expliquer par le fait que certaines protéines qui les composent sont elles-mêmes sensibles à ces stimuli mécaniques. Sous l'effet d'une contrainte mécanique, associée à des signaux biochimiques, certaines protéines subissent des changements conformationnels. Ces contraintes stabilisent leur conformation activée, libèrent des sites de liaisons aux protéines partenaires, permet le recrutement dynamique de protéines cytoplasmiques de l'adhésome ce qui stabilise l'adhérence et permet l'activation de régulateur transcriptionnel qui transloquent dans le noyau. Pour certaines protéines telle la Paxilline, ces forces induisent des changements de leur état de phosphorylation qui conduisent au déclenchement de voie de signalisation (Zamir, Katz et al. 1999; Schiller, Friedel et al. 2011; Schiller and Fassler 2013). Ces phénomènes sont rassemblés sous un modèle au nom d'embrayage moléculaire ou «**molecular clutch**», qui *in fine* renforce l'ancrage au cytosquelette et aux protéines de la MEC, permet à la cellule de sonder efficacement les propriétés élastiques de son environnement et d'y répondre (Fig. 26A) (Mitchison and Kirschner 1988).

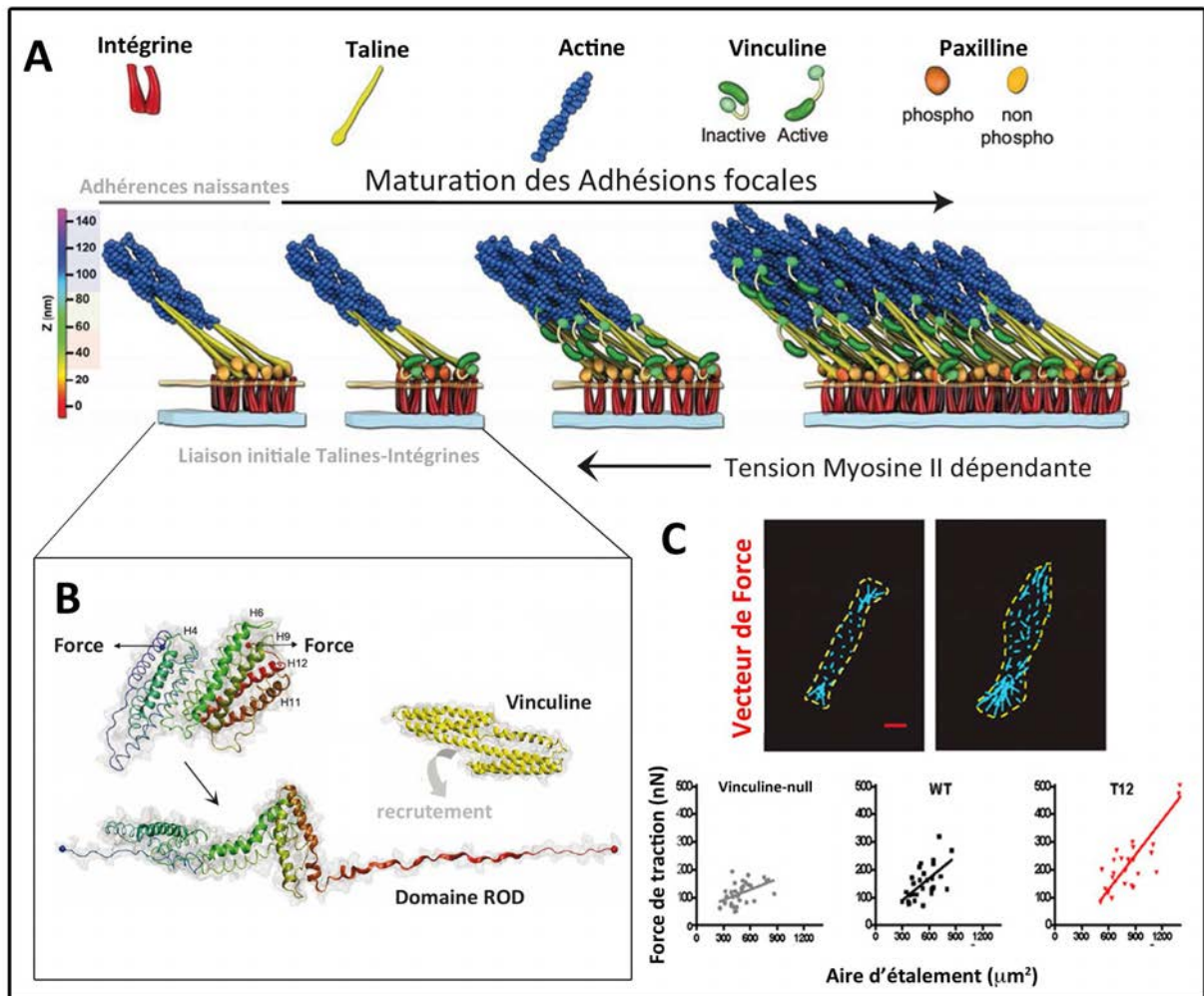


Figure 25 : Maturation des adhésions focales par le recrutement de protéines sensibles aux forces mécaniques et renforcement de l'ancrage à la MEC.

A- Modèle d'activation de la Vinculine et reconstitution 3D à l'échelle nanométrique de la maturation des adhésions focales sous l'influence de la tension générée par la Myosine II (Case, Baird et al. 2015). **B-** Structure des 12 hélices de la Taline. Sous l'effet de forces appliquées dans la direction indiquée par les flèches, le domaine ROD est déplié et permet le dégagement des sites de liaison à la Vinculine et son recrutement (del Rio, Perez-Jimenez et al. 2009). **C-** La Vinculine régule les forces de traction appliquées sur le support par les adhésions focales. Les panneaux du haut indiquent des vecteurs de forces (bleu) mesurés aux adhésions focales chez une cellule de la lignée embryonnaire fibroblastiques (MEF) n'exprimant pas la Vinculine (gauche) ou *wild-type* (droite). Les graphs du bas représentent la mesure des forces de tractions (mesurées par TFM) exercées par les adhésions focales en fonction de l'aire d'étalement de la cellule. L'absence de Vinculine induit une diminution de la force de traction exercée par la cellule en comparaison des cellules *wild-types*. À l'inverse, l'expression d'un mutant constitutivement actif de la Vinculine, qui favorise son interaction avec la Taline et l' α -actinine, augmente les forces de tractions exercées par la cellule. Ces mutants constitutivement actif sont induits par une mutation qui réduit l'affinité de liaison entre ses domaines *head* et *tail*, liaison permettant normalement le maintien de la Vinculine en conformation repliée, voir schémas en A) (Dumbauld, Lee et al. 2013).

IV – B : Les cellules répondent à la rigidité de l'environnement

Nous avons précédemment expliqué que la tension présente au niveau des adhésions focales est essentielle à la mécanosensation. Cependant, les forces de traction,

premièrement générées par les contractions intracellulaires, ne peuvent produire une tension suffisante au niveau des adhérences focales que si elles rencontrent une certaine résistance au niveau de ces dernières. Cette résistance est fournie par la capacité de déformation du substrat lorsqu'il est soumis à une contrainte (ici, les forces de traction exercées par les cellules). Cette résistance est donc directement déterminée par les propriétés élastiques du support, qui vont impacter en retour le niveau de tension présent aux adhérences focales. Pour simplifier, plus un matériau est «mou¹⁸» (que nous traduisons par «élastique») moins il va exercer de résistance lorsqu'on le déforme et donc moins la tension sera importante au niveau des adhérences focales. À l'inverse, un matériau plus rigide (moins élastique) va présenter plus de résistance et donc la tension sera plus importante.

Ainsi l'engagement du « *molecular clutch* » va dépendre de l'élasticité du support: sur les support rigides, si la tension est suffisante, cela stabilise tout le complexe adhésif, le *molecular clutch* est engagé ce qui se traduit par l'augmentation de la force d'adhérence et de traction au niveau du substrat. Si la tension n'est pas suffisante, l'adhérence focale est déstabilisée, se désassemble, ce qui conduit à une diminution de l'adhérence, de la taille de cette dernière et donc de la force exercée sur le support (Fig. 26A).

Deux modules permettent de caractériser l'élasticité d'un matériau : **Le module d'Young E** (*Young's modulus*), qui se calcule par l'application d'une force de traction perpendiculaire à la surface du matériau, et **le module de Coulomb G** (*Shear modulus*), qui se calcule par l'application d'une force parallèle à la surface ou d'une force de cisaillement (Fig. 26B). L'unité de mesure de ces deux modules est le Pascal (Pa), correspondant donc à une force (exprimée en Newton, N) appliquée par unité de surface (μm^2) (Fig. 26B). Les deux modules sont reliés par le coefficient de Poisson ν , qui dépend du type de matériau, selon l'équation suivante: $E= 2G (1+\nu)$. Ces modules permettent de définir les propriétés élastiques de l'environnement ou des supports utilisés pour étudier l'impact de la rigidité sur les comportements cellulaires.

¹⁸ En réalité, le paramètre «mou», c'est à la dire la mollesse d'un matériau, ne se mesure pas en physique.

A cet effet, plusieurs types de polymères synthétiques sont couramment utilisés pour la fabrication de substrats 2D tels que le PDMS et les gels de polyacrylamides (PAA-Gels) tels mentionnés précédemment. L'avantage de ces matériaux est qu'il est possible de contrôler leur élasticité, par exemple en modulant le rapport des concentrations entre l'acrylamide et le bis-acrylamide pour le cas des PAA-Gels (Pelham and Wang 1997; Tse and Engler 2010). Ces supports doivent être ensuite recouverts de protéines de la MEC car ils sont hydrophobes et ne permettent pas l'adhérence cellulaire. Cette étape de fonctionnalisation peut se faire par adsorption des protéines matricielles dans le cas du PDMS ou par la création de liaisons covalentes entre les protéines matricielles et le support dans le cas des PAA-Gels (Tse and Engler 2010). De même, il est possible de fabriquer des matrices 3D de collagène de différentes propriétés élastiques en modulant la concentration du collagène, les températures de gélation et le pH notamment (Ulrich, Jain et al. 2010) .

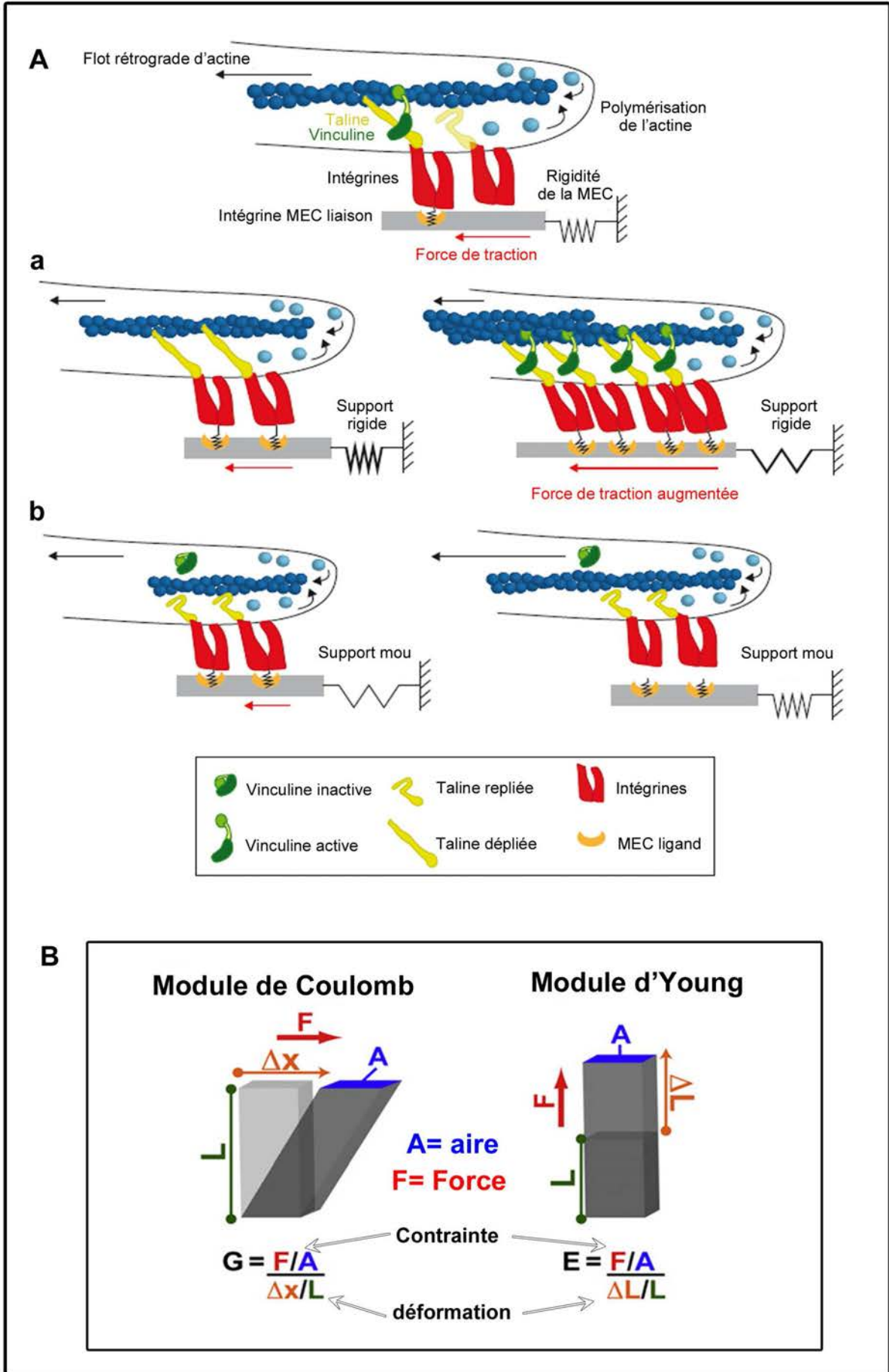


Figure 26 : Modèle du *molecular clutch* et définition des modules élastiques

A- Modèle de l'embrayage moléculaire en fonction de la rigidité du support (Adapté d'Elosegui-Artola, Oria et al. 2016; Swaminathan and Waterman 2016). Dans ce modèle, deux paramètres sont à prendre en compte: le temps de vie de la liaison intégrine-MEC et le temps de transmission de la force au niveau du complexe adhésif. (a) Sur les supports rigides, la tension atteint un seuil suffisant et plus rapidement que le temps de vie de la liaison intégrines-MEC ce qui permet le dépliement de la Taline et le recrutement de la Vinculine ainsi que son activation puis la stabilisation de toute l'adhérence comme décrit précédemment. (b) Sur les supports les plus élastiques (mous), le temps de vie de la liaison intégrines-MEC est plus rapide que le temps qu'il faut pour que la tension soit suffisante au niveau de l'adhérence, le renforcement de l'adhérence n'a pas lieu. **B-** Schémas et équations permettant le calcul des modules élastiques en fonction de la direction des forces appliquées (Moore, Roca-Cusachs et al. 2010).

Nous allons à présent illustrer comment les propriétés élastiques de l'environnement influencent différents mécanismes cellulaires. Il est important de noter que d'autres paramètres physiques tels que la topographie, l'organisation spatiale des fibres de la matrice, la taille des pores des matrices 3D, ou encore la présence de gradients (phénomène d'haptotaxie) peuvent également influencer les comportements cellulaires, en particulier l'adhérence et la migration.

IV – B-a: Effet de l'élasticité sur l'adhérence et la migration des cellules

Dans leur étude de 1997, Pelhman et Wang ont caractérisé la réponse des cellules épithéliales et fibroblastiques confrontées à des rigidités décroissantes en utilisant pour la première fois des PAA-gels (Pelham and Wang 1997). Ils ont montré que les cellules épithéliales sont moins étalées sur les supports les plus souples ($E \approx 15$ kPa) que sur les supports plus rigides ($E \approx 75$ kPa). Sur les supports les plus souples, les fibroblastes adoptent majoritairement une morphologie polarisée. Ils présentent un lamellipode moins stable et une vitesse de migration augmentée. Enfin, les cellules épithéliales en culture sur les supports les moins rigides présentent moins d'adhérences focales positives pour la Vinculine dont le *turnover* est plus rapide. De plus ils notent une augmentation de la phosphorylation de la FAK et de la Paxilline (démonstré par western-blot) en comparaison des cellules sur les PAA-gels les plus solides (Pelham and Wang 1997).

Le même groupe, quelques années plus tard, a mis en évidence **le phénomène de durotaxie, désignant la tendance des cellules à migrer vers des supports plus rigides** (Fig. 27A) (Lo, Wang et al. 2000). L'utilisation de PAA-Gels possédant cette fois-ci une frontière de rigidité nette, créée par l'accolement de deux PAA-Gels d'élasticités différentes, ont permis les observations suivantes : des fibroblastes se trouvant sur le côté le plus mou, situés

proche de la frontière, ont tendance à migrer vers le support rigide si ils étendent leur protrusions sur ce dernier. À l'inverse, une fois du côté le plus rigide, les fibroblastes tendent à y rester et ne retournent pas sur le côté le plus mou même lorsqu'ils étendent leur protrusion sur ce dernier (Fig. 27A) (Lo, Wang et al. 2000). On peut noter que les fibroblastes mutants pour la FAK ne semblent plus capables de durotaxie (Wang, Dembo et al. 2001). **Ainsi, la stabilisation des adhérences focales et l'étalement cellulaire semblent être favorisés sur les supports plus rigides, ces derniers favorisant également la durotaxie, alors qu'à l'inverse la migration cellulaire semble encouragée sur les supports plus souples.** Par ailleurs, il a récemment été montré que les substrats mous stimulaient les caractéristiques invasives des cellules. Ils stimulent la formation de structures de types invadosomes, la sécrétion des métalloprotéinases matricielles (MMP) ainsi que l'augmentation de la dégradation du collagène utilisé comme *coating* des PAA-gels sur lesquels des fibroblastes humains sont mis en culture (Gu, Liu et al. 2014). Les auteurs précisent tout de même que la gamme de faible rigidité pour laquelle ces caractéristiques sont observées est assez étroite (G compris entre 0,1 - 0,4 kPa) (Gu, Liu et al. 2014).

En revanche, tous les types cellulaires ne semblent pas répondre de la même façon lorsque confrontés à des supports souples. Par exemple, les cellules cancéreuses de gliome (*Glioma Cells*), dérivées tumorales des cellules gliales du SNC, sont fortement impactées par les PAA-gels de faible rigidité (E de 0.08 et 0.8 kPa) (Ulrich, de Juan Pardo et al. 2009). Leurs aires d'étalement ainsi que leur vitesses de migration sont significativement diminuées sur ces PAA-gels alors qu'à l'inverse ces deux paramètres sont augmentés lorsque la rigidité des PAA-gels l'est également (Ulrich, de Juan Pardo et al. 2009). De même, si les fibroblastes présentent des fibres de stress bien définies et sont nettement plus étalés sur des supports rigides, les neutrophiles ne semblent pas impactés par les faibles rigidités (Yeung, Georges et al. 2005). En effet, leur périmètre d'étalement n'est pas modifié par l'élasticité du support, de même que leur activation par un peptide chimiotactique, ne modifie pas leur capacité d'étalement quelque soit le support sur lesquels ils sont mis en culture (Yeung, Georges et al. 2005). Enfin pour aller dans le même sens, des études réalisées sur des cultures primaires de moelle épinière d'embryon de souris montrent que la pousse et l'extension des neurites des neurones sont largement favorisées par les supports les plus élastiques mais qu'à l'inverse ils ne favorisent pas la survie des cellules gliales (Flanagan, Ju et al. 2002).

IV – B-b: Effet de l'élasticité sur la différenciation cellulaire

L'élasticité de l'environnement, en plus de fortement impacter les propriétés d'adhérence et de migration des cellules, peut également déclencher et influencer le programme de différenciation des cellules souches. Cet effet de la rigidité du substrat a été mis à jour par l'équipe de D.E Discher, en utilisant des cellules souches mésenchymateuses naïves mises en culture sur des PAA-Gels de trois rigidités distinctes. Alors que les cellules souches déposées sur la rigidité la plus faible s'engagent dans la lignée neuronale, celles déposées sur les rigidités intermédiaire et élevée s'engagent respectivement dans la lignée myocitaire et osseuse, et ce alors même que le milieu de culture est identique (Fig. 27B) (Engler, Sen et al. 2006). De plus, cet engagement dans les voies de différenciation semble dépendant de la contractilité intracellulaire, puisqu'elle est bloquée par l'utilisation de la blebbistatine, que l'expression de plusieurs isoformes de myosine II est augmentée en fonction de la rigidité de même que la contractilité cellulaire augmente parallèlement à la rigidité du support (Engler, Sen et al. 2006). De manière intéressante, il semblerait que l'activité et la localisation nucléaire des co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ soient régulées par la rigidité du support et la contractilité cellulaire, ces co-activateurs étant requis pour la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes induite par la rigidité (Dupont, Morsut et al. 2011).

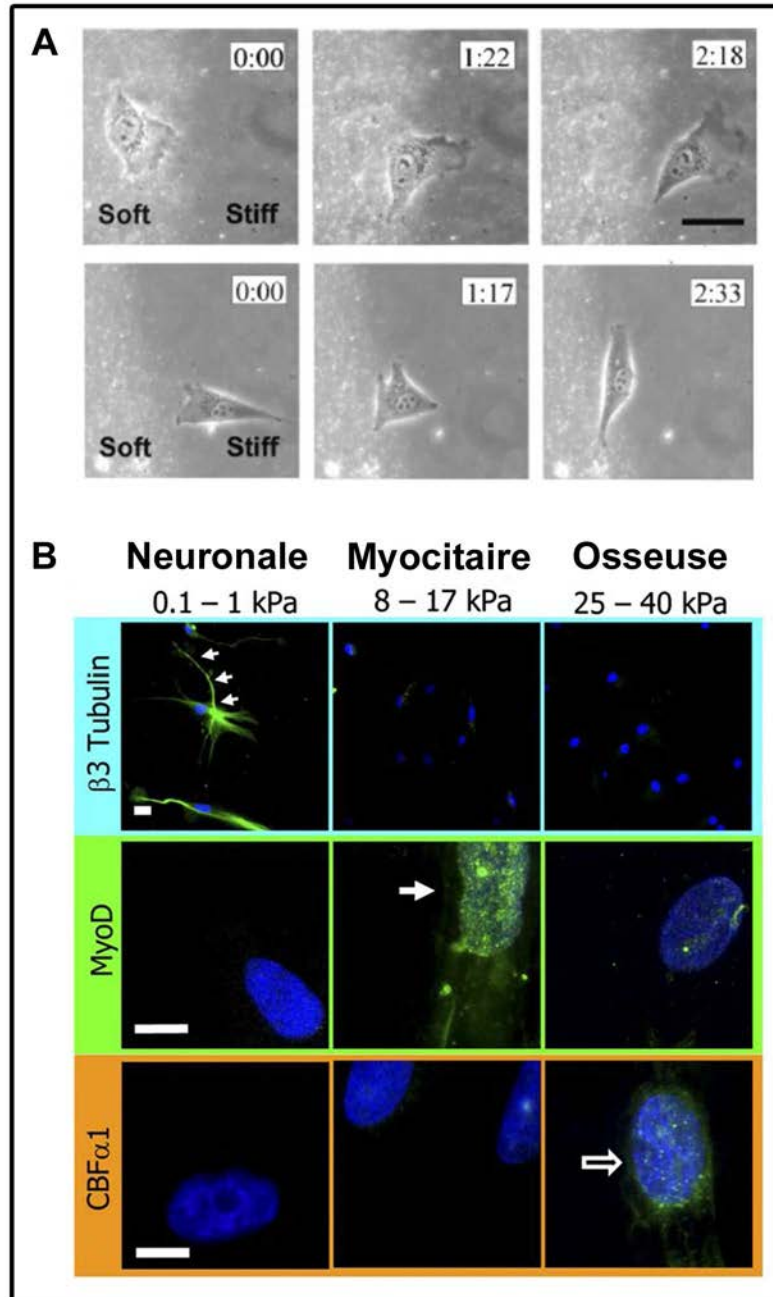


Figure 27 : Effet de la rigidité du support sur les comportements cellulaire en culture 2D

A- Phénomène du durotaxie mis en évidence par des fibroblastes déposés sur un support fabriqué à partir de deux PAA-gels de rigidités différentes, l'un de faible élasticité (*soft*) et l'autre plus rigide (*stiff*), échelle= 40 μ m (Lo, Wang et al. 2000). B- Effet de la rigidité du support sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses révélé par immunomarquages β 3 tubuline (marqueur neuronal), MyoD1 (facteur de transcription musculaire) et CBF α 1, un facteur de transcription exprimé par les cellules de la lignée osseuse, échelle= 5 μ m (Engler, Sen et al. 2006).

En résumé, les cellules sondent et ressentent les propriétés physiques de leur environnement en partie par le biais des adhésions focales, qui représentent de véritables mécanorécepteurs sensibles aux stimuli mécaniques intra et extracellulaires. Les adhésions focales sont considérées comme des complexes d'embrayages, c'est à dire une machinerie moléculaire régulée dynamiquement par les forces de tension qu'elle subit et qui couple/transmet directement ces forces de tension intracellulaire au microenvironnement cellulaire. Cependant, pour que les adhésions focales se stabilisent, mûrissent et que cet embrayage moléculaire soit engagé, il faut que la tension au niveau des adhésions focales soit suffisante.

Les propriétés élastiques de l'environnement peuvent largement influencer ce niveau de tension, de part la résistance qu'il oppose aux contraintes appliquées par la cellule. C'est pourquoi l'élasticité du support sur laquelle des cellules sont mises en culture influence profondément leurs comportements. En effet, les supports les plus rigides favorisent l'étalement cellulaire car ils ralentissent le *turnover* des adhésions focales et favorisent leur maturation. Cette maturation est due en partie par l'induction de changements conformationnels et le recrutement de protéines mécano-sensibles telles que la Taline et la Vinculine, qui en retour stabilisent tout le complexe, augmentent la force de liaison des intégrines au ligand et augmentent la force de traction exercée sur le support par la cellule. A l'inverse, les substrats les plus élastiques peuvent par exemple favoriser la migration cellulaire, les adhésions étant moins stabilisées et leur *turnover* plus rapide ou encore la sécrétion de MMP pouvant être augmentée. En plus d'impacter les propriétés adhésives et migratoires des cellules, l'élasticité du substrat peut également à elle seule induire un programme de différenciation des cellules souches, en activant certains co-activateurs transcriptionnels. Il est important de noter cependant que toutes les cellules ne semblent pas être sensibles au même seuil d'élasticité, la réponse des cellules à la rigidité est donc dépendante du type cellulaire.

Ainsi, l'élasticité environnementale peut moduler des processus essentiels tels que l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire, processus clés du développement embryonnaire et en particulier du SNE.

V - Objectifs des travaux de thèse

Le SNE provient de la colonisation de l'intestin embryonnaire par une population hétérogène de CCN, les CCNEs. Les CCNEs donneront les différents types de cellules gliales et de neurones composant le réseau de ganglions nerveux entourant toute la longueur du tractus digestif. Chacune des CCNEs possède des disparités de comportements individuels dont la somme ne permet pas de prédire le comportement général de la population de CCNEs. Ainsi la colonisation de l'intestin est un processus long et complexe qui n'est pas encore compris dans sa globalité. En effet, le développement du SNE fait appel à la coordination de plusieurs processus cellulaires clés pouvant s'influencer les uns les autres : la prolifération (afin d'assurer un pool suffisant de CCNEs capables de coloniser tout l'intestin), l'adhérence des CCNEs entre elles et à la MEC, la composition de cette dernière, une fine balance entre l'exécution du programme de différenciation et le maintien d'un taux suffisant de progéniteurs indifférenciés et enfin la migration collective. Ces processus cellulaires sont régulés en partie par les facteurs solubles présents dans l'environnement intestinal comme le GDNF et l'EDN3, ainsi que par de nombreuses interactions génétiques et fonctionnelles entre plusieurs de ces acteurs moléculaires dont la voie EDN3/EDNRB qui nous intéresse plus particulièrement. **Cependant, aucune interaction fonctionnelle entre la voie EDN3/EDNRB et les intégrines- β 1 n'a été étudiée à ce jour chez les CCNEs. De même, les propriétés mécaniques de l'intestin embryonnaire, la mécanosensation des CCNEs et son impact sur leurs comportements et le développement du SNE n'ont pas été caractérisés.**

Mon projet de thèse vise à comprendre l'impact des propriétés biochimiques et mécaniques de l'intestin embryonnaire sur les comportements des CCNEs. Plus particulièrement les objectifs de ma thèse sont les suivants:

(1) L'étude du rôle de l'EDN3 sur l'adhérence des CCNEs et son interaction fonctionnelle et génétique avec les intégrines- β 1. Les mutants murins conditionnels β 1^{null} créés par notre laboratoire présentent un phénotype de HSCR similaire à celui des mutant *Edn3*^{Isl5}, qui se caractérise par un défaut de colonisation du cæcum et du *hindgut* proximal visible entre E11.5 /E12.5 (Baynash, Hosoda et al. 1994; Breau, Pietri et al. 2006). Le cæcum est une région de l'intestin embryonnaire dont la MEC est enrichie en EDN3 et

présente un gradient de TNC et de FN (Breau, Dahmani et al. 2009). Si le rôle de l'EDN3 dans le maintien à la fois d'un pool suffisant de progéniteurs indifférenciés et d'un environnement permissif pour la colonisation du *hindgut* a été démontré, son rôle dans la régulation des propriétés adhésives des CCNEs est encore inconnu. De plus, notre laboratoire a mis en évidence le rôle indispensable des intégrines- β 1 dans la migration des CCNEs au niveau du cæcum qui leur permet d'outrepasser l'inhibition de l'adhérence induite par la TNC en favorisant la migration dépendante de la Fibronectine. Cependant, les acteurs moléculaires régulant l'activité des intégrines au niveau des CCNEs ne sont pas encore connus. Par ailleurs, il est intéressant de faire remarquer que dans un autre contexte cellulaire, l'EDN3 a été montrée comme régulant positivement les propriétés adhésives des cellules de gliome en agissant sur les intégrines- β 1 lorsque ces dernières sont en présence de TNC (Lange, Kammerer et al. 2007).

(2) L'étude de l'impact des propriétés élastiques de l'intestin embryonnaire sur la colonisation des CCNEs. Il est clairement établi à présent que les cellules détectent et répondent aux propriétés mécaniques de leur l'environnement, qui modulent leurs capacités adhésives et migratoires. Cependant, la réponse des CCNEs à l'élasticité extérieure n'a jusqu'à présent pas été étudiée. De mêmes, seules les propriétés mécaniques de l'intestin embryonnaire de poulet à des stades tardifs ont été analysés (Savin, Kurpios et al. 2011), mais aucune donnée à notre connaissance n'est disponible concernant les stades précoces ou les embryons de souris. C'est pourquoi le second objectif de ma thèse, en collaboration avec Vincent Fleury et Nicolas Chevalier du laboratoire des Matières et Systèmes Complexes (Université Paris-Diderot) est de caractériser les réponses adhésives et migratoires des CCNEs lorsqu'elles sont confrontées à des supports 2D et 3D de rigidités différentes ainsi que l'analyse des propriétés viscoélastiques de l'intestin au cours du développement du SNE.

(3) L'analyse de l'influence de la rigidité combinée aux stimuli biochimiques sur la différenciation des progéniteurs entériques. En effet, les propriétés mécaniques de l'environnement pouvant également influencer le programme de différenciation des cellules souches, il est important d'analyser cet effet sur les progéniteurs entériques, car aucune donnée à notre connaissance n'est disponible à ce sujet. Enfin, l'EDN3 jouant un rôle primordial dans le maintien du pool de progéniteurs entériques, en inhibant la différenciation neuronale, il est intéressant d'analyser l'effet du couplage entre les

propriétés biochimiques et mécaniques de l'environnement sur le devenir des progéniteurs entériques. Ce dernier objectif a fait l'objet de ma 4^{ème} année de thèse financée par l'ARC.

Ces objectifs s'inscrivent dans une volonté de mieux appréhender dans leur globalité les mécanismes contrôlant le développement physiologique et pathologique du SNE. De plus, les résultats ainsi obtenus permettront d'étendre les connaissances actuelles concernant la réponse des CCNEs à l'élasticité de l'intestin embryonnaire et comment le couplage entre les propriétés biochimiques et mécaniques de ce dernier module leurs comportements adhésifs, migratoires ainsi que le devenir des progéniteurs entériques. Ces mécanismes fondamentaux étant indispensables à la colonisation des CCNEs et au bon développement du SNE. Enfin, ces résultats contribueront à l'amélioration des protocoles de thérapies cellulaires qui représentent de véritables espoirs de guérison pour les patients atteints de HSCR (Hotta, Stamp et al. 2013).

RÉSULTATS

RESULTATS

I - Interactions fonctionnelles et génétiques entre l'EDN3 et les intégrines- $\beta 1$ au cours de la colonisation des CCNEs

Cette étude soumise pour publication (article 1), s'inscrit directement dans la suite des travaux précédemment réalisés par notre équipe sur l'implication des intégrines- $\beta 1$ dans la colonisation des CCNEs, ainsi que de la nécessité de décrypter de nouvelles interactions génétiques gouvernant le développement du SNE. Les résultats ainsi obtenus nous permettront d'élargir le réseau d'interactions déjà connu et de mieux appréhender la maladie de HSCR. Cette étude a démarré en collaboration avec Nadège Bondurand et Yuli Watanabe lorsque notre équipe était localisée à l'Institut Curie, et s'est poursuivie dans notre nouvelle équipe à l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale. Ce projet a fait l'objet d'un financement ANR (projet ENSINTED, dont Sylvie Dufour est la coordinatrice).

- *La voie EDN3/EDNRB est-elle impliquée dans la régulation de l'adhérence des CCNEs aux protéines de la MEC intestinale ? (In vitro)*

Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé en parallèle deux modèles animaux couramment utilisés lors des études du développement du SNE :

- **le modèle murin** (présentant les avantages de la manipulation génétique). Pour les souris, nous avons utilisé la lignée transgénique *Ht-PA::Cre* précédemment établie par le laboratoire, croisée à la lignée $\beta 1^{lox/lox}$; *YFP^{lox/lox}* afin d'obtenir des embryons *Ht-Pa::Cre* ; $\beta 1^{lox/+}$; *YFP^{lox/+}* hétérozygotes pour les intégrines- $\beta 1$ et dont la YFP est spécifiquement exprimée par les CCN (Fig. 28). Ces embryons sont dénommés embryons « contrôles » (Fässler and Meyer 1995).
- **le modèle aviaire** (plus facilement accessible et moins coûteux)

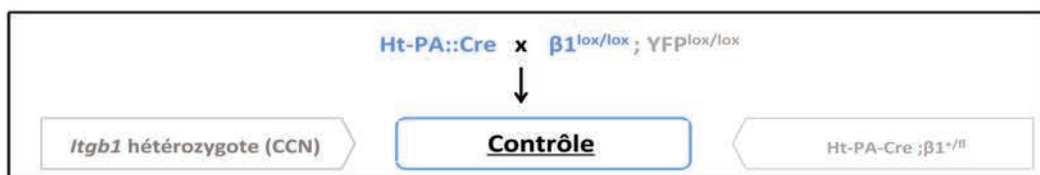


Figure 28 : Croisements permettant l'obtention des embryons « contrôles »

La YFP est exprimée par toutes les CCN (Watanabe 2014)

Nous avons dans un premier temps analysé *in vitro* si l'EDN3 modifiait les propriétés d'adhérence des CCNEs provenant d'explants de *midguts* contrôlés à E12.5 mise en culture sur différentes protéines de la MEC exprimées par l'intestin embryonnaire. La FN et la TNC, car elles sont toutes les deux fortement exprimées au niveau du cæcum au moment de l'invasion des CCNEs ainsi que la Vitronectine (VN) (Breau, Dahmani et al. 2009). Nous avons pour cela analysé en détail le nombre et la taille (Aire et diamètre de Féret) des adhérences focales positives pour les intégrines- β 1 et la Paxilline (FN, FN+TNC et VN) ainsi que celles positives pour les intégrines- β 3/Paxilline sur la VN. Nous avons également analysé les effets à court terme de l'EDN3 sur les propriétés adhésives et la dynamique membranaire des CCNEs (murines et aviaire) par imagerie *time-lapse*. Enfin, nous avons analysé l'expression des intégrines- β 1 et les adhérences focales formées par les intégrines- β 1 chez les mutants *Edn3^{Isls}*.

- *Existe-t-il une interaction génétique entre l'Edn3 et Itgb1 ? (In vivo)*

Afin de mettre en évidence une interaction génétique entre ces deux gènes, Yuli Watanabe a réalisé plusieurs séries de croisements afin de pouvoir générer les double-mutants (Fig. 29). Deux catégories de mutants ont été générées que nous avons dénommées, par soucis de simplification, les mutants non conditionnels, c'est à dire ceux non-porteurs de la recombinaison Cre (l'inactivation d'*Itgb1* ne sera donc pas spécifique des CCN mais touchera tous les tissus) et les mutants conditionnels, porteurs de la recombinaison Cre (*Ht-PA::Cre*) chez qui uniquement les CCN seront invalidées pour *Itgb1* et exprimeront la YFP (Fig. 29). Ces deux catégories de mutants nous permettent en particulier de pouvoir distinguer entre des défauts intrinsèques touchant les CCNEs ou bien des défauts impactant également leur environnement.

Yuli Watanabe a également analysé l'étendu de la colonisation des CCNEs par immunomarquages *in toto* d'intestins à E14.5 de tous les génotypes différents ainsi obtenus. En parallèle, Florence Broders-Bondon et Perrine Paul-Guilloteaux ont comparé les altérations du réseau neuronal formé dans les zones intestinales colonisées chez le DM avec les autres génotypes. Afin de mieux comprendre l'origine cellulaire des défauts observés, nous avons analysé par imagerie *time-lapse* les propriétés migratoires des CCNEs provenant de cultures *ex-vivo* d'intestins de DM et de certains mutants conditionnels exprimant

spécifiquement la YFP. Enfin, Yuli Watanabe est actuellement en train de finaliser les derniers résultats concernant un défaut potentiel d'apoptose chez les CCNEs des DMS.

Ensemble, nos résultats montrent que **l'EDN3 régule positivement l'adhérence des CCNEs par le biais des adhésions focales dépendantes des intégrines- β 1 et a un effet positif sur le remodelage du cytosquelette d'actine et la formation du lamellipode.** De plus, nous avons mis en évidence **une interaction génétique entre *Edn3* et *Itgb1* contrôlant la colonisation des CCNEs au cours du développement du SNE** et la formation du réseau neuronal.

Article 1

Endothelin-3 stimulates cell adhesion and cooperates with β 1-integrins during enteric nervous system ontogenesis.

Elodie Gazquez^{1,2,3}, Yuli Watanabe^{4,2,3}, Florence Broders-Bondon^{1,a}, Perrine Paul-Gilloteaux^{5,b}, Julie Heysch¹, Viviane Baral^{4,2,3}, Nadège Bondurand^{4,2,3} and Sylvie Dufour^{1,2,3,#}.

¹Institut Curie, CNRS, UMR144, Paris, 75005, France. ²INSERM, U955, Team 6, Créteil, 94000, France. ³Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, 94000, France. ⁴INSERM, U955, Team 11, Créteil, 94000, France. ⁵Cell and Tissue Imaging Facility, PICT-IBiSA, Paris, 75005, France.

corresponding author. INSERM U955, Equipe 6, Hôpital Henri Mondor, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010, Créteil, France.

Email: sylvie.dufour@inserm.fr; Tel: +33149813635. Fax: +33148993345

Present address: ^aInstitut Curie, CNRS, UMR168, Paris, 75005, France. ^bCNRS, UMS3556 SFR Santé F. Bonamy, Nantes, 44000, France.

Keywords: enteric nervous system, neural crest cells, EDNRB, migration, focal adhesion.

ABSTRACT

Endothelin-3 (EDN3) and β 1-integrins are required for the colonization of the embryonic gut by enteric neural crest cells (ENCCs) to form the enteric nervous system (ENS). β 1-integrin-null ENCCs exhibit migratory defects in a region of the gut enriched in EDN3 and in specific extracellular matrix (ECM) proteins. We investigated the putative role of EDN3 on ENCC adhesion properties and its functional interaction with β 1-integrins during ENS development. We show that EDN3 stimulates ENCC adhesion to various ECM components *in vitro*. It induces rapid changes in ENCC shape and protrusion dynamics favouring sustained growth and stabilization of lamellipodia, a process coincident with the increase in the number of focal adhesions and activated β 1-integrins. *In vivo* studies and *ex-vivo* live imaging revealed that double mutants for *Itgb1* and *Edn3* displayed a more severe enteric phenotype than either of the single mutants demonstrated by alteration of the ENS network due to severe migratory defects of mutant ENCCs taking place early during the ENS development. Altogether, our results highlight the interplay between the EDN3 and β 1-integrin signalling pathways during ENS ontogenesis and the role of EDN3 in ENCC adhesion.

INTRODUCTION

Development of the enteric nervous system (ENS) starts by the colonisation of the intestine by enteric neural crest cells (ENCCs) that migrate rostrocaudally through the gut mesenchyme and the mesentery. This requires the coordinated regulation of ENCC migration, proliferation, differentiation into neurons and glial cells (for review ¹), and their aggregation to form the ENS ganglia network ²⁻⁴. This process is governed by ENCC-autonomous and non-autonomous mechanisms, including cell responses to environmental cues, including extracellular matrix (ECM) and soluble factors ⁵⁻⁷, such as endothelin-3 (EDN3) ^{8,9}.

EDN3 is expressed in the developing gut and at high levels in the caecum when ENCCs migrate into this zone ¹⁰. The EDN3/EDN receptor type B (EDNRB) signalling pathway plays a crucial role during ENS development. EDN3 plays an important role in enteric progenitor maintenance and self-renewal ^{9,11,12}. It is also involved in ENCC migration ^{13,14} and contributes to the maintenance of a permissive environment for ENCC colonization ¹⁵⁻¹⁷. *Ednrb*^{-/-} and *Edn3*^{ls/ls} mutant mice exhibit distal aganglionosis ¹⁸⁻²⁰ due to defective colonization of the hindgut by ENCCs, which fail to migrate forward through the ileo-caecal junction at E12.5 ^{20,21}.

ENCCs express various integrins ²²⁻²⁴, cell surface receptors that control adhesion to the ECM and many cellular behaviours, including migration, proliferation, survival, and the control of stem cell fate ²⁵⁻²⁷. β 1-integrins regulate ENCC colonization of the gut and act in cooperation with N-cadherin to control proper ENS network organisation ^{24,28}. The conditional invalidation of *Itgb1* in NCCs produces aganglionosis of the distal colon underscoring the requirement for β 1-integrin functions during ENS ontogenesis ²⁴. β 1-integrin-null ENCCs display defective migration at the entry of the caecum, a region that is enriched in fibronectin (FN) and tenascin-C (TNC) at the timing of its colonization by ENCCs ⁵. The phenotype of conditional *Itgb1* mutants ²⁴ resembles that described for *Ednrb*^{-/-} and *Edn3*^{ls/ls} mice. The perturbation of EDNRB signalling through the action of the selective EDNRB antagonist, BQ788, in *ex vivo*-embryonic gut cultures produces a rounding up of ENCCs and modifications of their migratory behaviour ^{29,30}. These results suggest the possible interplay between

integrins, ECM, and EDN3 signalling to control ENCC adhesion and migration during ENS development.

Here, we have investigated the effects of EDN3 on ENCC adhesion properties and the possible interplay between β 1-integrins and EDN3/EDNRB signalling during ENS development.

RESULTS

EDN3 increases ENCC adhesion and the number and size of focal adhesions.

We analysed the impact of EDN3 on ENCC adhesion by culturing E12.5 mouse midgut explants for 24 hours on FN, a permissive ECM protein for cell adhesion and migration, with or without EDN3. ENCCs usually escaped first from the gut explant followed by mesenchymal cells, and were easily distinguished by their morphology and YFP expression. Although they migrated properly at the periphery, the global morphology of ENCC clusters appeared to be more spread-out in the presence of EDN3 (Fig. 1A) and more ENCCs displayed a large lamellipodium than untreated cells. EDN3 treatment clearly increased both β 1*integrin (ECM receptor) and paxillin (FA marker) signals at the ENCC periphery (Fig. 1B). Quantification of focal adhesions (FAs) developed by ENCCs showed that EDN3 significantly increased their number relative to the control counterparts (Fig. 1C). The mean FA area and Feret's diameter (indicative of their length) were significantly increased by EDN3 treatment (Table S1).

Next, we performed the same analysis on cultures performed on FN+TNC; Fig. S1), a protein which is strongly expressed in the caecum and perturbs ENCC adhesion⁵. EDN3 strongly increased the number of ENCC FAs on FN+TNC. Quantification of their average number per ENCC revealed a two-fold increase of FAs in EDN3-treated ENCCs relative to untreated cells. ENCCs cultured on FN+TNC exhibited smaller FAs than cells cultured on FN alone. EDN3 slightly and significantly increased FA size, as observed for cells cultured on FN alone (Table S1).

Finally, we tested whether EDN3 also increases ENCC adhesion to VN, another permissive protein expressed in the embryonic gut mesenchyme. ENCCs displayed fewer and smaller FAs on VN than on FN. EDN3 significantly enhanced the average number of FAs per ENCC (Fig. S2A,B) and increased their size (Table S1). In addition to α V β 1 integrin, another receptor for VN is α V β 3

integrin. Unlike for $\beta 1$ *integrin, EDN3 did not modify $\beta 3$ -integrin-positive adhesion sites on this substrate. Indeed, very few $\beta 3$ -integrin signals were detected in either control or EDN3-treated cultures (Fig. S2C).

Altogether, our results indicate that EDN3 enhances the adhesive capacity of ENCCs to various ECM proteins expressed in the embryonic gut through the stimulation of the number and size of FAs.

EDN3 induces a rapid change in ENCC morphology

We analysed the kinetics of the response of to EDN3 to further investigate whether the effect is direct or indirect. We determined the time course of the EDN3' response in mouse (Fig. 2) and chick midgut cultures (Fig. S3). The explants were cultured on FN in control medium overnight before stimulation by EDN3 for various times. The change in the morphology of ENCCs we previously observed after 24 h of EDN3 treatment was also visible when cultures were treated for only 30 min and one h, whereas it was not observed in their control counterparts (Fig. 2A, arrows, and Fig. S3). We analysed the morphological changes of ENCCs after short EDN3 treatment, especially protrusion dynamics, using time-lapse imaging of both mouse (movies 1 to 4; Fig. S4) and chick cultures (movies 5 to 8; Fig. S4). After overnight culture, and before adding the EDN3, ENCCs exhibited rapid membrane dynamics, producing numerous filopodia, ruffles, and unstable lamellipodia (Fig. 2B). We observed that 10-15 minutes after the medium was replaced, 21% of mouse ENCCs and 72% of chick ENCCs displayed a large lamellipodium, which was stable for several minutes (number of cells analysed: 261 and 38 for mouse and chick, respectively). In contrast, there was no change in membrane dynamics when the medium was replaced with control medium containing the solvent (Fig. 2B) (number of cells analysed: 193 and 49 for mouse and chick, respectively). This indicates that EDN3 rapidly modulates cell morphology changes and membrane protrusion dynamics of ENCCs.

EDN3 induces sustained growth of ENCC lamellipodia through actin cytoskeleton remodelling

Lamellipodia formation is under the control of branched actin polymerization at the cell leading edge, a process requiring the ARP2/3 complex, nucleating factors such as WAVE³¹, and the

RHO family of small GTPases³². We therefore compared the distribution of WAVE2 and the actin cytoskeleton between untreated ENCCs and those treated with EDN3 for one h and overnight. We detected WAVE2 staining at the periphery of lamellipodia under both conditions. However, we observed more ENCCs exhibiting largely spread lamellipodia with bright WAVE2 staining in cultures treated overnight or for one hour with EDN3 (Fig 2C and D, white arrows) than under control conditions (Fig 2C and D). In addition, control ENCCs exhibited cortical actin (Fig. 2E and F), whereas the actin cytoskeleton of EDN3-treated ENCCs was remodelled in both one hour and overnight cultures, with less cortical actin staining and a larger branched actin network at the lamellipodia edges (Fig. 2E and F, white arrows). Similar results on F-actin organisation were observed in chick ENCCs after treatment (Fig. S3).

Altogether, our results show, for the first time, that EDN3 elicits the rapid and sustained growth of ENCC lamellipodia, probably through an ARP2/3-WAVE2-dependent mechanism that triggers actin cytoskeleton remodelling at the cell edge.

Kinetics of EDN3 effect on ENCC FAs

The growth of lamellipodia is linked to the connection between integrin-dependent adhesion and the actin cytoskeleton³³. We thus analysed the FAs formed by ENCCs after stimulation by EDN3 for 30 min, one, and three hours. Shorter EDN3 treatment also increased the number of both $\beta 1$ *integrin- and paxillin-positive FAs in mouse (Fig. 3) and chick ENCCs (Fig. S3). Indeed, we observed a more than a two-fold increase in the average number of FAs per ENCC (Fig. 3) and in the FA size for 30 min and 3 h periods relative to controls (Table S1). After one hour of EDN3 treatment, the Feret's diameter of the FAs increased slightly relative to controls, but there was no effect on their mean area.

Our results show that EDN3 can increase ENCC adhesion after 30 min of treatment, revealed by the rapid increase of the $\beta 1$ *integrin signals and the number of FAs displayed by ENCCs. Moreover, this effect is persistent over time.

Adhesion properties of *Edn3*^{ts/ts} ENCCs.

We analysed the adhesion properties of ENCCs in the context of the *Edn3*^{ls} mutation. We first performed cryosections of *Edn3*^{ls/ls} midgut that we immunostained for β 1-integrin and p75^{NTR} (Fig. 4A). ENCCs (p75^{NTR+}) and all other cells of *Edn3*^{ls/ls} mutant gut expressed β 1-integrins, as previously observed in controls²⁴. We then compared the capacity of ENCCs to form FAs. We observed a decrease in signal intensity for β 1*integrin in *Edn3*^{ls/ls} ENCCs relative to *Edn3*^{+/+} cells on FN for 24 h. (Fig. 4B). Quantification of β 1*integrin-positive adhesion sites revealed a 37% decrease in the number of FAs displayed by *Edn3*^{ls/ls} ENCCs relative to *Edn3*^{+/+} cells (Fig. 4C). No significant changes were observed for the FA area (0.197±0.001 and 0.200±0.003 μ m² for *Edn3*^{ls/ls} and *Edn3*^{+/+}, respectively) but their Feret's diameter increased slightly (0.783±0.003 and 0.754±0.002 for *Edn3*^{ls/ls} and *Edn3*^{+/+}, respectively, p<0.001). There was no difference between the paxillin-positive FAs in the mutant and control ENCCs (Fig. 4B,C).

Our results show that *Edn3*^{ls/ls} ENCCs express β 1-integrins but recruit less β 1-integrins to the FAs relative to control cells.

***Itgb1* heterozygosity leads to a reduced extent of gut colonization by ENCCs in the context of the *Edn3*^{ls/ls} mutation.**

It was previously shown that both the *Edn3*^{ls/ls} mutant mice, as well as the conditional mutant with NCC-targeted *Itgb1* deletion (Ht-PA-Cre;*beta1*^{neo/fl}; hereafter referred as β 1^{null}), display distal aganglionosis^{19,24}. We investigated whether the depletion of β 1-integrin affects EDNRB expression, in addition to perturbing ENCC adhesion and migration properties⁵. Immunostaining of E13.5 control and β 1^{null} midgut sections for EDNRB expression revealed that mutant ENCCs expressed similar levels of EDNRB at their surface as control cells (Fig. S5), indicating that they can bind EDN3 present in their environment. *In situ* hybridization experiments showed the presence of *Edn3* mRNA in the β 1^{null} embryonic gut as well (unpublished observations).

We then tested the consequences of combined depletion of β 1-integrin and EDN3, *in vivo*. We first analysed the impact of introducing the heterozygous *Itgb1* mutation in the context of *Edn3* mutants, because invalidation of the *Itgb1* gene is lethal at the peri-implantation stage³⁴. We prepared

a series of intercrosses (see Material and Methods) to obtain mutant embryos of six genotypes of interest. For the sake of simplicity, the genotype abbreviations used to describe the mutants of interest are presented in Table 1. We compared enteric phenotype at stage where the complete colonization of the gut by ENCCs would normally occur (E14.5), using whole-mount immunostaining with the neuronal class III β -tubulin TUJ1 marker. Consistent with previous findings^{24,35}, the heterozygous $\beta 1^{\text{neo}}$, Edn3^{het} and $\beta 1^{\text{neo}};\text{Edn3}^{\text{het}}$ guts were fully colonized (Fig. S6). The $\beta 1^{\text{neo}};\text{Edn3}^{\text{het}}$ guts were also fully colonized whereas $\text{Edn3}^{\text{null}}$ guts showed a delay of colonization revealed by the absence of TUJ1⁺ cells from the distal portion of the small intestine or the caecum. All $\beta 1^{\text{neo}};\text{Edn3}^{\text{null}}$ guts exhibited a colonization defect and four of the seven $\beta 1^{\text{neo}};\text{Edn3}^{\text{null}}$ guts analysed had a more severe phenotype characterized by the absence of TUJ1⁺ cells halfway through the small intestine relative to $\text{Edn3}^{\text{null}}$ guts.

This suggests that reduction of integrin levels in the context of the *Edn3* mutation influences ENS development.

ENCC *Itgb1* conditional invalidation in the context of the *Edn3*^{ls/ls} mutation leads to a reduced extent of gut colonization and enteric ganglia network disorganisation.

We then analysed the impact of the targeted conditional deletion of the *Itgb1* gene in NCCs in the context of the *Edn3*^{ls/ls} using a double mutant crossing strategy with Ht-PA::Cre mice (see Material and Methods) (Table 1). The enteric phenotypes of these six classes of mutants obtained were compared as described above. We thus observed that the $\beta 1^{\text{het}}$ guts were fully colonized whereas the $\beta 1^{\text{null}}$ guts exhibited delayed colonization (absence of TUJ1⁺ cells from the caecum, Fig. 5A), consistent with previous findings^{24,28,36}. All the $\beta 1^{\text{het}};\text{Edn3}^{\text{het}}$ guts were fully colonized and were similar to $\beta 1^{\text{neo}};\text{Edn3}^{\text{het}}$ (Fig. S6), but both the $\beta 1^{\text{het}};\text{Edn3}^{\text{null}}$ and $\beta 1^{\text{null}};\text{Edn3}^{\text{het}}$ guts showed a delay of colonization from the distal portion of the small intestine or from the caecum. One of the four guts analysed of $\beta 1^{\text{het}};\text{Edn3}^{\text{null}}$ and $\beta 1^{\text{null}};\text{Edn3}^{\text{het}}$ embryos exhibited a more severe delay of colonization blocked before two-thirds of the small intestine relative to $\text{Edn3}^{\text{null}}$ and $\beta 1^{\text{null}}$ embryos (Figs. S6,5A). In contrast, all the $\beta 1^{\text{null}};\text{Edn3}^{\text{null}}$ showed more severe delay in colonization relative to single mutants,

with TUJ1 staining stopping at the beginning or within the first half of the small intestine in all cases (Fig. 5A).

We also observed disorganisation of the neuronal network with abnormal aggregates surrounded by enlarged TUJ1-free spaces along the $\beta 1^{\text{null}}$ guts, as previously described^{24,28,36}. This network disorganisation was greater in $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn3}^{\text{null}}$ guts that exhibited larger TUJ1-free regions, but not in other genotypes (Fig. 5A). We quantified the ENCC distribution in the colonized part of the gut in the different genotypes (i.e. the beginning of the small intestine) and measured the ENCC-free areas above the mean size of those of the controls. We observed significantly enlarged ENCC-free areas in $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn3}^{\text{null}}$ guts relative to the $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn3}^{\text{null}}$, $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn3}^{\text{het}}$ and $\beta 1^{\text{het}}$ guts (Fig. 5B).

In addition, we compared the organisation of the ENS in the second half of the small intestine in the non-conditional and conditional mutants, with the exception of the $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn3}^{\text{null}}$ mutants in which it did not reach this part of the gut. We quantified the texture and performed a principal component analysis (PCA) of the neuronal network (TUJ1⁺) to detect distinct network organisations. The dots for the non-conditional mutant $\beta 1^{\text{neo}}; \text{Edn3}^{\text{null}}$ were separated from the other dots by a decision line demonstrating a distinct organisation of the ENS in this mutant relative to the others (Fig. S7). This result demonstrates that $\beta 1$ -integrin heterozygosity, in the context of the *Edn3* mutation, leads to a significant change in the ENS network that is not observed for EDN3 depletion or $\beta 1$ -integrin depletion alone in ENCCs.

Thus, combined deficits in EDN3 function and $\beta 1$ -integrin-mediated adhesion caused profound ENS defects.

Timing and cellular origin of ENS defects in double mutants.

To determine the origin of the defects we analysed the behaviour of ENCCs earlier during development. Whole-mount X-Gal staining performed on E11.5 guts (Fig. S8) revealed a normal colonization in $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn3}^{\text{het}}$ guts, with the ENCC migratory front located at the entry of the caecum, and a slight colonization delay in the $\beta 1^{\text{null}}$ ²⁴, and in $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn3}^{\text{null}}$ and $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn3}^{\text{het}}$ where ENCC front reached the second third of the midgut. In contrast, the $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn3}^{\text{null}}$ guts exhibited a severe

colonization defect, as revealed by ENCC stopped in the proximal stomach.. These results suggest that genetic interaction between *Itgb1* and *Edn3* loci is taking place early during the ENS development.

We next investigated the migratory properties of ENCCs in the $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn}3^{\text{null}}$ midguts relative to the other genotypes mutants, taking advantage of YFP expression targeted in these cells. We performed time-lapse imaging of *ex-vivo* gut cultures and analysed individual trajectory of YFP⁺ ENCCs at the migratory front to determine their dynamic behaviours within the embryonic gut between E12.5-E13.5. At the beginning of live imaging, ENCC migration fronts were located within different parts of the gut, depending on the genotype analysed. Migratory fronts of both control $\beta 1^{\text{het}}$ and $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn}3^{\text{het}}$ guts were at the distal hindgut, whereas the migratory fronts of $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn}3^{\text{het}}$ and $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn}3^{\text{null}}$ were at the distal midgut. No clear migratory front was distinguishable for $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn}3^{\text{null}}$ guts; although $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn}3^{\text{null}}$ ENCCs reached the stomach exit, more radial portions of the stomach remained uncolonized. Figure 6A presents examples of ENCC trajectories for each genotype. The morphology of $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn}3^{\text{null}}$ ENCCs resemble that observed in $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn}3^{\text{het}}$ mutants with some isolated ENCCs exhibiting a rounder shape and others exhibiting increased aggregation capacity relative to the other genotypes. The trajectories of $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn}3^{\text{null}}$ ENCCs were clearly shorter than for all the other genotypes. The double-mutant ENCCs were motile but with no real migratory capacity and some were static, reflecting their inability to efficiently migrate rostrocaudally or in radial directions. The migration speed of the $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn}3^{\text{null}}$ ENCCs was significantly lower than that measured for $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn}3^{\text{het}}$ and $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn}3^{\text{null}}$ ENCCs and both control $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn}3^{\text{het}}$ and $\beta 1^{\text{het}}$ ENCCs. The migration speed of $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn}3^{\text{het}}$ and $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn}3^{\text{null}}$ ENCCs were not significantly different from each other, whereas they were significantly less than that of $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn}3^{\text{het}}$ control ENCCs. Finally, $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn}3^{\text{null}}$ ENCCs displayed a slight, albeit significant, reduction in the persistence of their migration relative to $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn}3^{\text{het}}$ ENCCs, whereas no significant differences were found when the other genotypes were compared to each other (Fig. 6B).

Altogether, our results show a severe migratory defect of double-mutant ENCCs that fail to migrate efficiently through the midgut, thus highlighting the cooperation between *Edn3* and *Itgb1* to control ENCC migration.

DISCUSSION

EDN3 is involved in the maintenance of enteric progenitors in an undifferentiated state¹¹ and regulate their migration¹³. A relationship between EDN3 and adhesion to the ECM has been demonstrated in astrocytes by stimulating tyrosine phosphorylation of FAK and paxillin³⁷, and in cancer cells^{38,39}. In melanoma cells, EDN3 stimulates the expression of α V β 3 and α 2 β 1 integrins³⁹. In the present study, our results highlight the interplay between the EDN3 and β 1-integrin signalling pathways during ENS ontogenesis as well as the major role of EDN3, alone and in combination with β 1-integrins, in controlling ENCC adhesion (Fig. 7).

Here, we demonstrate a novel role for EDN3 in the adhesion of ENCCs through the increase of FA number and size. We found that the stimulatory effect of EDN3 on cell adhesion is not species-specific as we observed it in both murine and avian ENCCs. Indeed, we observed an EDN3-dependent increase in both activated β 1-integrin and paxillin signals at the cell-ECM interfaces. We observed similar increases in chick ENCCs immunostained for pan- β 1-integrin or its active state, suggesting that EDN3 does not act directly on integrin activation but rather influences signalling cascade favouring FA formation or maturation. The EDN3 effect on ENCC adhesion occurs rapidly, as it is observed within less than 30 min of stimulation, and is retained for longer periods of treatment. This supports a direct effect on ENCC adhesion rather than an indirect effect related to the activity of EDN3 in maintaining a progenitor state through the regulation of gene expression. EDN3 increased the formation of β 1-integrin- and paxillin-positive FAs, but we also observed some β 1-integrin-positive FAs with faint or undetectable paxillin staining. Future studies should focus on analysing the impact of EDN3 on the recruitment of other proteins of the integrin adhesome⁴⁰.

In line with the observed increase in FAs shortly after EDN3 treatment, EDN3 rapidly stimulated sustained growth of lamellipodia and changes in actin cytoskeleton remodelling which is known to favour the formation and growth of FAs. This suggests a role of EDN3 in cell polarization, which is important for directional cell migration. Our observation is in agreement with previous findings¹³ showing that treatment of gut explants with EDN3 rapidly increases RAC activation, a

small GTPase of the RHO family which is known to regulate actin cytoskeleton remodelling and stimulate the branched actin network responsible for lamellipodia formation^{41,42}. We observed an increase in lamellipodia and WAVE2-positive protrusions in ENCCs stimulated with EDN3. In agreement with this observation, glioblastoma stem cells treated with the EDNRB antagonist BQ788 displayed downregulation of the *WASF2* gene that encodes WAVE2⁴³. These results collectively suggest a role for WAVE2 as a downstream effector of EDN3-mediated regulation of ENCC adhesion, cytoskeleton remodelling, and membrane dynamics.

EDN3-dependent signalling was shown to counteract the inhibitory effect of TNC on glioblastoma cell adhesion to FN³⁸. On VN, TNC has an inhibitory effect on ENCC adhesion and migration while FN stimulates these processes⁵. Here, ENCCs exhibited a similar number of FA when cultured on FN alone or on FN+TNC, but they were smaller in size in the latter case. We show that EDN3 can equally stimulate ENCC adhesion properties in FN and FN+TNC-coated surfaces. The effect of EDN3 on glioblastoma cells is dependent on $\alpha5\beta1$ integrin and syndecan4³⁸. ENCCs express $\alpha5\beta1$ integrin and syndecan4 but treatment with heparin does not impede their adhesion to FN (unpublished observations) suggesting that syndecan4 does not play a crucial role in ENCC adhesion to FN and that the EDN3-dependent regulation of adhesion may vary depending on cell type.

ENCCs displayed fewer FAs on VN than on FN. They recruited much more $\beta1$ -integrin than $\beta3$ -integrin to their adhesion sites when cultured on VN. EDN3 increased the number of $\beta1$ -integrin-mediated adhesions but not the $\beta3$ -integrin-mediated adhesions on VN. This indicates that EDN3 probably acts by reinforcing $\beta1$ -integrin-mediated adhesions and not by changing the ENCC adhesion mode on ECM-coated surfaces.

Edn3^{ls/ls} ENCCs express $\beta1$ integrins, but display fewer FAs than their control counterpart *in vitro*, on FN. This suggests that mutant ENCCs may exhibit a cell autonomous adhesion defect. This adhesion defect detected *in vitro* may be worse *in vivo*. It may synergize with the effect of EDN3 depletion in altering the ENCC environment, such as by changing the ECM composition in the surrounding tissue as described in *Edn3^{ls/ls}* mutants¹⁵.

Interactions between *Edn3* and *Sox10*^{11,35} and between *Sox10* and *Zfhx1b*⁴⁴ control ENS progenitor survival and differentiation. We also demonstrated the interplay between *Sox10* and β 1-integrins during ENS development³⁶, suggesting that integrins may act to modify the ENS phenotype as shown for the gene encoding the adhesion molecule L1CAM^{45,46}. Here, we highlight a new genetic interaction between the *Edn3* and *Itgb1* during ENS development, both in regulating gut colonization and organising the ganglia network. β 1^{null};Edn3^{null} ENCCs display altered ECM adhesion, increased aggregation, and reduced migration speed and persistence of movement. These alterations were already described for β 1^{null} ENCCs but were more pronounced in β 1^{null};Edn3^{null} guts. Some β 1^{null};Edn3^{null} ENCCs were static or formed clusters blocked at the stomach exit or half-proximal part of the midgut.

Of note, comparison of the enteric phenotype of non-conditional and conditional mutants revealed that three of the seven analysed β 1^{neo};Edn3^{null} embryos presented severe defects relative to the single mutants, whereas we did not observe this for β 1^{het};Edn3^{null} embryos. The difference between the two genotypes is that the former is heterozygous for *Itgb1* deletion in both ENCCs and the surrounding cells whereas the latter is heterozygous for *Itgb1* deletion only in ENCCs. This argues for both β 1-integrin-mediated ENCC autonomous and non-autonomous effects in regulating ENS development in the *Edn3*^{ts/ts} context.

We also evidenced defects at E11.5 during the ENS development for β 1^{null};Edn3^{null} double mutants relative to single mutants with a migratory front located in the proximal stomach. Such pattern was previously associated with early vagal NCCs apoptosis³⁵ and previous findings showed that early depletion of vagal NCCs during their migration from the neural tube to the foregut impact on ENS development^{47,48}. An increased apoptosis of vagal NCC en route to the foregut probably occur in the double mutant which impacts on the enteric progenitor pool leading to the defective gut colonization process visible at E11.5. Together our results highlight the genetic interaction between the two loci that may rely on cooperative activity or on the successive requirement of these two molecules during ENS development

In the developing gut, ENCCs are subjected to EDN3 signalling which inhibits PKA activity and favours RAC activation as well as lamellipodia formation at the cell front ¹³. We show that under normal conditions, where ENCCs express β 1-integrins, EDN3 plays a role in increasing their adhesion properties. This is consistent with the observation of ENCC rounding after treatment of embryonic guts with BQ788 ^{29,30}. This process probably occurs all along the gut and especially in the caecum, which is enriched in EDN3 and ECM components including FN, TNC, and VN. The combined action of EDN3 on RAC activation, lamellipodia dynamics, and β 1-integrin-mediated adhesion help to support the interaction of ENCCs with the ECM, cell spreading, and polarization to ensure proper gut colonization.

The elasticity of the environment plays a crucial role in modifying cell adhesive and migratory properties, as well as progenitor cell differentiation programs ⁴⁹⁻⁵¹. β 1-integrins are mechanoreceptors that control cell sensing to external tissue elasticity ⁵² and play an important role in controlling cell stem fate. ENCCs modulate their migration in response to the mechanical properties of their environment ⁵³. The activity of EDN3 on β 1-integrin-mediated adhesion may regulate the ability of ENCCs to sense the mechanical properties of the gut tissue during ENS development.

Altogether, our results highlight the genetic interaction between *Itgb1* and *Edn3* controls proper ENS development and the role of EDN3 in controlling ENCC adhesion. They underscore the importance of the autonomous adhesion properties of ENCCs in response to EDN3, which operate in concert with a β 1-integrin-dependent non-autonomous mechanism to modulate the properties of the ENCC environment. Our results may help to improve our understanding of the mechanisms that couple biochemical and mechanical cues of the environment in the control of the survival, proliferation, and fate determination of enteric progenitors.

MATERIAL AND METHODS

Animal models, mouse maintenance and genotyping

Mouse models used in this study are as follows: *lethal spotted Edn3^{ls}*^{19,35}, Ht-PA::Cre⁵⁴, *beta1^{neo/+}* carrying one null *Itgb1* allele⁵⁵, Ht-PA::Cre;*beta1^{neo/+}*⁵⁶ and *beta1^{fl/fl}*;R26RYFP mice carrying *Itgb1* floxed and YFP reporter alleles^{5,57,58}, referred to hereafter as *beta1^{fl/fl}*. Mouse models were used to produce embryos with genotypes of interest. The *beta1^{neo/+}* and *beta1^{fl/fl}* mice were crossed with *Edn3^{ls/+}* mice to produce *beta1^{neo/+}*;*Edn3^{ls/+}* and *beta1^{fl/fl}*;*Edn3^{ls/+}* mice. These mice were crossed to produce six additional progeny genotypes: *beta1^{+/fl}*;*Edn3^{+/+}* control, *beta1^{neo/fl}*;*Edn3^{+/+}* heterozygous for *Itgb1*, *beta1^{+/fl}*;*Edn3^{ls/+}* heterozygous for the *Edn3*, *beta1^{neo/fl}*;*Edn3^{ls/+}* double heterozygous, *beta1^{+/fl}*;*Edn3^{ls/ls}* *Edn3* mutant, and the *beta1^{neo/fl}*;*Edn3^{ls/ls}* mutant. In addition, Ht-PA::Cre;*beta1^{neo/+}* and *beta1^{fl/fl}* were crossed with *Edn3^{ls/+}* mice to produce Ht-PA::Cre;*beta1^{neo/+}*;*Edn3^{ls/+}* and *beta1^{fl/fl}*;*Edn3^{ls/+}* animals. These mice were then crossed to generate the six following progeny genotypes: Ht-PA::Cre;*beta1^{fl/+}* heterozygous for *Itgb1* in NCC²⁴, Ht-PA::Cre;*beta1^{fl/neo}* mutant for *Itgb1* in NCC and heterozygous in the other tissues, Ht-PA::Cre;*beta1^{fl/+}*;*Edn3^{ls/+}* and Ht-PA::Cre;*beta1^{fl/neo}*;*Edn3^{ls/+}* that are also heterozygous for the *Edn3^{ls}* mutation, and Ht-PA::Cre;*beta1^{fl/+}*;*Edn3^{ls/ls}* and Ht-PA::Cre;*beta1^{fl/neo}*;*Edn3^{ls/ls}* that are also homozygous for the *Edn3^{ls}* mutation. All exhibit YFP and β-galactosidase expression in NCCs. The crosses, genotypes generated, and corresponding classes of each genotype are presented in Table 1.

Fertilized chicken eggs (*Gallus Gallus*) from a commercial source (Morizeau, Dangers, France) were incubated at 38°C in a humidified incubator. Embryos were staged according to somite numbers and to the Hamburger and Hamilton staging chart.

Experiments were performed in accordance with the ethical guidelines of INSERM and the CNRS. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Institut Curie (National registration number: #118), and The Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale (C2EA -16).

Organotypic cultures and immunostaining

2D-cultures of mouse midgut explants on ECM-coated surfaces were performed as described previously⁵. Except when specified, the midguts were collected from Ht-PA::Cre; *beta1^{fl/+}* embryos (control) at stages E11.5 or E12.5 and cultured in a culture medium composed of DMEM-F12

(Invitrogen) supplemented with glutamine (Gibco 25030-081, 1/100), penicillin-streptomycin (Gibco 15140-122, 1/100) and ITS (insulin, transferrin, selenium solution, Invitrogen; 1/100). This makes it possible to easily distinguish ENCCs (YFP⁺) from mesenchymal cells. For treated cultures, EDN3 (VWR, France) was used at 100 nM or 1 μ M final concentration and compared to the control condition, hereafter referred as [-EDN3] in the figures. For the kinetics analyses, the medium of overnight cultures was changed with medium containing EDN3 [+EDN3] or solvent [-EDN3] at the same dilution as the EDN3 solution. We detected similar ENCC behaviour in the culture medium containing solvent or not. For chick 2D-cultures, midgut rings were collected at stage E6.5 and cultured as described above.

Cultures were performed on a surface coated either with fibronectin (FN, F1141, Sigma) at 10 μ g/ml, vitronectin (VN, 2348-vn-100, R&D systems) at 10 μ g/ml, or FN + Tenascin-C (TNC) (CC118, Merck Millipore), each at 10 μ g/ml. Cultures were fixed and immunostained with specific antibodies directed against Sox10 (enteric progenitor marker), YFP, activated β 1-integrin (β 1*), and paxillin (a focal adhesion (FA) marker).

Ex-vivo cultures of guts were carried out as described previously⁵. Whole guts were cultured in culture medium supplemented with 5% horse serum (Babco). Cell cultures and TUJ1 whole-mount immunostainings were performed as described previously^{8,35}. Preparation of samples and immunostaining on paraffin and cryosections of embryos and embryonic guts were performed as described previously^{56 59}.

The antibodies used are listed in Table S2.

Video time-lapse imaging and image acquisitions

2D-cultures of midgut explants were incubated overnight on FN. They were then imaged for 10 min before, and immediately after, the medium change with one containing EDN3 or solvent (control medium) for 30 min. Acquisitions were performed with one image taken every 20 s. mouse ENCCs can be distinguished from mesenchymal cells by their YFP expression. Chick ENCCs can be distinguished from mesenchymal cells due to a brief treatment in culture with an NC1 antibody directly coupled to a fluoprobe using LIGHTNING-LINK FLUOPROBES 647H (Interchim). Time-

lapse imaging of *ex-vivo* cultures of guts were carried out as described previously⁵ on whole guts cultured in culture medium supplemented with 5% horse serum (Babco).

Image acquisitions were performed at the Nikon Imaging Centre of the Institut Curie-CNRS (NIMCE@IC-CNRS) and the IMRB microscope facility. Analysis of ENCC cultures were performed using both inverted confocal A1-R Nikon and Zeiss Axio Observer Z1 microscopes. WAVE2 immunostaining images were recorded using both epifluorescence Nikon Eclipse 90i Upright and Zeiss AxioImager M2 microscopes. Image acquisitions of whole mount TUJ1 stainings and video-time lapses of 2D cultures, *ex-vivo* gut cultures, and YFP image acquisitions were carried out as previously described²⁸ using a Nikon Eclipse Ti confocal and inverted microscope.

Image and statistical analysis

Quantification of the effect of EDN3 on cell adhesion was performed as follows: nine images of the labelling of ENCC clusters were taken randomly at the periphery of three different gut explants per condition and per experiment. Several ENCCs were visible on each image as well as several mesenchymal cells. The focal adhesions (FAs) were segmented on images by manual thresholding using ImageJ. The signal corresponding to the FAs of mesenchymal cells was removed manually. The FA number, area, and Feret's diameter (which indicates the length of the FA along its most elongated direction) were quantified using ImageJ Analyse Particle plugin as described previously³⁶. The ratio between the number of FAs and the number of ENCCs was calculated for each image. The mean of the obtained ratios gives the average number of FAs per ENCC per condition analysed. The total number of ENCCs imaged and analysed is indicated in the figure legend.

Individual ENCCs of *ex-vivo* gut cultures were manually tracked using Metamorph 7.7.3.0 software to determine their speed of locomotion and persistence (the straightness of the trajectory, obtained by dividing the distance of the straight line between the initial and final point of the tracked cell by the total distance covered by the cell), as described previously⁵.

To quantify ENCC density, the area of gut tissue devoid of YFP⁺ cells (ENCCs) and TUJ1⁺ cells (neurons) was analysed and the proportion of ENCC-free area per image determined as described

previously²⁸. Segmentation was applied to the maximum intensity projection of 3–6 confocal slices taken from stained guts using a self-developed ImageJ macro based on K-means clustering⁶⁰.

Principal component analysis (PCA) was carried out as described previously²⁸ based on texture analysis of the segmentation. PCA allows either the detection of distinct network organisations for which their position in the PCA space is separated by a decision line or of similar populations for which their dots are in the same zone of PCA space.

For FA quantification, three independent experiments were performed for each condition. For *Edn3^{ls/ls}* and *Edn3^{+/+}* embryos, five guts each were analysed. Graphs associated with each figure represent the pool of three independent experiments. Mann-Whitney-Wilcoxon statistical tests were performed using R. For *ex-vivo* analyses, two independent experiments with embryos of different offsprings were analysed. Pairwise comparisons using the Student's *t* test with Holm correction of the p-value was performed using R. Statistical analyses of the ENS network and ENCC-free areas in guts were performed using the Student's *t* test with www.graphpad.com. P-values: not significant (ns) > 0.05; * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001.

Table 1: Crossing strategies and genotypes generated for non-conditional and conditional mutants.

Crossing strategy	Genotypes	Referred to in the text as:
For non conditional mutants: <i>beta1^{neo/+};Edn3^{ls/+}</i> <i>X beta1^{fl/fl};Edn3^{ls/+}</i>	<i>beta1^{+/fl};Edn3^{+/+}</i>	control
	<i>beta1^{neo/fl};Edn3^{+/+}</i>	$\beta 1^{\text{neo}}$
	<i>beta1^{+/fl};Edn3^{ls/+}</i>	Edn3^{het}
	<i>beta1^{neo/fl};Edn3^{ls/+}</i>	$\beta 1^{\text{neo}};\text{Edn3}^{\text{het}}$
	<i>beta1^{+/fl};Edn3^{ls/ls}</i>	$\text{Edn3}^{\text{null}}$
	<i>beta1^{neo/fl};Edn3^{ls/ls}</i>	$\beta 1^{\text{neo}};\text{Edn3}^{\text{null}}$
For conditional mutants: <i>Ht-PA::Cre;beta1^{neo/+};Edn3^{ls/+}</i> <i>X beta1^{fl/fl};Edn3^{ls/+}</i>	<i>Ht-PA::Cre;beta1^{fl/+}</i>	$\beta 1^{\text{het}}$
	<i>Ht-PA::Cre;beta1^{fl/+};Edn3^{ls/+}</i>	$\beta 1^{\text{het}};\text{Edn3}^{\text{het}}$
	<i>Ht-PA::Cre;beta1^{fl/neo}</i>	$\beta 1^{\text{null}}$
	<i>Ht-PA::Cre;beta1^{fl/+};Edn3^{ls/ls}</i>	$\beta 1^{\text{het}};\text{Edn3}^{\text{null}}$
	<i>Ht-PA::Cre;beta1^{fl/neo};Edn3^{ls/+}</i>	$\beta 1^{\text{null}};\text{Edn3}^{\text{het}}$
	<i>Ht-PA::Cre;beta1^{fl/neo};Edn3^{ls/ls}</i>	$\beta 1^{\text{null}};\text{Edn3}^{\text{null}}$
	<i>Edn3^{ls/ls}</i>	<i>Edn3^{ls/ls}</i>
	<i>beta1^{fl/fl};R26RYFP</i>	<i>beta1^{fl/fl}</i>

Figure 1: Effect of EDN3 on ENCC adhesion. A- Phase contrast (left panels) and YFP images (right panels) of control E12.5 gut explants cultured 24h on FN with or without EDN3. B- Confocal images of cultures immunolabeled for Sox10 and YFP (ENCCs, left panels), and for activated $\beta 1$ -integrin ($\beta 1^*$) and paxillin to visualize FAs. The letter m refers to mesenchymal cells (Sox10⁻/YFP⁻), which exit the explant together with ENCCs. Merged images for $\beta 1^*$ and paxillin are shown in the right panels. C- Average number of $\beta 1^*$ - and paxillin-positive FAs per ENCC. The number of cells analysed for $\beta 1^*$ staining was n = 508 and 449 and for paxillin staining n = 449 and 310, under control

and EDN3 conditions, respectively. Error bars indicate the SEM; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Scale bar in A and B = 50 and 10 μm , respectively.

Figure 2: EDN3 favours a sustained growth of ENCC protrusions. A- Phase contrast images showing spread ENCCs with lamellipodia (black arrows) after 30 min or 1 h of EDN3 treatment, or in control medium. Scale bar = 50 μm . B- Images extracted from a time-lapse movie of gut explant cultures in control medium immediately before, and 13 min after, the change of medium (indicated by an asterisk) for medium with (red line) or without (black line) EDN3. After stimulation with EDN3, a lamellipodium start to grow on the ENCC (black arrows, upper panels), but not after incubation with control medium (lower panels) for the same period. C-D lamellipodium edge of ENCCs ($\text{Sox10}^+/\text{YFP}^+$) stained with WAVE2 antibody (white arrows) after a 1 h (C) or overnight (ON, D) EDN3 treatment. E-F- Confocal images showing ENCCs ($\text{Sox10}^+/\text{YFP}^+$), F-actin (phalloidin) staining, and showing the reorganisation of the actin cytoskeleton at the lamellipodium edge (white arrows) after an overnight (E) or 1 h EDN3 treatment (F). Scale bars in B-E = 10 μm .

Figure 3: Time-course of the response of ENCCs to short exposure to EDN3. A- Confocal images of control gut explants cultured overnight in control medium prior to EDN3 treatment for 30 min, 1 h or 3 h, immunolabeled for Sox10 and YFP (ENCCs), activated $\beta 1$ -integrin ($\beta 1^*$), and paxillin. The letter m refers to mesenchymal cells ($\text{Sox10}^-/\text{YFP}^-$). Merged images for $\beta 1^*$ and paxillin are shown in the right panels. B- Average number of $\beta 1^*$ - and paxillin-positive FAs per ENCC after treatment with or without EDN3 for 30 min, 1 h, and 3 h. The number of cells analysed under control and EDN3 conditions was $n = 277$ and $n = 208$ after 30 min; $n = 382$ and $n = 255$ after 1 h; and $n = 355$ and $n = 327$ after 3 h of treatment, respectively. Error bars indicate the SEM; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Scale bars = 10 μm .

Figure 4: $\beta 1$ -integrin expression and quantification of FAs of $\text{Edn3}^{\text{ts/ts}}$ mutant ENCCs. A- Immunostaining of caecum cryosections from E11.5 $\text{Edn3}^{\text{ts/ts}}$ mutants ($n = 2$) for ENCC marker

(P75^{NTR}) and pan- β 1-integrin. A Merged image for P75^{NTR} (green) and β 1-integrin (red) is shown in the right panel. B- Activated β 1-integrin (β 1*) and paxillin immunostaining of ENCC progenitors (Sox10⁺) from E12.5 *Edn3*^{+/+} and *Edn3*^{ls/ls} midgut explants cultured 24 h on FN. Scale bars = 10 μ m. C- Average number of β 1*- and paxillin-positive FAs per ENCC for control and *Edn3*^{ls/ls} mutants. The number of cells analysed was n = 836 and n = 711 over 5 *Edn3*^{+/+} and 5 *Edn3*^{ls/ls} mutant midguts, respectively. Error bars indicate the SEM; ***p < 0.001.

Figure 5: The genetic interaction between *Edn3* and *Itgb1* controls ENS development. A- Images of whole-mount TUJ1 immunostaining of E14.5 guts as described in Figure 5. B- The ENS network organisation of each class of genotyped embryos. Top panels show confocal compilations of TUJ1 staining taken at the proximal portion of the small intestine. The graph shows the quantification of TUJ1-free areas relative to the mean area summarized as box plots. The top and bottom of each box indicates the 25th and 75th percentiles, respectively. The red line in the middle of the box indicates the median.

Figure 6: Migratory behaviour of ENCCs within the embryonic gut. A- Images extracted from a representative time-lapse movie of E12.5-13.5 guts cultured *ex-vivo* from β 1^{het} (n = 3 guts); β 1^{het}; *Edn3*^{het} (n = 7); β 1^{het}; *Edn3*^{null} (n = 1); β 1^{null}; *Edn3*^{het} (n = 5), and β 1^{null}; *Edn3*^{null} (n = 3) genotypes, with examples of individual ENCC trajectories. Scale bar = 100 μ m. B- Graphs show the mean ENCC speed of migration depending on the gut genotype (upper graphs) and the mean persistence (lower graphs). The number of ENCCs analysed was: β 1^{het}, n = 20; β 1^{het}; *Edn3*^{het}, n = 88; β 1^{het}; *Edn3*^{null}, n = 21; β 1^{null}; *Edn3*^{het}, n = 68 and β 1^{null}; *Edn3*^{null}, n = 37. Error bars indicate the SEM; *p < 0.05; **p < 0.01; *** p < 0.001.

Figure 7: Interplay between the EDN3 and β 1-integrin signalling pathways during ENS ontogenesis. Genetic interaction between *Itgb1* and *Edn3* regulates enteric progenitor survival, gut colonization and ENS network organisation. EDN3-dependent signalling promotes sustained growth

of lamellipodia, and the formation of new ENCCs-ECM β 1-integrin-enriched adhesion sites, two mechanisms required for proper ENS development.

REFERENCES

- 1 Lake, J. I. & Heuckeroth, R. O. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **305**, G1-24, doi:10.1152/ajpgi.00452.2012 (2013).
- 2 Ames, R. S. *et al.* Identification of a selective nonpeptide antagonist of the anaphylatoxin C3a receptor that demonstrates antiinflammatory activity in animal models. *J Immunol* **166**, 6341-6348 (2001).
- 3 Simpson, M. J., Zhang, D. C., Mariani, M., Landman, K. A. & Newgreen, D. F. Cell proliferation drives neural crest cell invasion of the intestine. *Developmental Biology* **302**, 553-568, doi:10.1016/j.ydbio.2006.10.017 (2007).
- 4 Hackett-Jones, E. J., Landman, K. A., Newgreen, D. F. & Zhang, D. On the role of differential adhesion in gangliogenesis in the enteric nervous system. *Journal of theoretical biology* **287**, 148-159, doi:10.1016/j.jtbi.2011.07.013 (2011).
- 5 Breau, M. A., Dahmani, A., Broders-Bondon, F., Thiery, J. P. & Dufour, S. Beta1 integrins are required for the invasion of the caecum and proximal hindgut by enteric neural crest cells. *Development* **136**, 2791-2801 (2009).
- 6 Rauch, U. & Schafer, K. H. The extracellular matrix and its role in cell migration and development of the enteric nervous system. *Eur J Pediatr Surg* **13**, 158-162. (2003).
- 7 Young, H. M. *et al.* GDNF Is a Chemoattractant for Enteric Neural Cells. *Developmental Biology* **229**, 503-516, doi:10.1006/dbio.2000.0100 (2001).
- 8 Barlow, A., de Graaff, E. & Pachnis, V. Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. *Neuron* **40**, 905-916. (2003).
- 9 Nagy, N. & Goldstein, A. M. Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Developmental Biology* **293**, 203-217, doi:10.1016/j.ydbio.2006.01.032 (2006).
- 10 Leibl, M. A. *et al.* Expression of endothelin 3 by mesenchymal cells of embryonic mouse caecum. *Gut* **44**, 246-252 (1999).
- 11 Bondurand, N., Natarajan, D., Barlow, A., Thapar, N. & Pachnis, V. Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development* **133**, 2075-2086, doi:10.1242/dev.02375 (2006).
- 12 Wu, J. J., Chen, J. X., Rothman, T. P. & Gershon, M. D. Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors. *Development* **126**, 1161-1173 (1999).
- 13 Goto, A. *et al.* GDNF and endothelin 3 regulate migration of enteric neural crest-derived cells via protein kinase A and Rac1. *J Neurosci* **33**, 4901-4912, doi:10.1523/JNEUROSCI.4828-12.2013 (2013).
- 14 Lee, H. The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors. *Developmental Biology* **259**, 162-175, doi:10.1016/s0012-1606(03)00160-x (2003).
- 15 Payette, R. F. *et al.* Accumulation of components of basal laminae: association with the failure of neural crest cells to colonize the presumptive aganglionic bowel of ls/ls mutant mice. *Dev Biol* **125**, 341-360 (1988).
- 16 Rothman, T. P. *et al.* Increased expression of laminin-1 and collagen (IV) subunits in the aganglionic bowel of ls/ls, but not c-ret $-/-$ mice. *Dev Biol* **178**, 498-513 (1996).

- 17 Rothman, T. P., Goldowitz, D. & Gershon, M. D. Inhibition of migration of neural crest-derived cells by the abnormal mesenchyme of the presumptive aganglionic bowel of ls/ls mice: analysis with aggregation and interspecies chimeras. *Developmental biology* **159**, 559-573, doi:10.1006/dbio.1993.1264 (1993).
- 18 Hosoda, K. *et al.* Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* **79**, 1267-1276 (1994).
- 19 Baynash, A. *et al.* Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* **79**, 1277-1285 (1994).
- 20 Druckenbrod, N. R., Powers, P. A., Bartley, C. R., Walker, J. W. & Epstein, M. L. Targeting of endothelin receptor-B to the neural crest. *genesis* **46**, 396-400, doi:10.1002/dvg.20415 (2008).
- 21 Kapur, R. P., Yost, C. & Palmiter. A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development* **116**, 167-175 (1992).
- 22 Kruger, G. M. *et al.* Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* **35**, 657-669. (2002).
- 23 Iwashita, T., Kruger, G. M., Pardal, R., Kiel, M. J. & Morrison, S. J. Hirschsprung disease is linked to defects in neural crest stem cell function. *Science* **301**, 972-976 (2003).
- 24 Breau, M. A. *et al.* Lack of beta1 integrins in enteric neural crest cells leads to a Hirschsprung-like phenotype. *Development* **133**, 1725-1734, doi:10.1242/dev.02346 (2006).
- 25 Brizzi, M. F., Tarone, G. & Defilippi, P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Current opinion in cell biology* **24**, 645-651, doi:10.1016/j.ceb.2012.07.001 (2012).
- 26 Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687 (2002).
- 27 Larsen, M., Artym, V. V., Green, J. A. & Yamada, K. M. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Current Opinion in Cell Biology* **18**, 463-471, doi:10.1016/j.ceb.2006.08.009 (2006).
- 28 Broders-Bondon, F., Paul-Gilloteaux, P., Carlier, C., Radice, G. L. & Dufour, S. N-cadherin and beta1-integrins cooperate during the development of the enteric nervous system. *Dev Biol* **364**, 178-191, doi:10.1016/j.ydbio.2012.02.001 (2012).
- 29 Young, H. M. *et al.* Colonizing while migrating: How do individual enteric neural crest cells behave? *BMC Biology* **12**, 23, doi:10.1186/1741-7007-12-23 (2014).
- 30 Druckenbrod, N. R. & Epstein, M. L. Age-dependent changes in the gut environment restrict the invasion of the hindgut by enteric neural progenitors. *Development* **136**, 3195-3203, doi:10.1242/dev.031302 (2009).
- 31 Krause, M. & Gautreau, A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nature reviews. Molecular cell biology* **15**, 577-590, doi:10.1038/nrm3861 (2014).
- 32 Hall, A. Rho GTPases and actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514 (1998).
- 33 Vicente-Manzanares, M., Choi, C. K. & Horwitz, A. R. Integrins in cell migration - the actin connection. *Journal of Cell Science* **122**, 1473-1473, doi:10.1242/jcs.052894 (2009).
- 34 Stephens, L. E. *et al.* Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev* **9**, 1883-1895. (1995).
- 35 Stanchina, L. *et al.* Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. *Developmental Biology* **295**, 232-249, doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.031 (2006).
- 36 Watanabe, Y. *et al.* Sox10 and Itgb1 interaction in enteric neural crest cell migration. *Developmental biology* **379**, 92-106, doi:10.1016/j.ydbio.2013.04.013 (2013).
- 37 Koyama, Y., Yoshioka, Y., Hashimoto, H., Matsuda, T. & Baba, A. Endothelins increase tyrosine phosphorylation of astrocytic focal adhesion kinase and paxillin accompanied by their association with cytoskeletal components. *Neuroscience* **101**, 219-227 (2000).

- 38 Lange, K. *et al.* Endothelin Receptor Type B Counteracts Tenascin-C-Induced Endothelin Receptor Type A-Dependent Focal Adhesion and Actin Stress Fiber Disorganization. *Cancer Research* **67**, 6163-6173, doi:10.1158/0008-5472.can-06-3348 (2007).
- 39 Bagnato, A. *et al.* Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res* **64**, 1436-1443. (2004).
- 40 Horton, E. R., Astudillo, P., Humphries, M. J. & Humphries, J. D. Mechanosensitivity of integrin adhesion complexes: role of the consensus adhesome. *Experimental cell research* **343**, 7-13, doi:10.1016/j.yexcr.2015.10.025 (2016).
- 41 Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635, doi:10.1038/nature01148 (2002).
- 42 Parsons, J. T., Horwitz, A. R. & Schwartz, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 633-643, doi:10.1038/nrm2957 (2010).
- 43 Liu, Y. *et al.* Autocrine endothelin-3/endothelin receptor B signaling maintains cellular and molecular properties of glioblastoma stem cells. *Molecular cancer research : MCR* **9**, 1668-1685, doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0563 (2011).
- 44 Stanchina, L., Van de Putte, T., Goossens, M., Huylebroeck, D. & Bondurand, N. Genetic interaction between Sox10 and Zfhx1b during enteric nervous system development. *Developmental Biology* **341**, 416-428, doi:10.1016/j.ydbio.2010.02.036 (2010).
- 45 Wallace, A. S., Tan, M. X., Schachner, M. & Anderson, R. B. L1cam acts as a modifier gene for members of the endothelin signalling pathway during enteric nervous system development. *Neurogastroenterol Motil* **23**, e510-522, doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01692.x (2011).
- 46 Wallace, A. S., Schmidt, C., Schachner, M., Wegner, M. & Anderson, R. B. L1cam acts as a modifier gene during enteric nervous system development. *Neurobiology of Disease* **40**, 622-633, doi:10.1016/j.nbd.2010.08.006 (2010).
- 47 Burns, A. J. & Le Douarin, N. M. Enteric nervous system development: analysis of selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anat. Rec* **262**, 16-28 (2001).
- 48 Faure, S., McKey, J., Sagnol, S. & de Santa Barbara, P. Enteric neural crest cells regulate vertebrate stomach patterning and differentiation. *Development* **142**, 331-342, doi:10.1242/dev.118422 (2015).
- 49 Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677-689 (2006).
- 50 Fu, J. *et al.* Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Methods* **7**, 733-736 (2010).
- 51 Tenney, R. M. & Discher, D. E. Stem cells, microenvironment mechanics, and growth factor activation. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 630-635 (2009).
- 52 Moore, S. W., Roca-Cusachs, P. & Sheetz, M. P. Stretchy Proteins on Stretchy Substrates: The Important Elements of Integrin-Mediated Rigidity Sensing. *Developmental Cell* **19**, 194-206, doi:10.1016/j.devcel.2010.07.018 (2010).
- 53 Chevalier, N. R. *et al.* How Tissue Mechanical Properties Affect Enteric Neural Crest Cell Migration. *Sci Rep.* **6:20927.**, 10.1038/srep20927. (2016).
- 54 Pietri, T., Eder, O., Blanche, M., Thiery, J. P. & Dufour, S. The human tissue plasminogen activator-Cre mouse: a new tool for targeting specifically neural crest cells and their derivatives in vivo. *Dev Biol* **259**, 176-187 (2003).
- 55 Fässler, R. & Meyer, M. Consequence of lack of $\beta 1$ integrin gene expression in mice. *Genes Dev.* **9**, 1896-1908 (1995).
- 56 Pietri, T. *et al.* Conditional beta1-integrin gene deletion in neural crest cells causes severe developmental alterations of the peripheral nervous system. *Development* **131**, 3871-3883, doi:10.1242/dev.01264 (2004).
- 57 Potocnik, A. J., Brakebusch, C. & Fassler, R. Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity* **12**, 653-663. (2000).
- 58 Srinivas, S. *et al.* Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* **1**, 4. (2001).

- 59 Delannet, M. *et al.* Specific roles of the $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, and $\alpha v\beta 5$ integrins in avian neural crest cell adhesion and migration on vitronectin. *Development* **120**, 2687-2702 (1994).
- 60 Dima, A. A. *et al.* Comparison of segmentation algorithms for fluorescence microscopy images of cells. *Cytometry A* **79**, 545-559, doi:10.1002/cyto.a.21079 (2011).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National Pour la Santé de la Recherche Médicale (INSERM) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-BSV2-0019 ENSINTED). EG was supported by a PhD fellowship from the Université Pierre et Marie Curie and Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. We thank C. Brakebusch and R. Fässler for the $\beta 1^{neo/+}$ and $\beta 1^{fl/fl}$ mice, S. Srinivas for the R26RYFP mice, and A. Gautreau and J.L. Duband for the kind gift of the anti-WAVE2 and ES66 antibodies, respectively. We thank M. Breau, S. Xing, L. Xu, R. Fodil and M. Depp for their help in technical aspects, and J.L. Duband and M. Breau for critical reading of the manuscript. We thank the NIMCE@Institut Curie-CNRS, the imaging staff of PICT-IBiSA@Lhomond and the Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), U955 INSERM and the Mouse Facility staff of Institut Curie and IMRB.

AUTHOR CONTRIBUTIONS: SD and NB designed the study; EG performed *in vitro* and *ex-vivo* studies. YW, EG, and FB-B performed the double mutant enteric phenotype studies. SD, EG, YW, and NB analysed the data. FB-B and PP-J quantified the ENS network defects. JH and VB performed the genotyping analysis. SD, NB, and EG wrote the manuscript text. SD, FB-B, YW and EG prepare the figures. All authors reviewed the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS: The authors declare no competing financial interests.

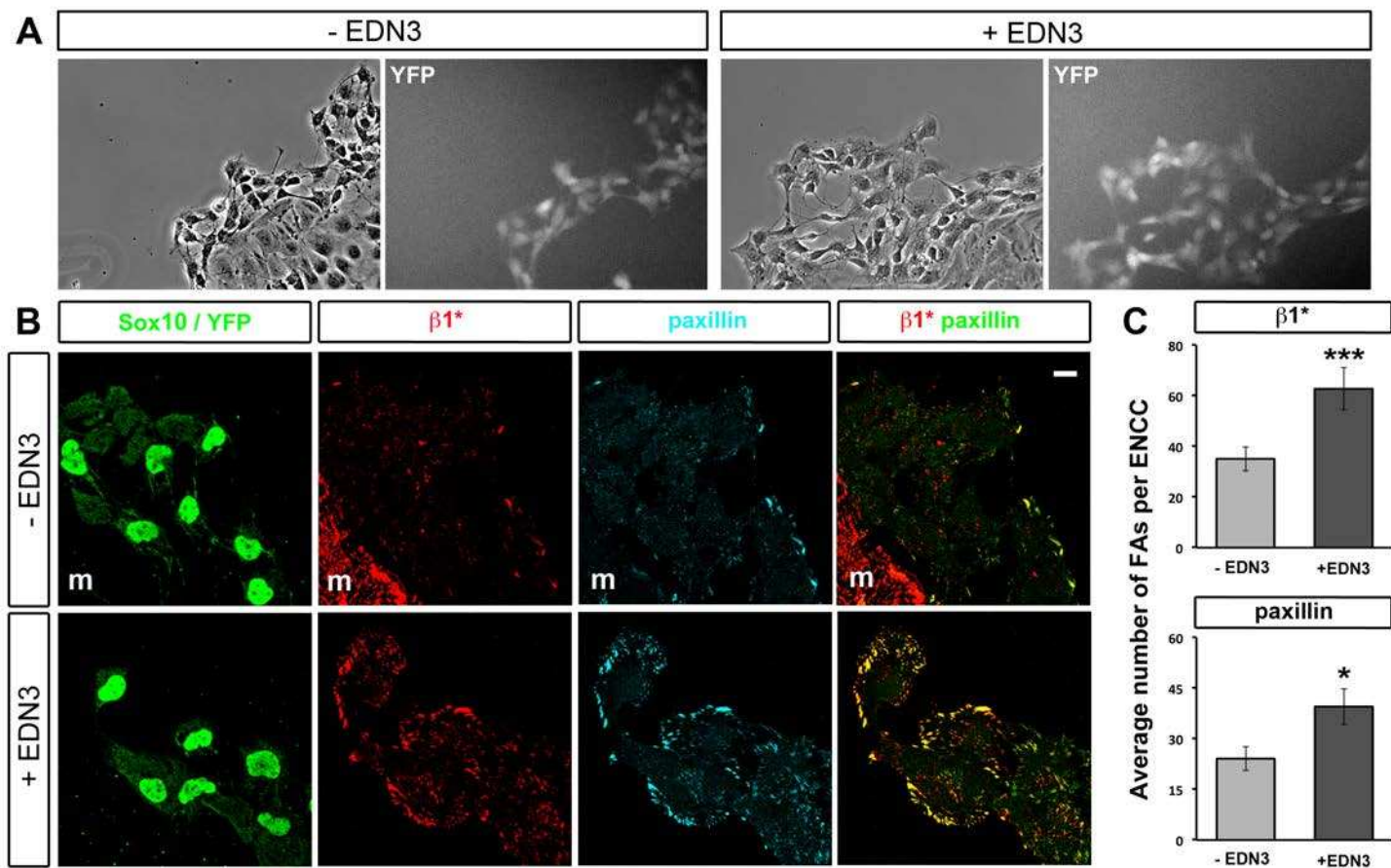


Figure1

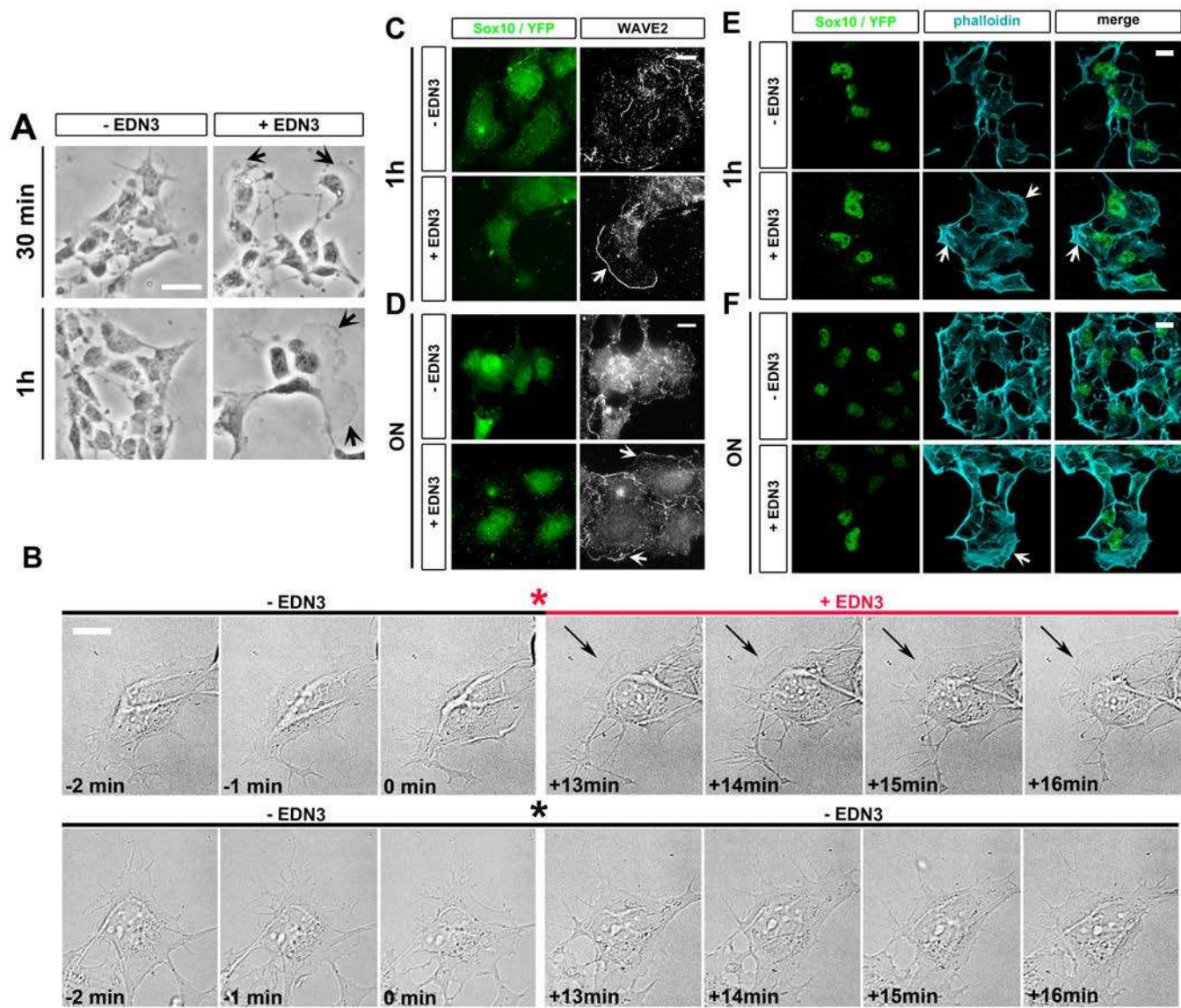


Figure 2

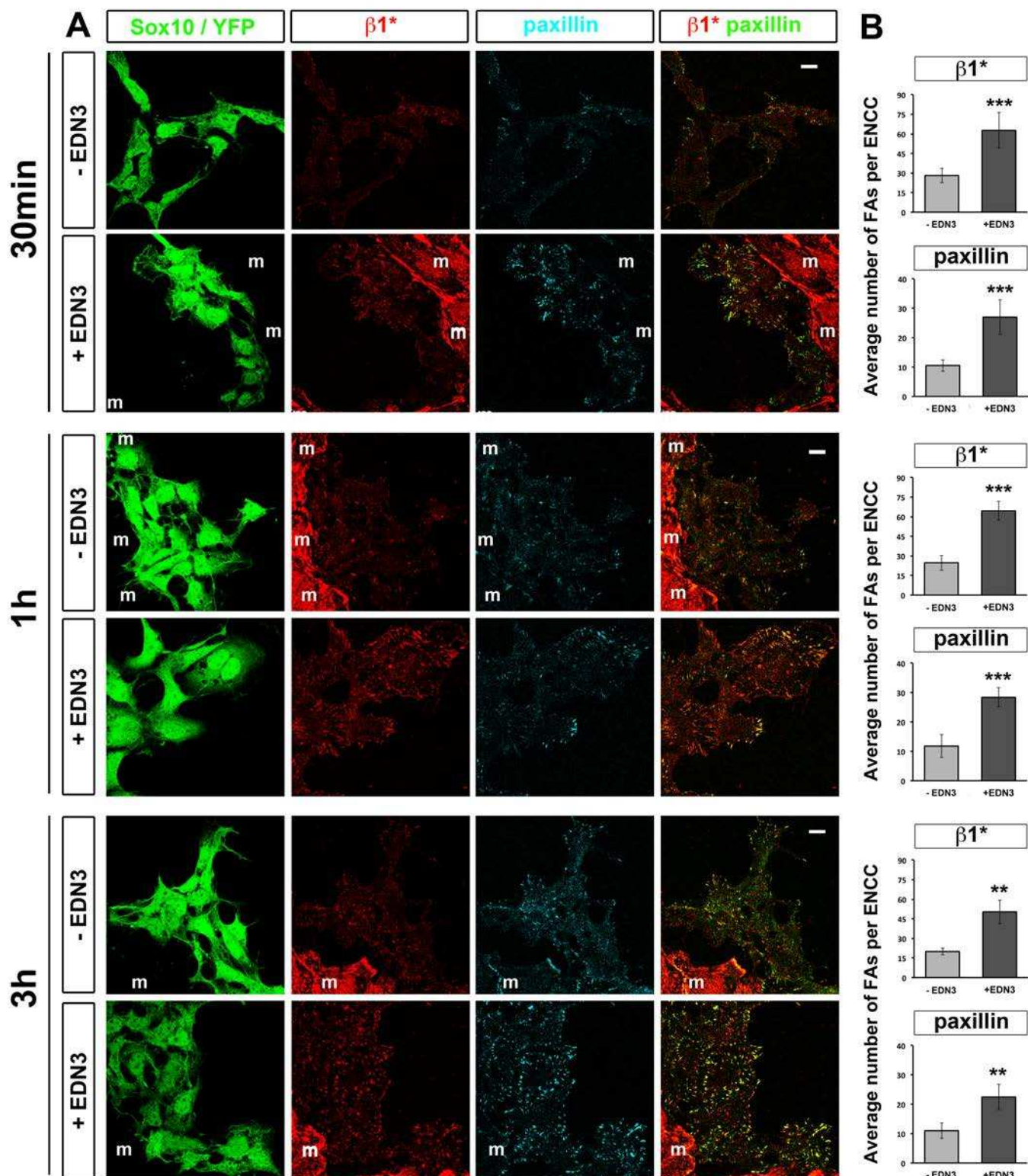


Figure 3

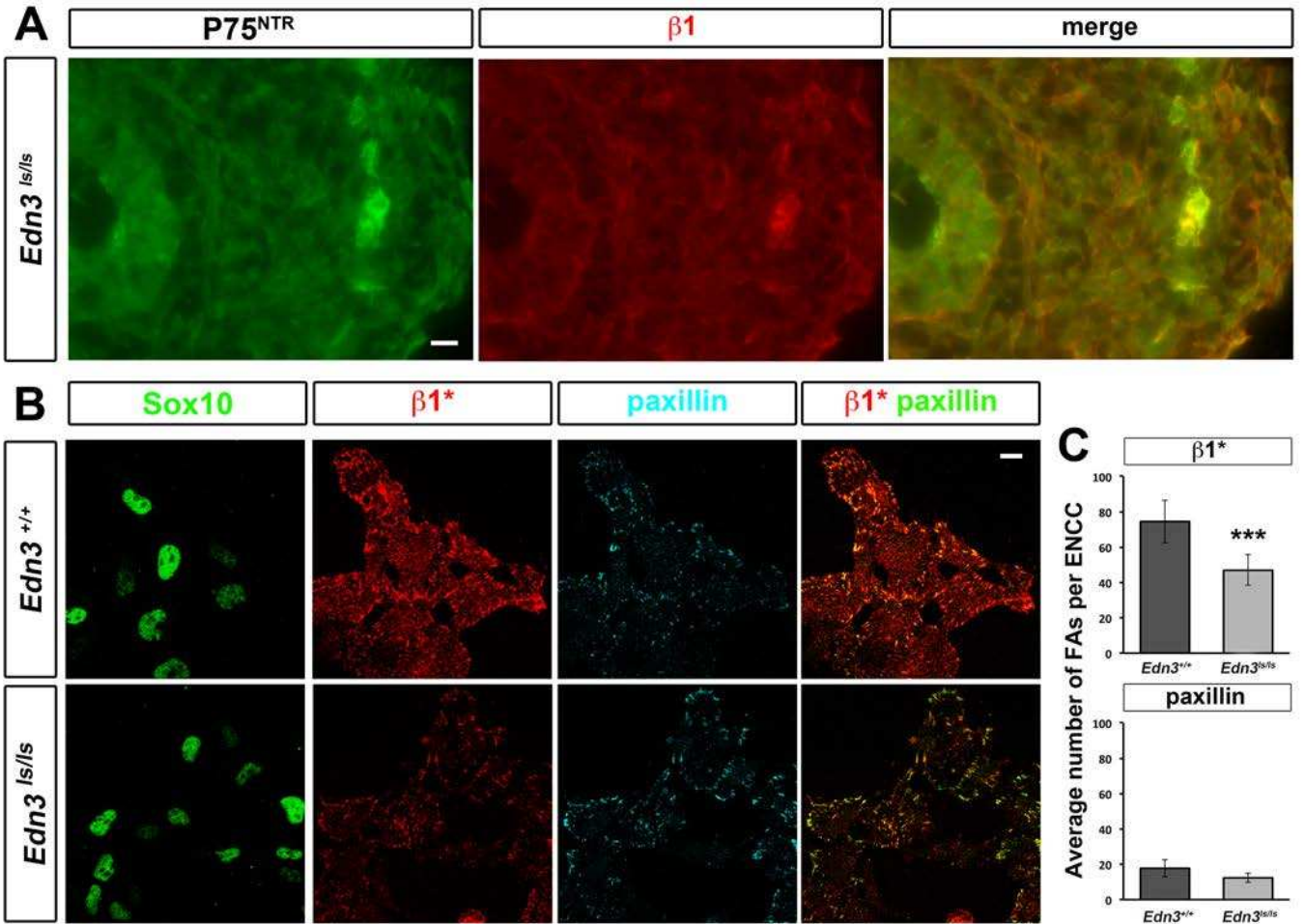


Figure 4

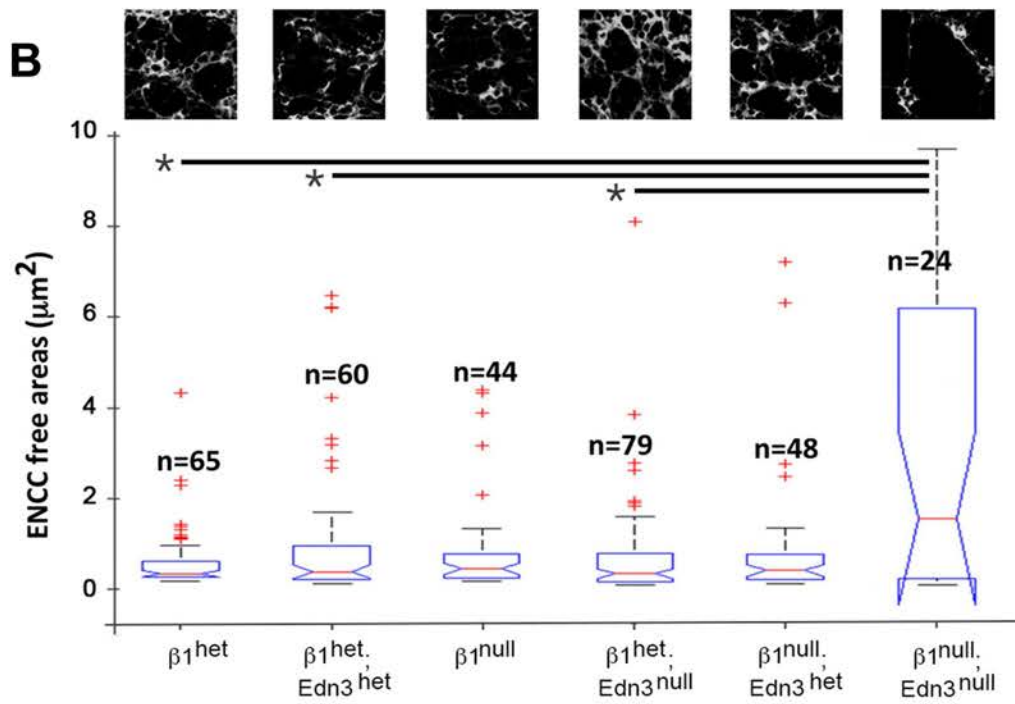
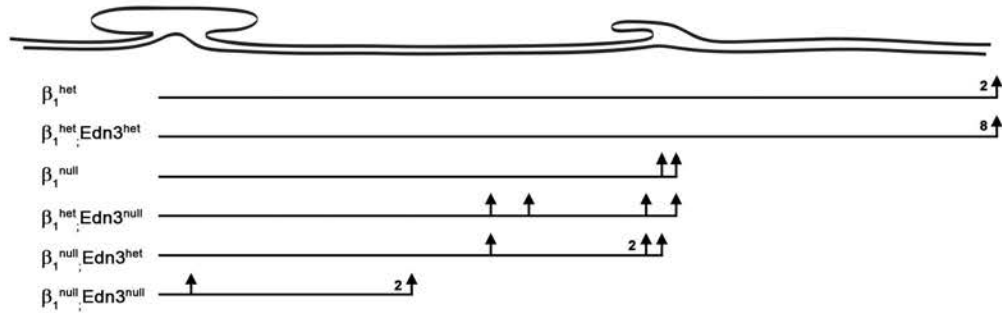
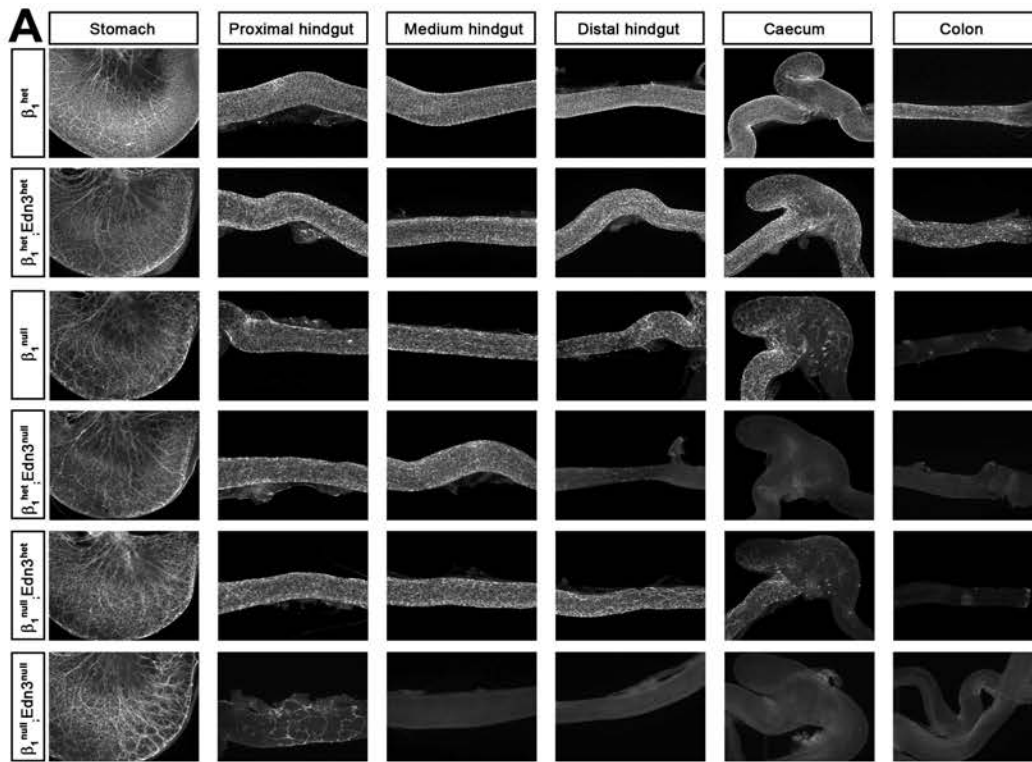


Figure 5

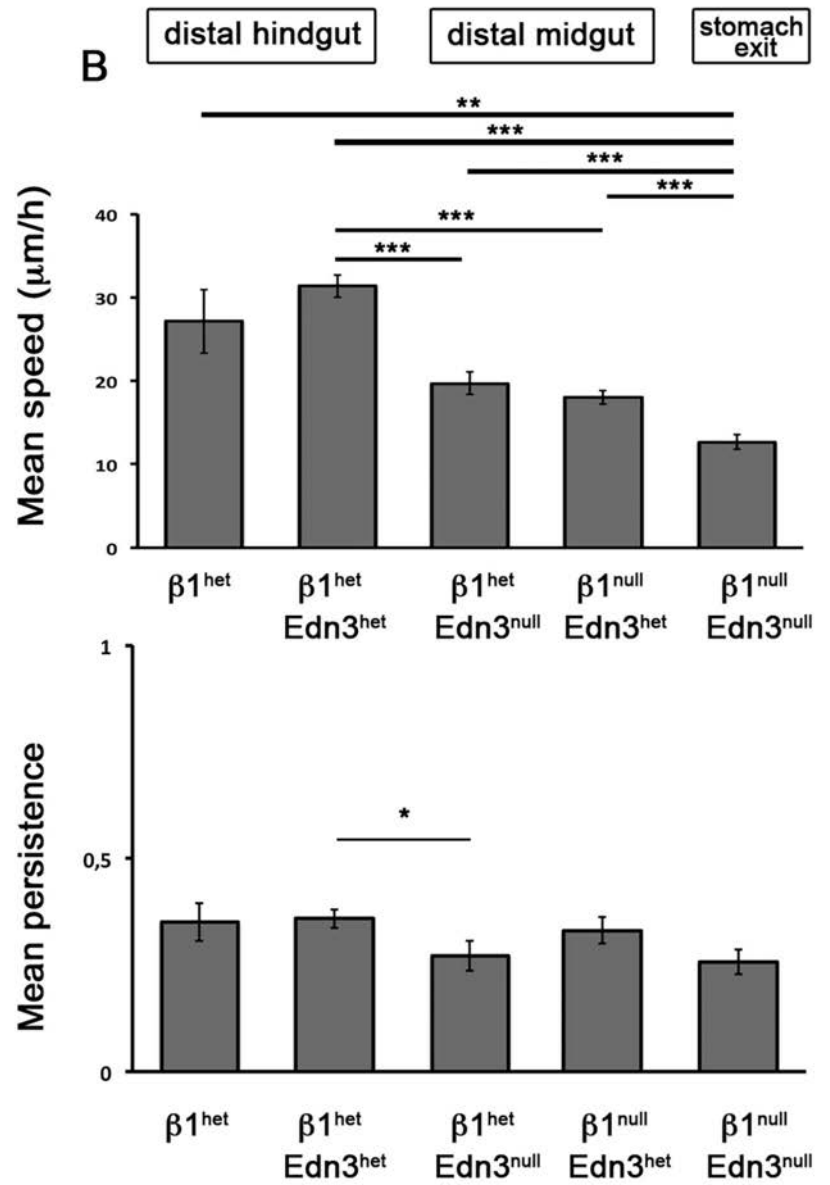
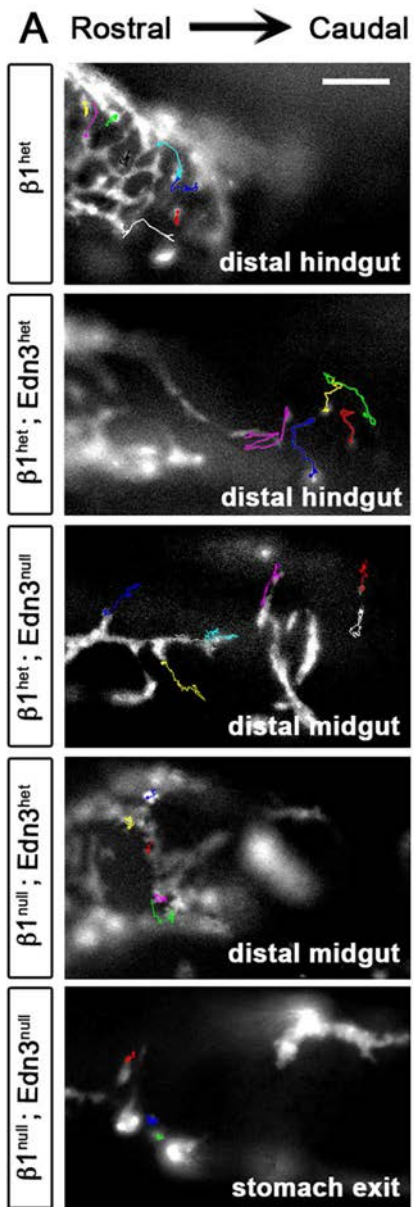


Figure 6

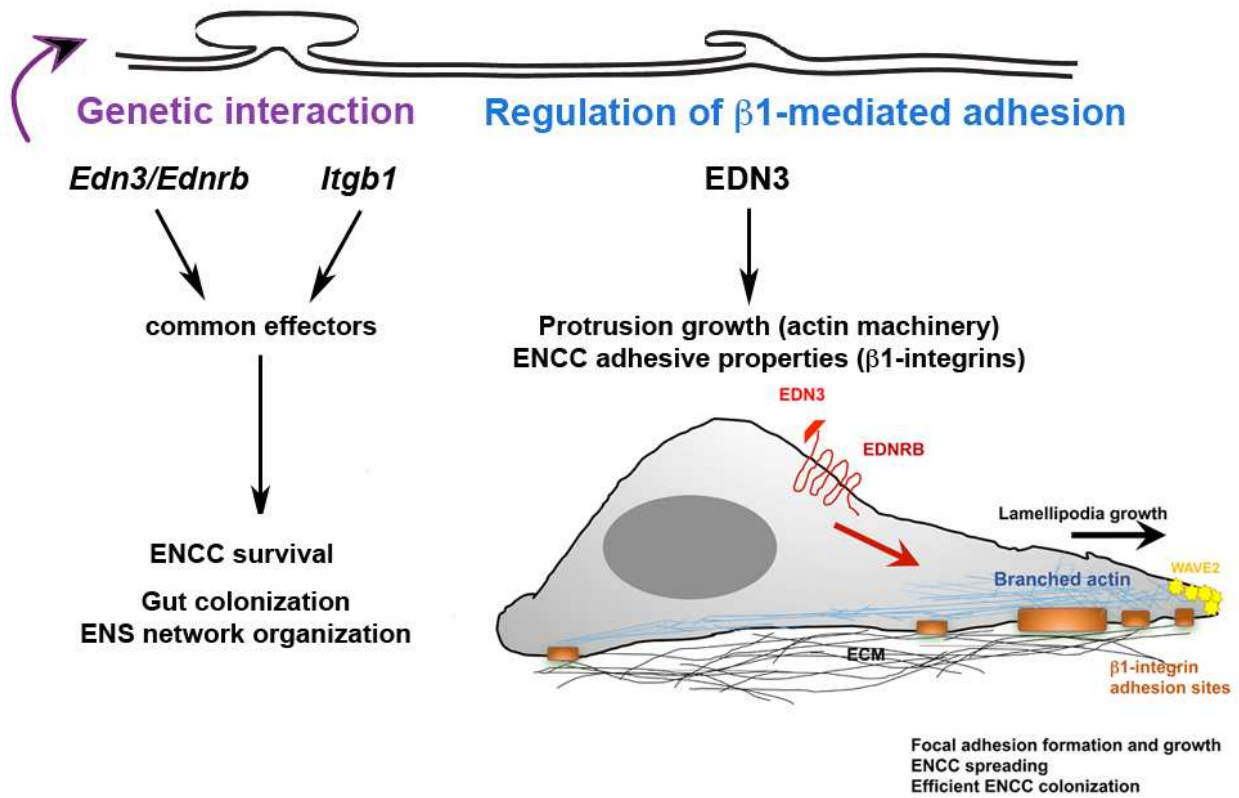


Figure 7

Endothelin-3 stimulates cell adhesion and cooperates with β 1-integrins during enteric nervous system ontogenesis.

Elodie Gazquez^{1,2,3}, Yuli Watanabe^{4,2,3}, Florence Broders-Bondon^{1,a}, Perrine Paul-Gilloteaux^{5,b}, Julie Heysch¹, Viviane Baral^{4,2,3}, Nadège Bondurand^{4,2,3} and Sylvie Dufour^{1,2,3,#}.

¹Institut Curie, CNRS, UMR144, Paris, 75005, France. ²INSERM, U955, Team 6, Créteil, 94000, France. ³Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, 94000, France. ⁴INSERM, U955, Team 11, Créteil, 94000, France. ⁵Cell and Tissue Imaging Facility, PICT-IBiSA, Paris, 75005, France.

SUPPLEMENTARY MATERIALS (tables, figures and movies)

Supplementary Tables:

Table S1: Parameters of ENCC focal adhesions of cells cultured on different ECM proteins in the presence (+) or absence of EDN3 (-). Statistical significance relative to control condition (-EDN3); ns: not significant; p values * < 0.05; ** < 0.01; * < 0.001.**

Treatment Length (-/+ EDN3)								
Fibronectin								
FA β1*+	24h		30min		1h		3h	
	-	+	-	+	-	+	-	+
Area (μm²)	0.239 \pm 0.002	0.330 \pm 0.003***	0.17 \pm 0.003	0.21 \pm 0.004***	0.16 \pm 0.001	0.18 \pm 0.002 ns	0.15 \pm 0.003	0.21 \pm 0.002***
Feret \emptyset (μm)	0.784 \pm 0.003	0.929 \pm 0.004***	0.68 \pm 0.006	0.77 \pm 0.006**	0.65 \pm 0.003	0.73 \pm 0.003***	0.63 \pm 0.004	0.76 \pm 0.003**
FA Pax+	24h		30min		1h		3h	
	-	+	-	+	-	+	-	+
Area (μm²)	0.231 \pm 0.004	0.311 \pm 0.002***	0.19 \pm 0.003	0.29 \pm 0.006***	0.18 \pm 0.003	0.21 \pm 0.003ns	0.16 \pm 0.003	0.27 \pm 0.004***
Feret \emptyset (μm)	0.797 \pm 0.005	0.922 \pm 0.002***	0.76 \pm 0.005	0.89 \pm 0.007**	0.72 \pm 0.005	0.79 \pm 0.006**	0.68 \pm 0.005	0.85 \pm 0.006**
FA β1*+	Fibronectin+ Tenascin-C				Vitronectin			
	24h							
	-		+		-		+	
	Area (μm²)	0.17 \pm 0.01		0.20 \pm 0.01***		0.17 \pm 0.04		0.20 \pm 0.03***
Feret \emptyset (μm)	0.68 \pm 0.02		0.76 \pm 0.02**		0.67 \pm 0.07		0.72 \pm 0.03**	
FA Pax+	Fibronectin+ Tenascin-C				Vitronectin			
	24h							
	-		+		-		+	
	Area (μm²)	0.27 \pm 0.003		0.33 \pm 0.003***		0.17 \pm 0.06		0.24 \pm 0.04***
Feret \emptyset (μm)	0.861 \pm 0.004		0.950 \pm 0.004***		0.70 \pm 0.01		0.82 \pm 0.001**	

Table S2: List of the antibodies and fluorescently-coupled reagents used in the study.

Antibody or reagent	Host	Source	dilution
Sox10 (N20)	Goat	Santa Cruz	1/50e
β 1 integrin (Mab1997)	Rat	Chemicon	1/100e
activated β 1 integrin (9EG7)	Rat	Pharmingen	1/200e
chick β 1 integrin (cIES66)	Rat	kindly provided by Jean-Loup Duband	1/500e
activated chick β 1 integrin (TASK)	Mouse	Chemicon	1/100e
P75NTR	Rabbit	Promega	1/250e
β 3 tubulin (TUJ1)	Mouse	Covance	1/1000e
β 3 integrin (01861D)	Armenian Hamster	Pharmingen	1/100e
Paxillin	Mouse	BD transduction laboratories	1/200eme
Wave2	Rabbit	Alexis Gautreau	1/500e
YFP (A11122)	Rabbit	Molecular Probes	1/100e
EDNRB (8Z11)	Mouse	IBL	1/50e
NC1	Mouse	In-House	1/1000e
Secondary antibody (A488, A555, A647)	Donkey	Molecular Probes	1/1000e
Secondary antibody (A488, Cy3, Cy5)	Donkey	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1/300e
Phalloidin A488		Molecular Probes	1/200e

Supplementary Figures:

Figure S1: Effect of EDN3 on ENCC FAs after 24h of culture on fibronectin+tenascin-C. A - Confocal images of control E12.5 gut explants cultured 24 h with or without EDN3 and immunolabeled for Sox10 and YFP (ENCCs left panels), activated β 1-integrin (β 1*), or paxillin. Merged images of β 1*integrin and paxillin immunostaining are shown in the right panels. m: Mesenchymal cells (Sox10⁻/YFP⁻ cells). Scale bar = 10 μ m. B- Quantification of the average number of FAs per ENCC. The total number of cells analysed for β 1*integrin staining was n = 744 and n = 617 and for paxillin staining n = 861 and n = 722, under control and EDN3 conditions, respectively. Error bars indicate SEM; ***p < 0.001.

Figure S2: Effect of EDN3 treatment on activated β 1 and β 3 integrins FAs of ENCCs cultured *in vitro* onto vitronectin. A and C, Confocal images of control E12.5 gut explants cultured 24 h on VN and immunolabeled for Sox10 and YFP (ENCCs, green, left panels), activated β 1-integrin (β 1*, red, upper panels), β 3 integrin (β 3, red, lower panels), and paxillin (cyan). The letter m refers to mesenchymal cells (Sox10⁻/YFP⁻ cells). Merged images for activated β 1-integrin or β 3-integrin (red) and paxillin (green) are shown in the right panels. Scale bars = 10 μ m. B- Quantification of the

average number of FAs per ENCC. The total number of cells analysed over three independent experiments was $n = 398$ and $n = 640$, under control and EDN3 conditions, respectively. Error bars indicate the SEM; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$).

Figure S3: Effect of EDN3 treatment on chick ENCCs cultured *in vitro*. Confocal images of E6 chick gut explant cultures treated or not with EDN3 for 30 min, 1 h, and 3 h, and immunolabeled for NC1 (white), activated $\beta 1$ -integrin ($\beta 1^*$), and phalloidin (green) to visualize F-actin and Dapi to stain the nuclei. Mesenchymal cells ($NC1^-$ cells) are indicated by (m). Arrows point to the FAs in EDN3-treated cells in the $\beta 1^*$ images. Arrows point to cortical and branched actin (revealed by phalloidin staining) in lamellipodia of untreated and EDN3-treated ENCCs, respectively.

Figure S4: Analysis of ENCC protrusion dynamics. Fluorescent images taken after overnight culture of a mouse and chick gut explant on FN in control medium. They permit the visualization of mouse ENCCs (YFP+) on movies 1 (A) and 3 (B), and of chick ENCCs (NC1-alexa647 labeled cells) on movies 5 (C) and 7 (D) before time-lapse imaging. In case where the movies are a crop of the time-lapse (movies 1 and 3) or if cells have slightly moved between fluorescent and time-lapse acquisition the ENCCs on the movies is indicated by an asterix. Scale bar = 10 μm

Figure S5: EDNRB expression in $\beta 1^{null}$ mutant ENCCs. Immunostaining of E12.5 control and $\beta 1^{null}$ caecum cryosections for P75^{NTR} (upper panels) or EDNRB (middle panels). The merged images for P75^{NTR} (red) and EDNRB (green) staining are presented in the lower panels.

Figure S6: Itgb1 heterozygosity influences on ENS development in the context of *Edn3* mutation. Whole-mount TUJ1 immunostaining performed on E14.5 guts. Panels (left to right) show staining in the distal stomach, proximal, middle, and distal portions of the midgut, caecum, and colon for the indicated genotypes. A schematic representation of the gut with the lines and perpendicular arrows indicating the extent of colonization for each class of genotyped embryos is shown at the bottom. The number of embryos presenting with a defined defect are indicated to the left of each arrow.

Figure S7: PCA analysis of the ENS network of the various progeny genotypes. Scatter-plot diagrams in the PCA space of confocal data sets for E14.5 ENS organisation in the second half of the small intestine from the non-conditional and conditional mutants. A colour code associated with the various genotypes is indicated in the box. The black decision line discriminates between similar or

different neuronal network organisations. The $\beta 1^{\text{neo}}; \text{Edn3}^{\text{null}}$ mutant (black dots) displays a distinct organisation of ENS neuronal network relative to the others.

Figure S8: ENS defect of the various progeny genotypes at E11.5. Whole-mount X-Gal staining of E11.5 embryonic gut of indicated genotypes. Note the severe migration delay in the $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn3}^{\text{null}}$. Number of guts analysed: $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn3}^{\text{het}}$ guts (n = 6), $\beta 1^{\text{null}}$ (n = 5), $\beta 1^{\text{het}}; \text{Edn3}^{\text{null}}$ (n = 3), $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn3}^{\text{het}}$ (n = 2) and $\beta 1^{\text{null}}; \text{Edn3}^{\text{null}}$ (n = 2).

Supplementary Movies

Movie 1: Time-lapse imaging was performed for 10 minutes after overnight culture of a mouse gut explant cultured on FN in control medium. Phase contrast images were taken using the 60x objective (Plan ApoVC, oil, DIC, NA1.4) every 20sec. The ENCC can be recognised by its YFP expression (see Fig. S4A). The upper left panels of figure 2B were extracted from the video.

Movie 2: Time-lapse imaging was performed on the same field of the gut explant culture shown on movie 1. It was performed for 30 minutes immediately after changing the medium to one containing EDN3. The image acquisition parameters are the same as those described for movie 1. The upper right panels of figure 2B were extracted from the video.

Movie 3: Time-lapse imaging was performed for 10 min after overnight culture of another mouse gut explant on FN in control medium. The image acquisition and video parameters are the same as those described for movie 1. ENCC can be recognised by its YFP expression (see Fig. S4B). The lower left panels of figure 2B were extracted from the video.

Movie 4: Time-lapse imaging was performed on the same field of gut the explant culture shown on movie 3 for 30 min immediately after changing the medium to one containing the solvent. The image acquisition and video parameters are the same as those described for movie 1. The lower right panels of figure 2B were extracted from the video.

Movie 5: Time-lapse imaging was performed for 10 minutes after overnight culture of a chick gut explant cultured on FN in control medium. The image acquisition and video parameters are the same as those described for movie 1. ENCCs can be recognised by their labelling with NC1 antibody directly coupled to Alexa647 (see Fig. S4C and supplementary Materials and Methods).

Movie 6: Time-lapse imaging was performed on the same field of the gut explant culture shown in movie 5 for 27 min immediately after changing the medium to one containing EDN3. The image acquisition and video parameters are the same as those described for movie 1.

Movie 7: Time-lapse imaging was performed for 10 minutes after overnight culture of another chick gut explant cultured on FN in control medium. The image acquisition and video parameters are the same as those described for movie 1. ENCCs can be recognised by their labelling with NC1 antibody directly coupled to Alexa647 (see Fig. S4D).

Movie 8: Time-lapse imaging was performed on the same field of the gut explant culture shown in movie 7 for 27 min immediately after changing the medium to one containing the solvent. The image acquisition and video parameters are the same as those described for movie 1.

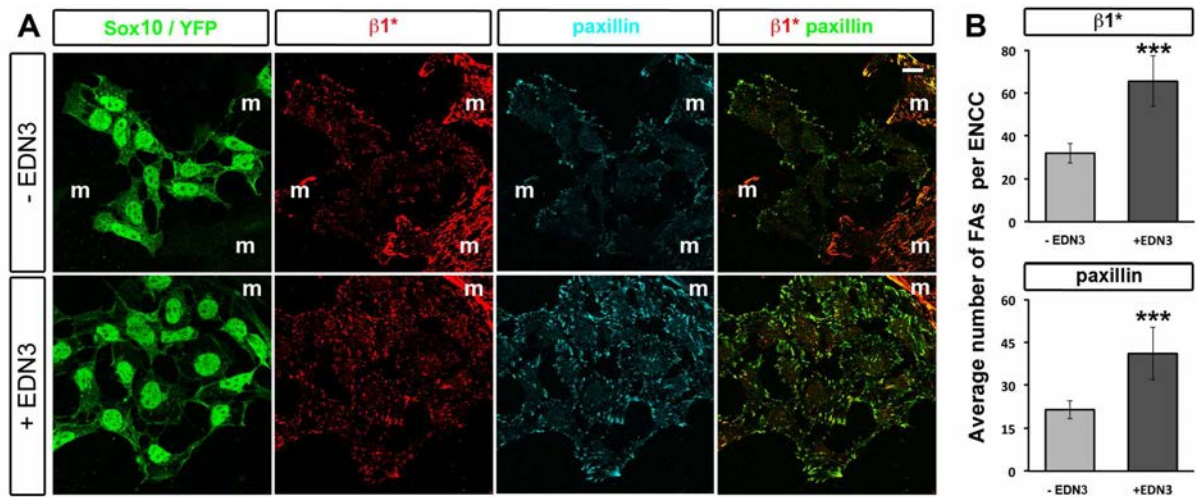


Figure S1

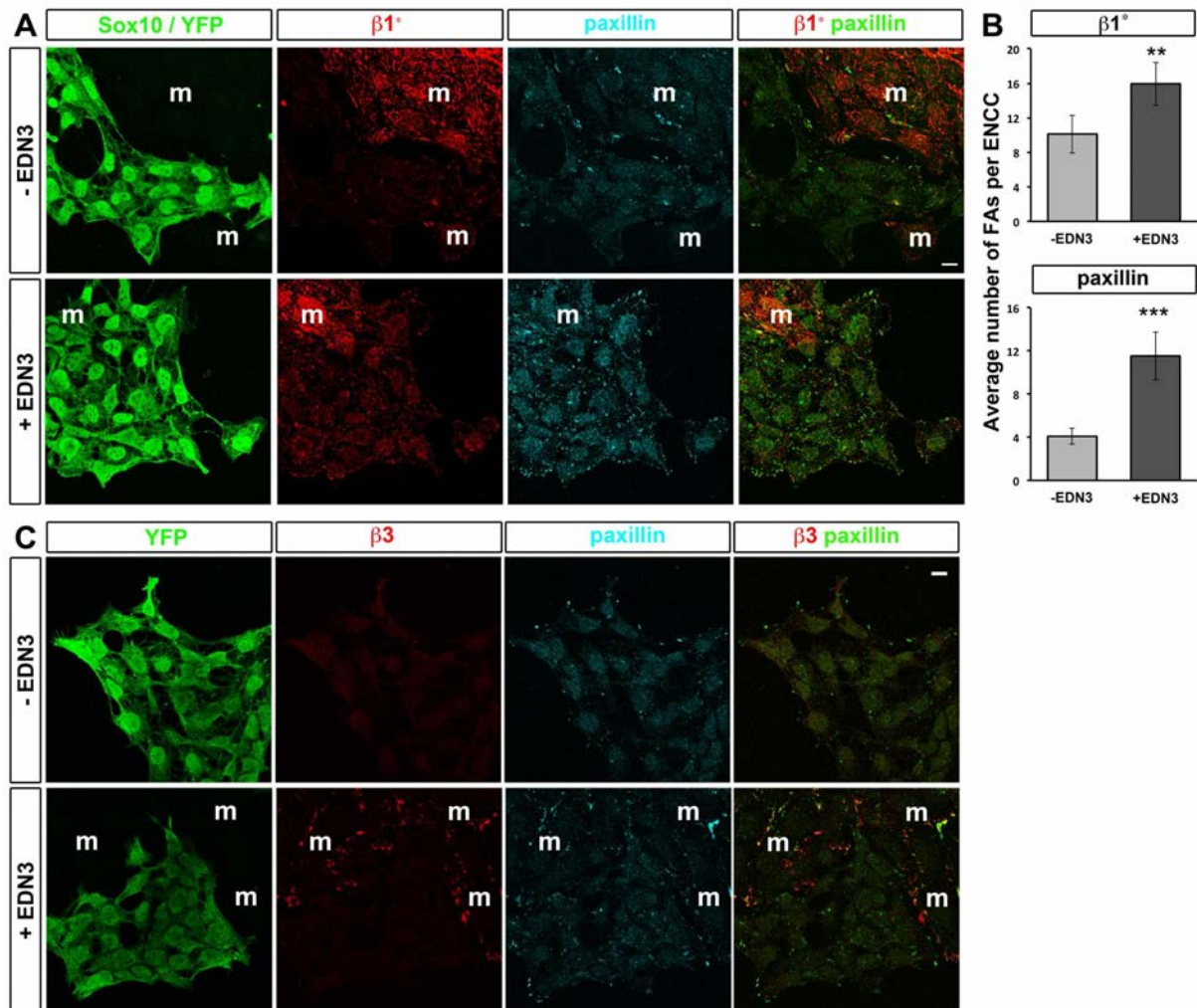


Figure S2

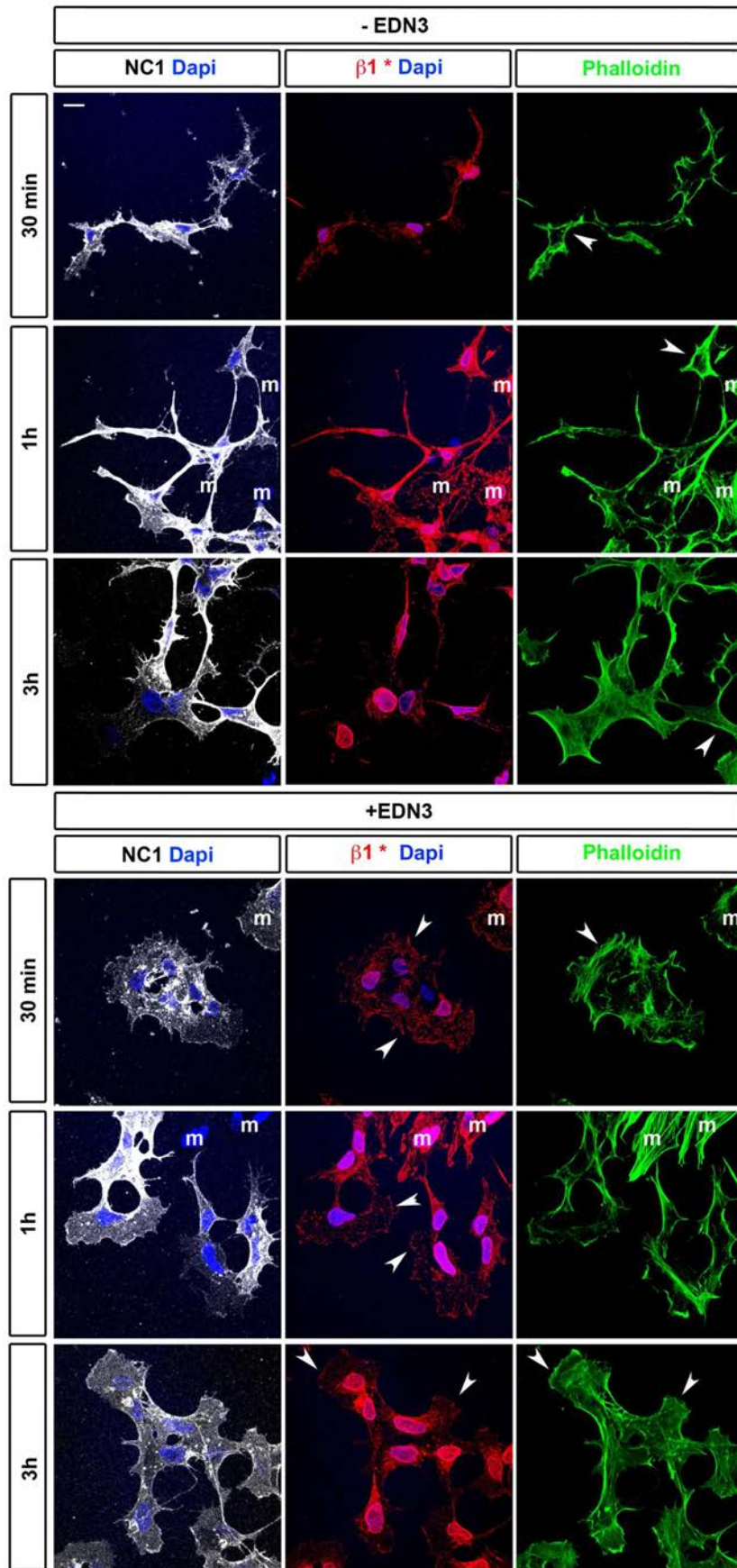


Figure S3

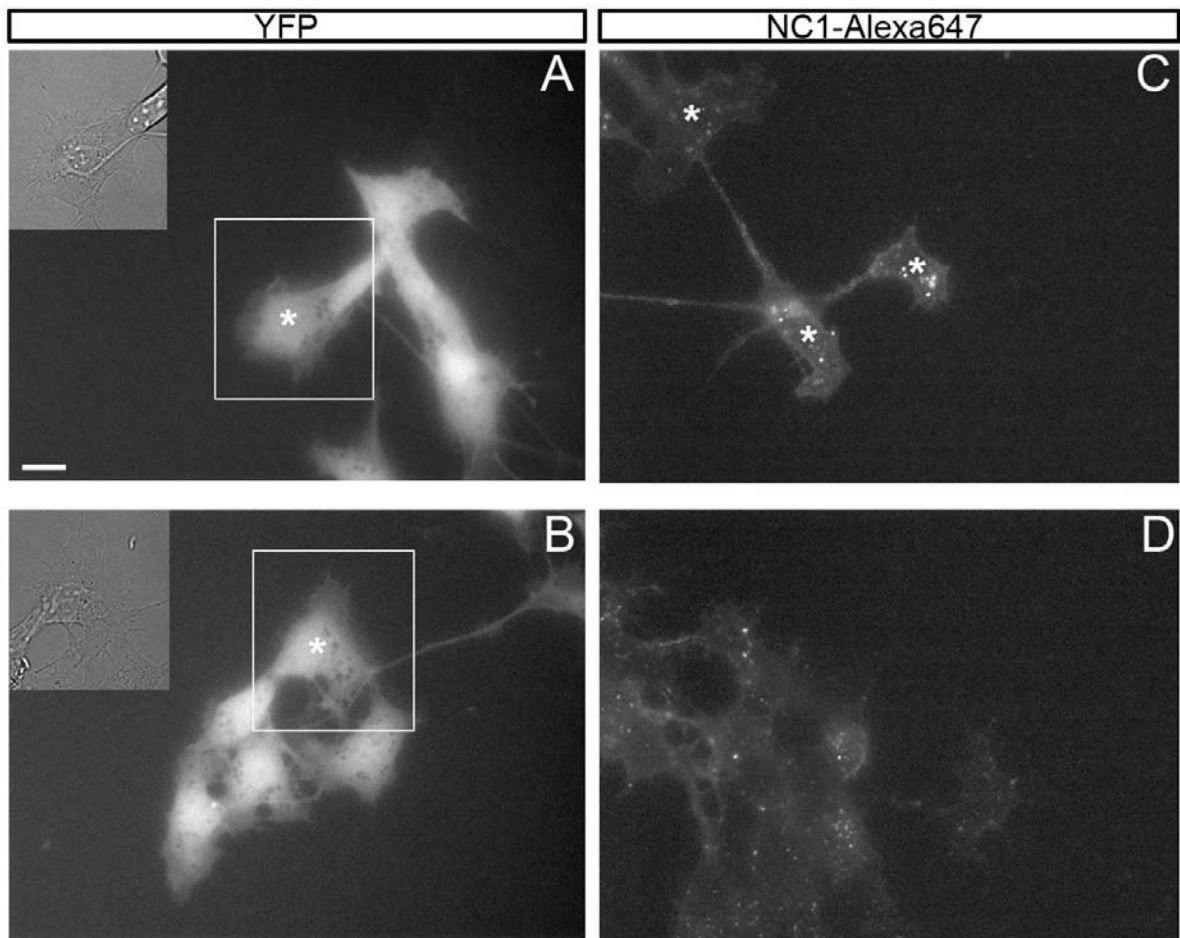


Figure S4

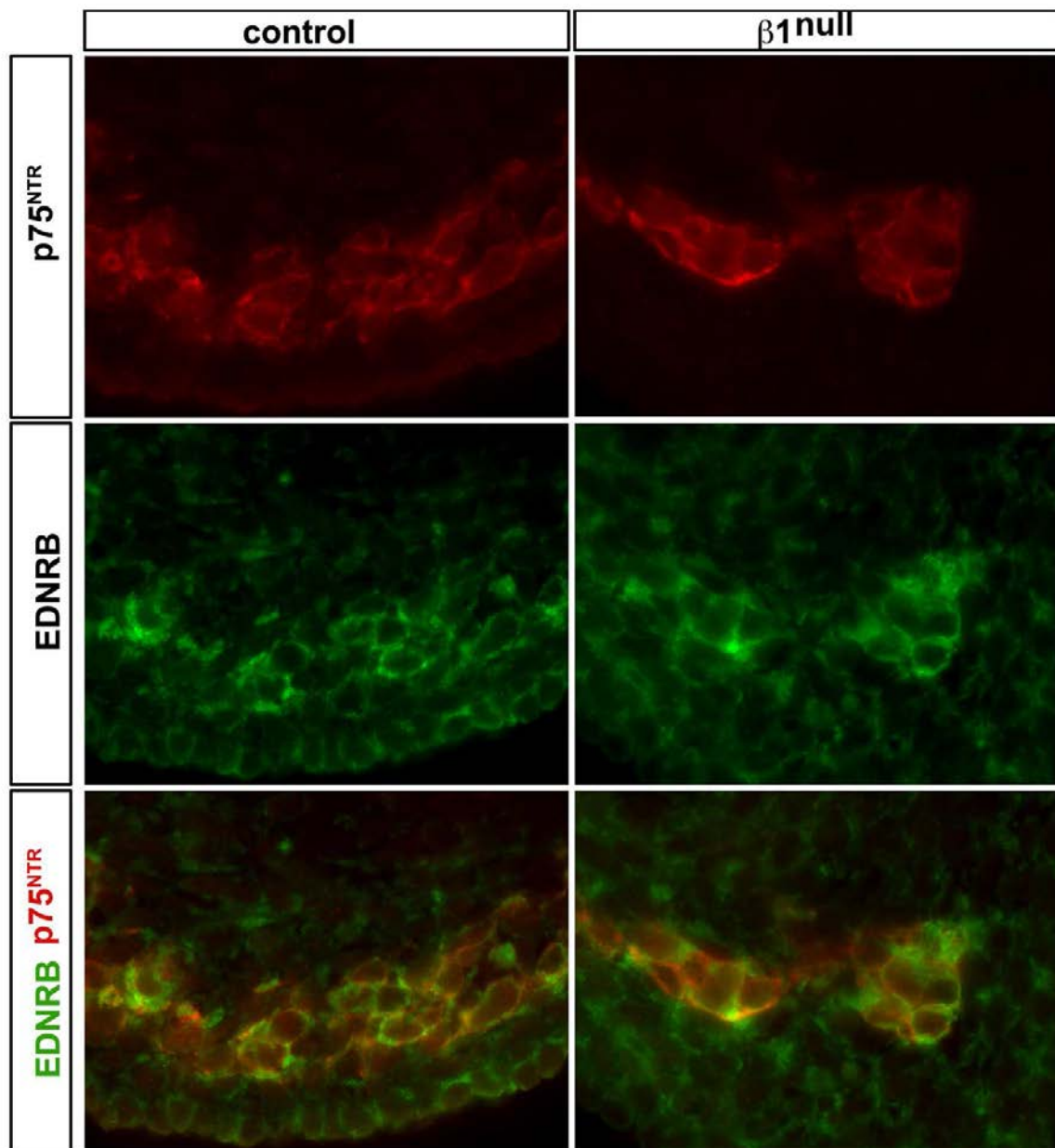


Figure S5

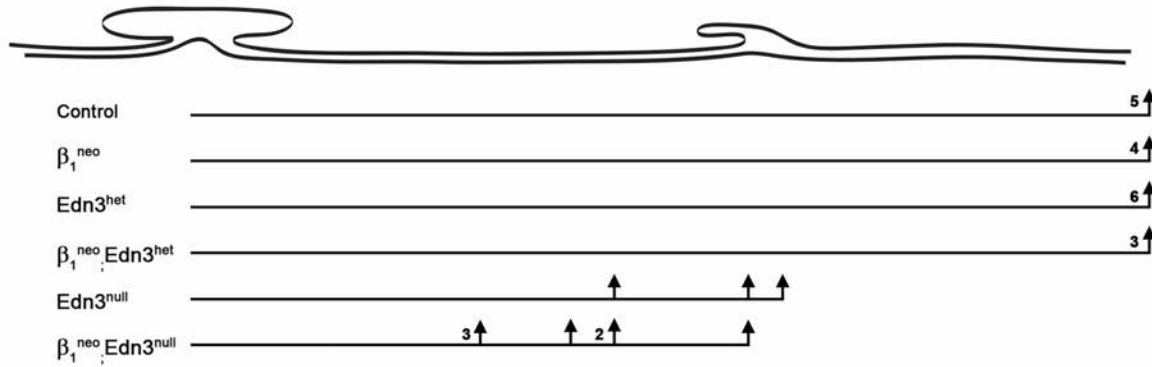
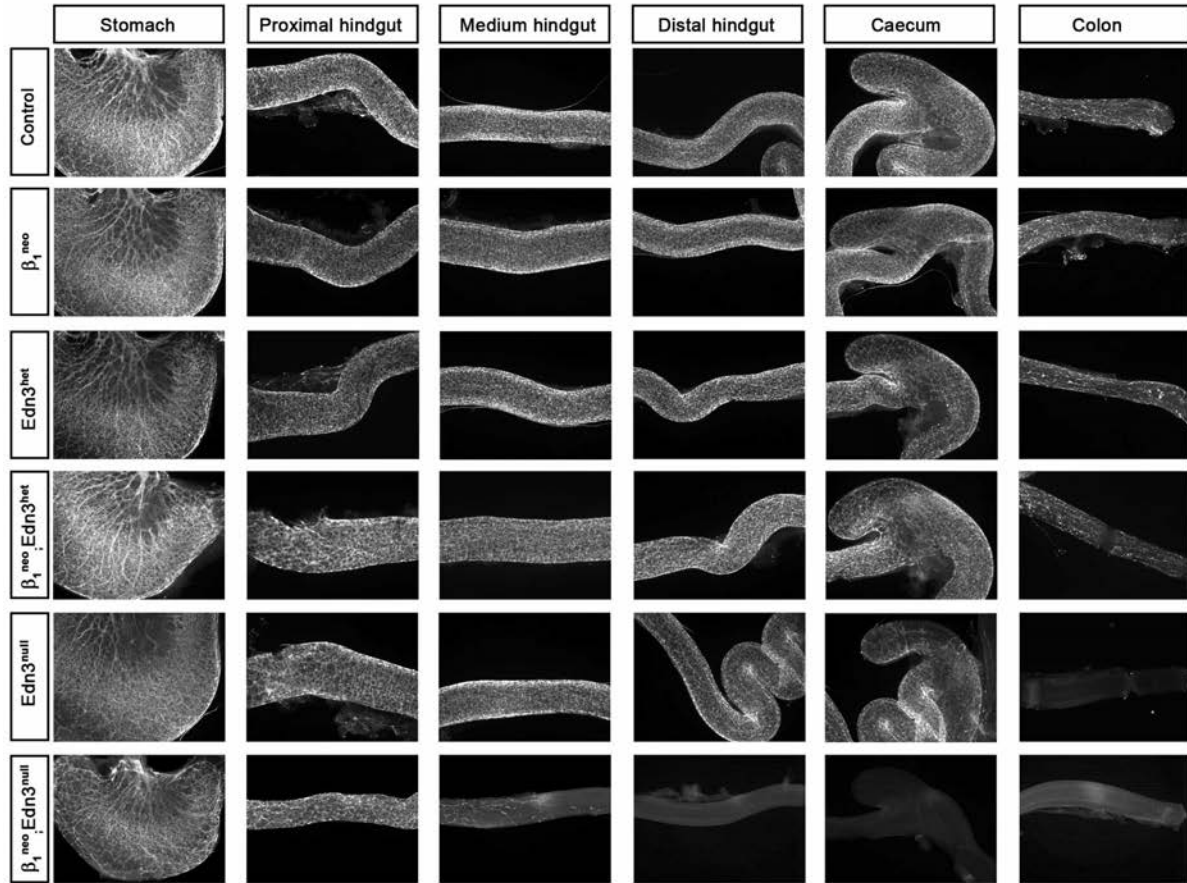


Figure S6

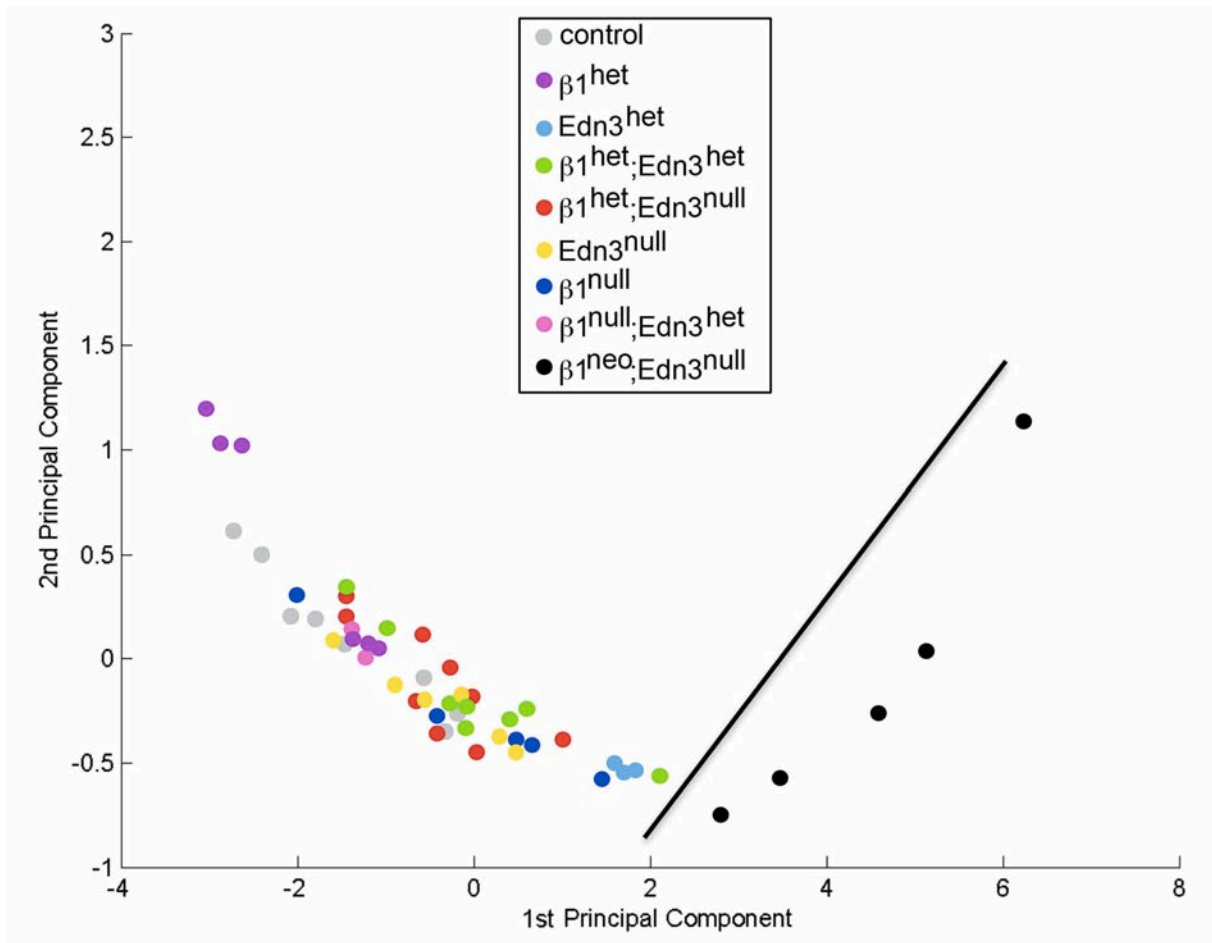


Figure S7

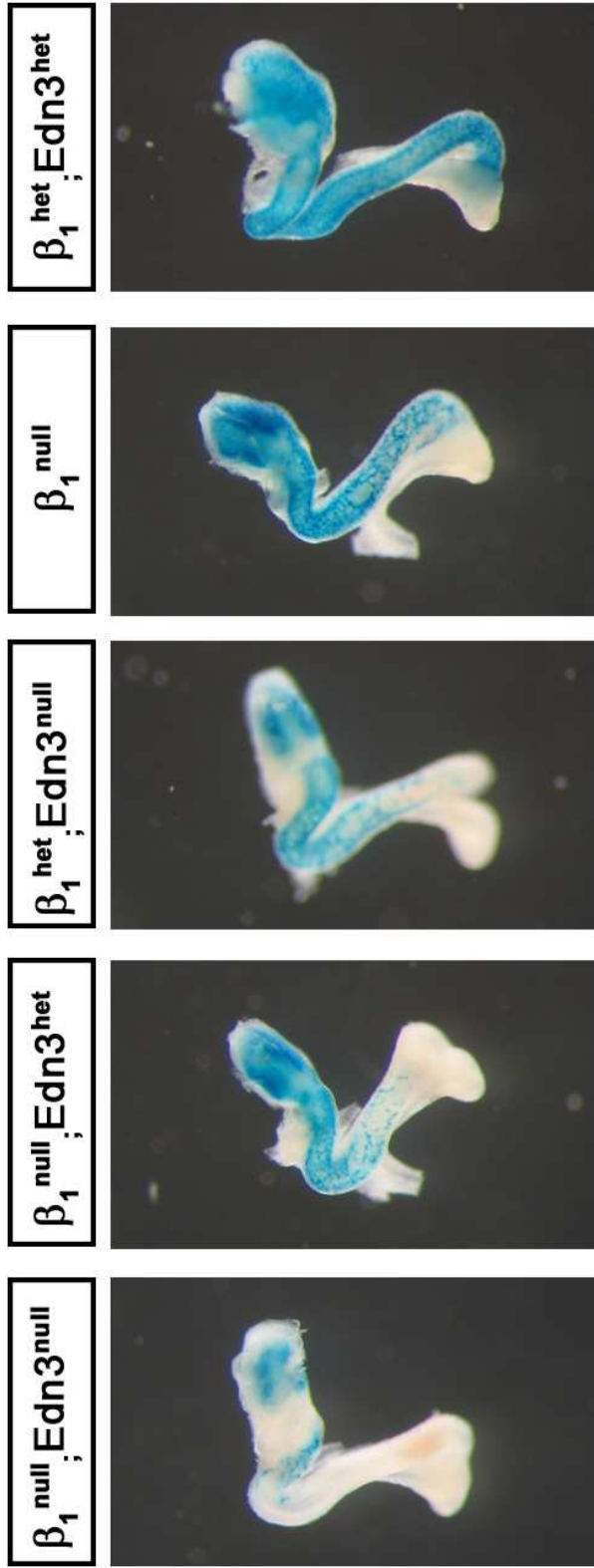


Figure S8

II - Les propriétés élastiques de l'intestin embryonnaire et son influence sur la colonisation des CCNEs (Articles 2 et 3)

Cette deuxième partie de mon travail de thèse a été réalisée en collaboration avec les physiciens Vincent Fleury et Nicolas Chevalier (Université Paris-Diderot), faisant parti des partenaires du projet ANR ENSINTED. Deux articles ont fait l'objet d'une publication suite à cette collaboration. L'article 2, présente pour la première fois l'étude des propriétés physiques de l'intestin embryonnaire au cours du développement ainsi que les premiers résultats de l'effet de l'élasticité de l'environnement sur le comportement migratoire des CCNEs. Les protocoles détaillés des méthodes d'analyses physiques mise en place pour l'article 2 ont également fait l'objet d'une publication présentée dans l'article 3.

- *Quelle est la rigidité environnementale à laquelle sont confrontées les CCNEs au cours de leur colonisation embryonnaire ?*

Pour répondre à cette question, Nicolas Chevalier a mis en place un essai de traction uniaxiale adapté à nos échantillons biologiques, à savoir des intestins embryonnaires de poulet et de souris. En particulier, des intestins contrôles et mutants *Edn3^{Isls}* ont été analysés, afin de déterminer si des anomalies des propriétés élastiques du tissu intestinal embryonnaire pouvait entrer en compte dans l'explication du phénotype HSCR caractéristique des ces mutants. Ces essais sont réalisés dans un bain de PBS, à l'aide d'une pipette de verre calibrée, attachée d'une part à l'intestin par l'estomac et de l'autre à un moteur pas à pas, permettant de déplacer la pipette à une vitesse constante. L'angle α de déflexion de la pipette nous permet de calculer **la force** appliquée à l'échantillon. L'utilisation de particules de carbone saupoudrées sur l'échantillon nous permet de mesurer par PIV (*Particule Image Velocymetry*) la **déformation** résultante de la force qui est appliquée. Enfin, l'**aire** de la tranche de l'intestin est mesurée sous la loupe binoculaire. **Ainsi, en disposant de la force, de l'aire et de la déformation de l'intestin, nous pouvons calculer son module d'Young et analyser l'évolution de ce module au cours du développement embryonnaire.** Cependant, les essais de traction uniaxiale nous permettent seulement de déterminer l'élasticité moyenne de la masse de l'intestin. C'est pourquoi en parallèle, une deuxième méthode d'analyse de l'élasticité réalisée sur des tranches d'intestins a été utilisée : l'AFM (*Atomic Force Microscopy*). Cette technique permet une

analyse plus fine et locale (à l'échelle du micron) de l'élasticité pouvant être ressentie par les cellules au sein même du tissu intestinal. De plus, l'organisation du Collagène au sein de l'intestin embryonnaire au cours du développement a également été analysée par la méthode non invasive de Génération de Seconde Harmonique (SHG). Enfin, la contribution potentielle du collagène aux propriétés mécaniques du tissu a également été analysée.


- *Les propriétés élastiques et physiques de l'environnement influencent elles les comportements migratoires des CCNEs ?*

Afin d'étudier l'impact de la rigidité de l'environnement sur les capacités migratoires des CCNEs, j'ai dans un premier temps cultivé des explants d'intestins embryonnaires sur des supports de PDMS (Ibidi ESS 28, 15 et 1,5 kPa) ainsi que des supports de PAA-gels d'élasticités plus faibles, nous permettant de déterminer le seuil de rigidité critique pour la migration des CCNEs. De plus, en collaboration avec Nicolas Chevalier et Laurent Bidault (Collège de France) qui ont mis en place des gels de collagène dont la rigidité et la porosité peuvent être contrôlées, nous avons analysé l'impact de l'élasticité sur la colonisation des CCNEs dans un environnement tridimensionnel plus proche de leur environnement physiologique.

Ensemble, nos résultats montrent que les intestins embryonnaires de poulet et de souris se rigidifient au cours du développement et que cette rigidification s'accompagne d'une augmentation du Collagène et de son organisation en fibres. En revanche nous n'avons pas détecté de différence significative de l'élasticité des intestins embryonnaires murins provenant des mutants *Edn3^{Isl5}*. En 2D, les CCNEs sont capables d'adhérer et de migrer sur des supports d'une large de gamme d'élasticité, allant de quelques centaines de Pa, proche de celle mesurée pour les intestins embryonnaires, à plusieurs MPa (plastique de culture). En 3D en revanche, plus la rigidité de l'environnement augmente et plus la distance de colonisation diminue. **Ces derniers résultats montrent que l'élasticité de l'environnement 3D est un paramètre pouvant limiter la progression des CCNEs.**

Article 2

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

How Tissue Mechanical Properties Affect Enteric Neural Crest Cell Migration

N.R. Chevalier¹, E. Gazquez^{2,†}, L. Bidault^{3,4,5}, T. Guilbert^{6,7,8}, C. Vias¹, E. Vian¹, Y. Watanabe^{9,†}, L. Muller^{3,4,5}, S. Germain^{3,4,5}, N. Bondurand^{9,†}, S. Dufour^{2,†} & V. Fleury¹

Received: 27 August 2015
Accepted: 13 January 2016
Published: 18 February 2016

Neural crest cells (NCCs) are a population of multipotent cells that migrate extensively during vertebrate development. Alterations to neural crest ontogenesis cause several diseases, including cancers and congenital defects, such as Hirschprung disease, which results from incomplete colonization of the colon by enteric NCCs (ENCCs). We investigated the influence of the stiffness and structure of the environment on ENCC migration *in vitro* and during colonization of the gastrointestinal tract in chicken and mouse embryos. We showed using tensile stretching and atomic force microscopy (AFM) that the mesenchyme of the gut was initially soft but gradually stiffened during the period of ENCC colonization. Second-harmonic generation (SHG) microscopy revealed that this stiffening was associated with a gradual organization and enrichment of collagen fibers in the developing gut. *Ex-vivo* 2D cell migration assays showed that ENCCs migrated on substrates with very low levels of stiffness. In 3D collagen gels, the speed of the ENCC migratory front decreased with increasing gel stiffness, whereas no correlation was found between porosity and ENCC migration behavior. Metalloprotease inhibition experiments showed that ENCCs actively degraded collagen in order to progress. These results shed light on the role of the mechanical properties of tissues in ENCC migration during development.

Neural crest cells (NCCs) are essential to vertebrate development. This highly migratory and multipotent population of cells gives rise to craniofacial structures, cardiac and neuroendocrine derivatives, melanocytes, glial cells and neurons of the peripheral nervous system, as well as the intrinsic innervation of the digestive tract, the enteric nervous system (ENS). Different methods have been used to visualize NCCs and their derivatives, ranging from Le Douarin's historical chick-quail neural tube graft method¹ to the more recent targeting of NCCs with reporter fluorescent proteins, making the dynamic follow-up of their migration within the embryo possible^{2,3}. Depending on their rostro-caudal level along the neural tube, the cranial, vagal, trunk and sacral NCCs follow different paths. Enteric NCCs (ENCCs) mostly consist of vagal NCCs that enter the foregut and migrate through the gut mesenchyme toward the distal hindgut. Sacral NCCs entering the distal hindgut and colonizing the gut tissue caudo-rostrally make a small contribution to the ENS^{4,5}. ENCC colonization occurs at a stage during which the gut tissue increases in length and differentiates⁶. ENCCs always migrate in a 3D environment composed of other cell types and the extracellular matrix (ECM). Other NCC populations have been found to crawl on planar surfaces, such as the collagen-rich basal lamina. Such behavior is observed, for example, during the dorso-ventral migration of trunk NCCs along the neural tube⁵.

Several signaling pathways involved in correct ENS development have been elucidated in recent decades. GDNF (glial-derived neurotrophic factor) is a protein secreted by the mesenchymal cells of the gut⁷ that binds to the RET membrane receptor and co-receptor GFRalpha on ENCCs and acts as a chemoattractant⁸ and a differentiation signal. The endothelin-3 (edn3)/EDNRB ligand-receptor pair plays an essential role in maintaining the

¹Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, Université Paris-Diderot/CNRS UMR 7057, 10 rue Alice Domon et Léonie Duquet, 75013 Paris, France. ²UMR144, CNRS-Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France. ³Collège de France, Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Paris, F-75005, France. ⁴INSERM, U1050, Paris, F-75005, France. ⁵CNRS, UMR 7241, Paris, F-75005, France. ⁶INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France. ⁷CNRS, UMR8104, Paris, France. ⁸Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ⁹INSERM U955, Equipe 11, F-94000 Créteil, France. [†]Present address: INSERM U955, Equipe 6, F-94000 Créteil, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.R.C. (email: Nicolas.chevalier@univ-paris-diderot.fr)

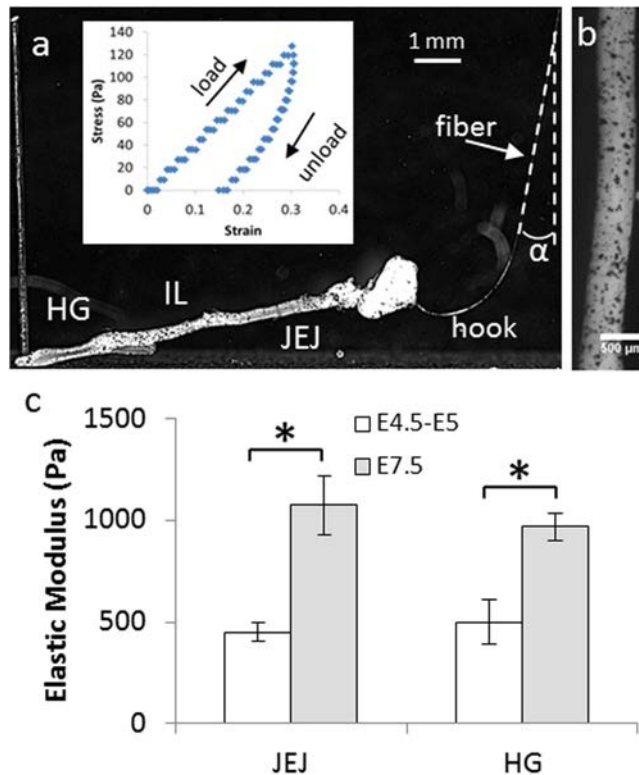


Figure 1. Bulk tensile stiffness of embryonic chick gut. (a) Side view of a tensed E5.5 gut. The end of the fiber (total length \sim 10 cm) is seen on the right (white arrow), α : fiber deflection angle, HG: hindgut, IL: ileum, JEJ: jejunum. Inset: Typical stress-strain load and unload curve for E5.5 chick gut ileum. The slope of the loading curve yields the modulus. Creep is observed, as the gut does not return to its initial length immediately after unloading. (b) High-magnification view of a gut sprinkled with carbon particles, which serve as deformation tracers for particle image velocimetry (PIV). (c) Change in the elastic modulus (Pa) in the jejunum and hindgut regions of the chick gut at the jejunum colonization stage (E4.5–E5, $n = 5$) and during hindgut colonization (E7.5, $n = 5$). Error bar length is the standard deviation across samples. A star indicates a significant difference ($p < 0.05$, two-tailed Mann-Whitney test).

ENCC population in a proliferative and undifferentiated state. More recently, adhesion molecules (β 1-integrin, N-cadherin, L1-CAM) have been shown to contribute to ENS development by regulating ENCC migratory behavior^{9–13}. Our understanding of the molecular mechanisms controlling NCC migration has thus deepened, and we now have a more detailed molecular description of the main ECM components through which NCCs migrate^{11,14,15}.

In addition to the role of local biochemical factors, the mechanical properties and geometric nature of the cellular environment have been shown to dictate morphogenesis by changing cell fate, shape and migratory behavior, and these parameters act in synergy with growth factors, soluble peptides and the ECM^{16–21}. Environmental stiffness has been shown to have a large effect on adhesion, proliferation, migration and differentiation in various cell lines^{22–24}, but the ways in which ENCCs regulate their adhesion and migration in response to this parameter have not been investigated and the mechanical properties (elasticity) of the developing gut during ENCC colonization are unknown.

We measured, *ex vivo*, the bulk and micron-scale mechanical properties of chick and mouse embryonic gut at different locations along the rostro-caudal axis (pre-umbilical and post-umbilical midgut, caecum and hindgut) spanning developmental times E4–E9 for chicks (the complete gut colonization period) and E12.5 to E14.5 for mice (the hindgut colonization period). We found that ENCC migration occurred in soft gut tissues that progressively stiffened during colonization. By second-harmonic generation (SHG) imaging of gut sections, we determined the density and distribution of fibrillar collagen along the rostro-caudal axis of the developing gut and showed that the collagen fibers of the ECM accounted for almost half the elastic modulus of the gut tissue. We demonstrated, in *ex-vivo* experiments performed in 2D and 3D environments, that ENCC migration was modulated by the mechanical properties of the environment. Our findings thus demonstrate that the regulation of ENCC migration is dependent on ECM stiffness and structure, and shed light on the role of the mechanical properties of gut tissue during ENS ontogenesis.

Results

Embryonic gut mesenchyme stiffness during colonization by enteric neural crest cells. We devised a simple uniaxial tensile test based on glass fiber deflection^{25,26} to determine the bulk elastic modulus of chick embryonic gut (Fig. 1a,b, detailed description in Materials & Methods). We simultaneously measured

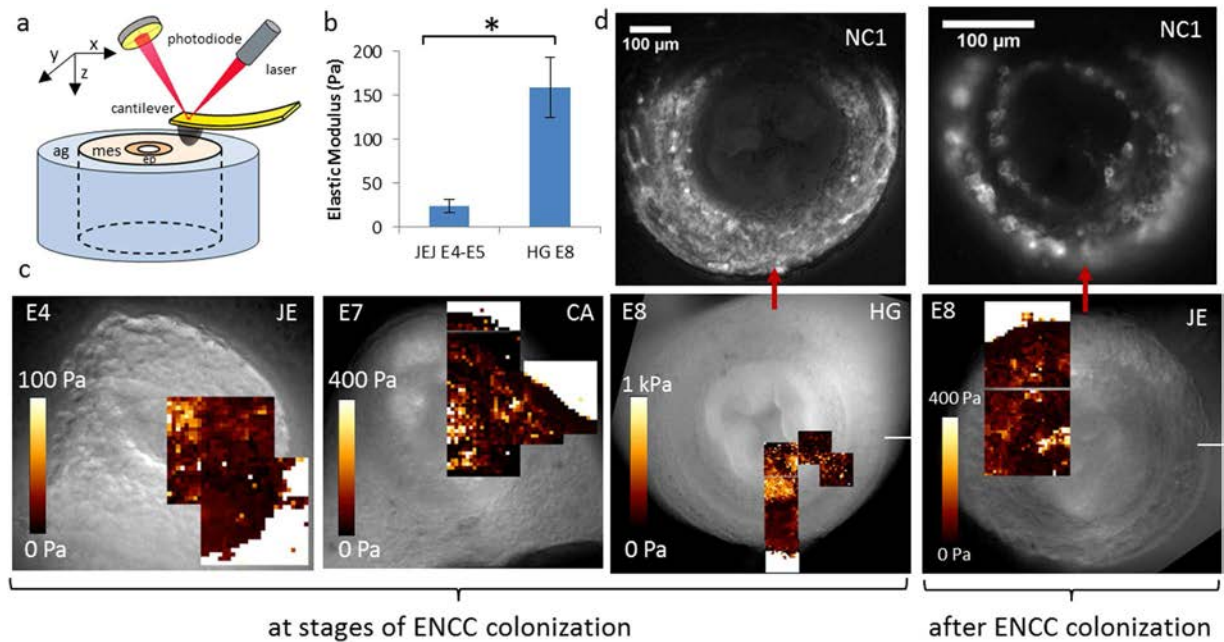


Figure 2. AFM elasticity maps of freshly prepared sections of gut embedded in agarose gels. (a) Scheme of the experimental setup. The AFM cantilever (image courtesy of W.Roos) indents a transverse section of gut (mes: mesenchyme, ep: epithelium) embedded in an agarose (ag) gel along the Z direction. After each indentation, the cantilever is displaced in the XY plane to generate stiffness maps. (b) Mean mesenchyme stiffness deduced from AFM maps at the jejunum (E4.5–E5, $n = 4$ different guts) and hindgut (E8, $n = 4$ different guts) colonization stages. For each gut section, the mesenchyme stiffness was calculated by averaging over 2–5 $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ maps, and each map comprises ~ 50 –400 pixels (each pixel yields one local modulus value). Error bar length is the standard deviation across samples. A star indicates a significant difference ($p < 0.05$, two-tailed Mann-Whitney test). (c) E4-JE, E7-CA (caecum) and E8-HG are sections at stages during ENCC colonization. E8-JE corresponds to a region that has already been colonized by ENCCs. Each AFM map is a $100 \times 100 \mu\text{m}$ square, typically with a $5 \mu\text{m}$ step (i.e., 20×20 px). Up to six maps were obtained per sample. The white region on AFM maps located around the gut sections corresponds to the stiff agarose gel in which the sample is embedded. (d) Post-AFM NC1 immunostaining of E8-HG and E8-JE sections showed the ENCCs to be located at the outer periphery of the gut. The dark region at the top of these images results from incorrect placement of the microscope diaphragm.

the angular deflection of the fiber, to assess the tensile force applied to the digestive tract, and the resulting deformation in the jejunum (proximal midgut), ileum (distal midgut), and hindgut. The slope of the line for the stress-strain data in each region corresponds to the local tensile elastic modulus (Fig. 1a inset). All regions were deformed simultaneously by the same force ramp, providing a reliable way of comparing elastic modulus variations along the rostro-caudal axis of the gut.

Stress-strain characteristics were linear up to at least $\sim 20\%$ deformation (Fig. 1a inset). The elastic modulus was not significantly dependent on strain rate, so long as strain rate remained well above the viscoelastic relaxation rate of the gut. The embryonic gut stiffened (increased elastic modulus) during its development from E4.5 to E7.5 (Fig. 1c). The elastic modulus values we found (200–1000 Pa) are consistent with the results obtained for other embryonic tissues in other studies with micropipette aspiration techniques²⁷. These previous studies also reported developmental stiffening of the heart. The elasticity of E8 embryonic chick midgut (jejunum) was measured by Savin *et al.*²⁸ using a magnet and grafted steel bead system, they find a modulus value of 4000 Pa whereas our measurements indicate 1074 ± 144 Pa in the jejunum at E7.5. This discrepancy might be due to differences in the buffers used for the tensile test (phosphate-buffered saline here, Krebs-Ringer in the work of Savin). As Krebs-Ringer contains glucose and magnesium, this might increase the active contribution of muscles to the tensile stiffness (muscles are already well developed in the jejunum at E8). Differences relating to chick species (breed of JA57 cocks and I66 hens here, White Leghorn in the work of Savin *et al.*) also cannot be excluded. We used the detailed chronology of ENCC migration in the chick established by Goldstein & Nagy²⁹ to infer the developmental stage at which the ENCC migratory front crossed the jejunum, ileum and hindgut. At the stages at which ENCCs are colonizing the midgut (E4.5–E5), they encounter a ~ 450 Pa environment, and when they migrate through the hindgut (E7.5), they encounter a tissue with a higher tensile elastic modulus of ~ 1000 Pa.

One limitation of the uniaxial tensile test is that it yields the mean bulk stiffness, but does not provide information about local elasticity or its variation within the gut mesenchyme, where ENCCs migrate. We addressed this point by atomic force microscopy (AFM) indentation, in force spectroscopy mode, to probe fresh transverse gut sections (Fig. 2a) at different developmental stages. Each indentation probed the elasticity of about 3–10 cells. We superimposed elasticity maps onto the corresponding microscopy images of the gut sections analyzed at stages

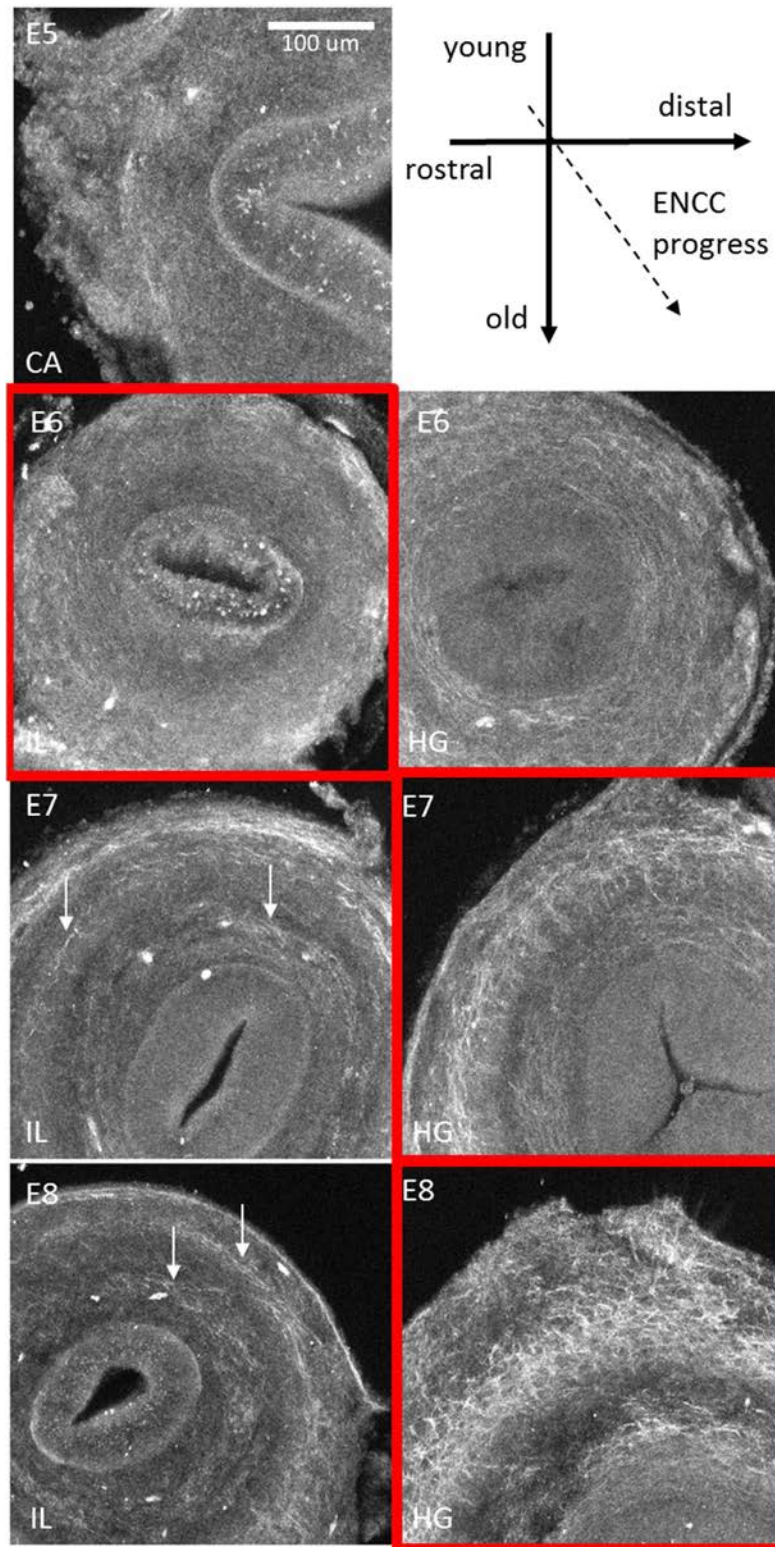


Figure 3. Second-harmonic generation (SHG) images of chick gut sections at different developmental stages (E5–E8) and for different regions along the rostro-caudal axis. IL = ileum. CA = caecum, HG = hindgut. The images are maximum z -projections of $3\ \mu\text{m}$ -step z -stacks over a total depth of $100\ \mu\text{m}$ from the section surface. Red boxes surround sections corresponding to the approximate position of the ENCC front at the developmental time point concerned. All the acquisition parameters of the SHG microscope were kept constant between samples so that SHG signal intensities could be compared across ages and gut regions. White arrows in IL E7–E8 indicate rings of collagen fibers not present at earlier stages. The scale bar is provided at the top right and is the same for all images. Another sample comparing SHG at E6 and E8 in the hindgut is presented in Figure S12.

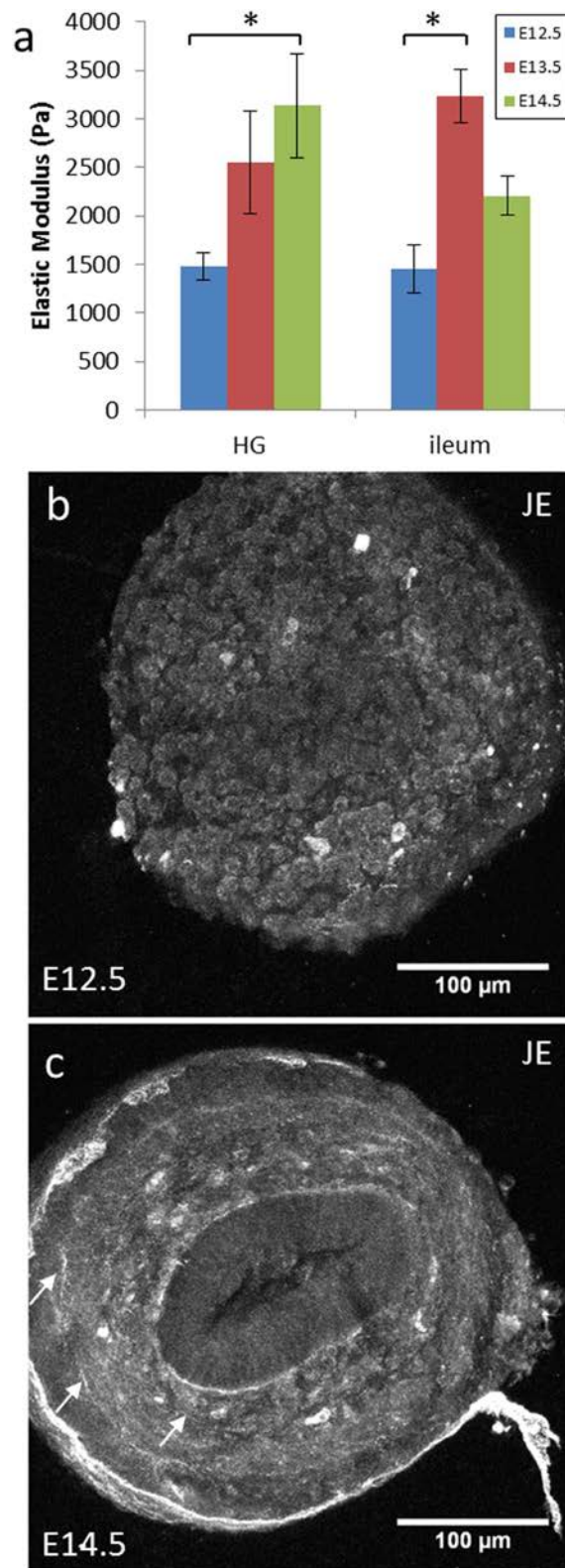


Figure 4. Stiffness and collagen in mouse guts. (a) Changes in the genotype-averaged elastic modulus of mouse guts from E12.5 ($n = 3$ Edn3^{ls/ls}, $n = 3$ Edn3^{ls/+}, $n = 2$ wild-type), E13.5 ($n = 3$ Edn3^{ls/+}, $n = 2$ wild-type) and E14.5 ($n = 2$ Edn3^{ls/+}, $n = 1$ wild-type), for the hindgut and ileum. The error bars indicate the SEM. A star indicates a significant difference ($p < 0.05$, two-tailed Mann-Whitney test). (b) Representative SHG z-stack maximum projections for E12.5 and E14.5 jejunum (JE), in the same acquisition conditions as in Fig. 3. White arrows point at circularly arranged collagen fibers at E14.5, that are not present at E12.5. The complete SHG data set is shown in the Figure S13.

E4–E8 (Fig. 2c), both in regions recently invaded by ENCCs and in regions in which the ENCCs had already established themselves to form the myenteric and submucosal plexi. Figure 2d presents immunostaining for NC1 (a marker of ENCCs) of the E8 hindgut and E8 jejunum sections mapped by AFM. We observed no systematic large-scale gradients or structures of differing stiffness within the mesenchyme of the gut for ages E4–E7. In the jejunum at E8 (Fig. 2c), the muscularis appeared to be stiffer than the mucosa. The more central regions of the gut sections were stiffer (by a factor of 2–8) than the more peripheral regions. These stiffer regions were often correlated with the location of the epithelium. The mean AFM stiffness of the mesenchyme increased with age (Fig. 2b,c); the mesenchyme stiffness is higher by the time the ENCCs colonize the hindgut than it was when they were colonizing the midgut (Fig. 2b). These results corroborate, at a smaller scale, those found by bulk tensile testing (Fig. 1c).

The elastic modulus values deduced from AFM indentation (20–200 Pa) were consistent with AFM measurements performed by Henkels *et al.* on chicken embryo blastula explants at the gastrulation stage. However, they were an order of magnitude lower than the values deduced from uniaxial tensile testing (200–1000 Pa). We believe that this difference may reflect differences between the tests: the tensile test measures the section-averaged tensile modulus, whereas AFM measures the local compressive modulus. Longitudinal fibrous structures (e.g. collagen, elastin), which are in a tensile state in the traction assay, contribute less to the elasticity of the organ when under compression (AFM). The cutting of transverse sections probably also disrupts the local mechanical properties of the gut, by cutting fibers/cell connections and damaging cells at the surface. Possible damage due to cutting does not however affect the conclusions we come to concerning the elasticity distribution within a section and its time evolution for developing organs. The maps presented in Fig. 2 represent, to the best of our knowledge, the first force spectroscopy images of live embryonic tissue sections combined with immunohistochemical mapping, and the first comparison of AFM elasticity measurements with another independent method (tensile testing) for this type of tissue.

Developmental stiffening of the gut is linked to gradual enrichment in collagen fibrils and the organization of these fibrils.

Collagen plays a crucial role in ensuring tissue mechanical integrity, particularly in the gut wall³⁰. We assessed the contribution of collagen to the elastic modulus, by measuring the tensile elastic modulus of E5.5 guts ($n = 3$) before (E_0) and after (E_{colla}) treatment with collagenase for 10 minutes. The estimated contribution of collagen to the elastic modulus $(E_0 - E_{colla})/E_0$ was $43.3 \pm 7.7\%$. This value is consistent with findings on the effect of collagenase on embryonic heart tissues²⁷ and confirms that collagen is one of the important contributors to tensile stiffness. Developmental stiffening may, therefore, be linked to a change in collagen production and distribution within the developing gut. We used second-harmonic generation (SHG) microscopy to assess the endogenous signal from collagen I and III fibers, the main sources, together with myosin, of SHG in biological tissues^{31,32}. The SHG technique has been reviewed in recent work^{33–35} and is often used to assess the role of fibrillar collagen on biomechanical properties of biological tissues^{36–38}. For dermal samples, SHG signal has been shown to co-localize with the fluorescence of collagen I immunohistochemistry³⁹. One advantage of SHG microscopy is that it does not require immunolabeling or dehydration of samples; fibrous collagen SHG signal intensity can therefore be quantitatively obtained without any artefacts arising from differences in antibody binding/penetration/application time across samples. Contrary to electron microscopy, SHG also does not require dehydration of the tissue, which would clearly affect the native collagen organization. Collagen I mapping along NCC pathways has, to our knowledge, previously been performed only by immunohistochemical methods, at earlier stages of chick embryo development¹⁴.

We obtained spatiotemporal SHG pictures of embryonic chick gut sections (Fig. 3). The boxes outlined in red indicate sections located at the approximate position of the ENCC migratory front at these time points in development. During the colonization of the ileum and caecum by ENCCs (E5–E6), the SHG signal intensity was uniform in the mesenchyme (consistent with the results of a previous study¹⁴ on E4 chick gizzard). This uniform signal may correspond either to non-specific background signal (noise) or to short, uniformly distributed collagen fibrils. When the ENCCs reached the hindgut at about E7, the collagen fibers in this region were found to form two rings (Fig. 3, E7–8, HG), an inner ring located next to the epithelium (in the region of the submucosa/lamina propria) and a more peripheral ring, presumably corresponding to the developing circular muscle layer (muscle tissue is already present when the ENCCs reach the chick hindgut). The collagen fiber density increased in the HG from E6 to E8. In the colonized zone of the gut (E7–8, ileum), distinct, circularly arranged collagen fibrils concentrated to form two rings (Fig. 3, white arrows), that were not seen at earlier stages in this region (E5–6, ileum).

Developmental stiffening in mice. Abnormally high levels of collagen IV and laminin have been reported in the guts of lethal spotted ($Edn3^{ls/ls}$) mice⁴⁰. These mice display colonic aganglionosis, one of the phenotypic outcomes of Hirschsprung disease. As collagen IV and laminin could potentially contribute to the stiffening of the embryonic gut, we compared the guts of $Edn3^{ls/ls}$ mice with heterozygous ($Edn3^{ls/+}$) and wild-type ($Edn3^{+/+}$) mice at E12.5, in tensile tests. The average moduli of $Edn3^{ls/ls}$ in the hindgut and ileum were within the error bar of the average moduli measured for $Edn3^{ls/+}$ or $Edn3^{+/+}$ mice at stage E12.5 (Figure S1). When we pooled the different genotypes, we found that mouse gut tissue stiffened (Fig. 4a) over the course of development, from E12.5 (ENCC migratory front at the proximal hindgut) to E14.5 (gut fully colonized). Hindgut stiffness significantly increased from 1.5 kPa at E12.5 to 3.2 kPa at E14.5. SHG images showed distinct, circularly arranged collagen fibers at E14.5 (white arrows in Fig. 4c) whereas no distinct fibers could be seen at E12.5 (uniform signal, Fig. 4b). These results on mice are similar to those presented for chick guts (Figs 1 and 3). They also reveal that changes in collagen IV and laminin in these mutant mice do not have an impact on tissue stiffness (within the resolution of our measurement, ± 465 Pa).

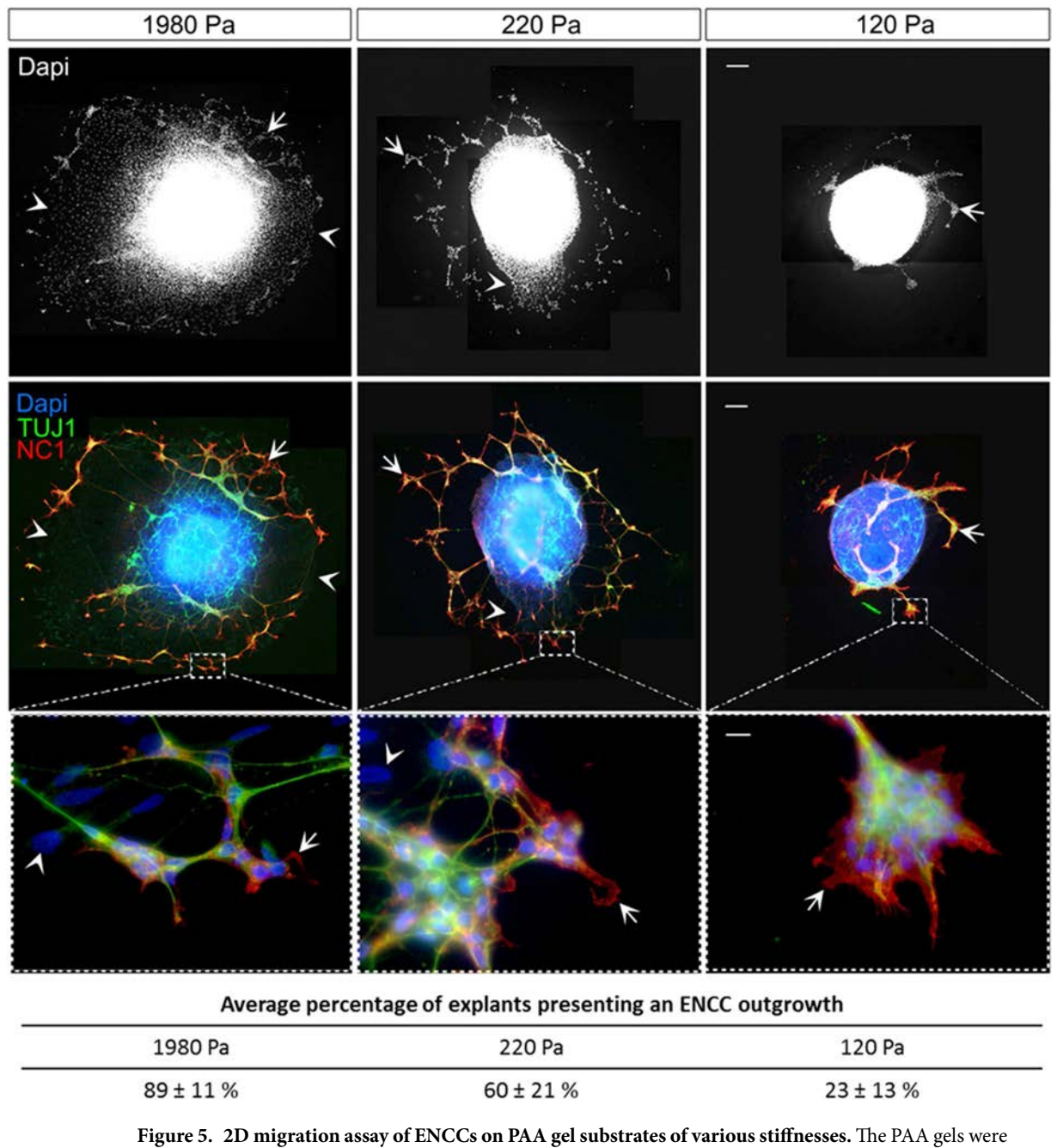


Figure 5. 2D migration assay of ENCCs on PAA gel substrates of various stiffnesses. The PAA gels were coated with covalently attached FN at a fixed density, to facilitate the adhesion of ENCCs. Gut explants were cultured overnight, fixed and immunostained for the NCC marker (NC1, red) and a neuronal marker (TUJ1, green), and labeled with DAPI (nucleus, blue). The upper panels show Dapi staining of the cell outgrowth around the explant the arrows and arrowheads. The middle panels show the merge images of Dapi, NC1 and TUJ1 stainings revealing the ENCC (NC1+/TUJ1+/Dapi+, arrows) and mesenchymal cells (NC1-/TUJ1-/Dapi+, arrowheads), Bar = 100 μ m. The lower insets show ENCCs (arrows) and mesenchymal cell morphology (arrowheads) at a higher magnification, Bar = 10 μ m. The lower panel shows the mean percentage (\pm SEM) of explants displaying ENCC outgrowth, averaged over the three independent experiments performed. The total number of explants analyzed was 10 for 1920 Pa, 19 for 220 Pa and 21 for 120 Pa.

Having characterized the micromechanical properties of the embryonic mesenchyme during gut colonization by ENCCs, we investigated the effect of changes in the stiffness of the environment on ENCC migration in two and three dimensions.

ENCCs can adhere to and migrate on soft 2D substrates. It has been clearly shown that cell adhesion and migratory properties in two dimensions can be modulated by substrate stiffness²⁴. However, it remains unclear how ENCCs perceive and respond to the rigidity of their environment. We cultured chick embryonic

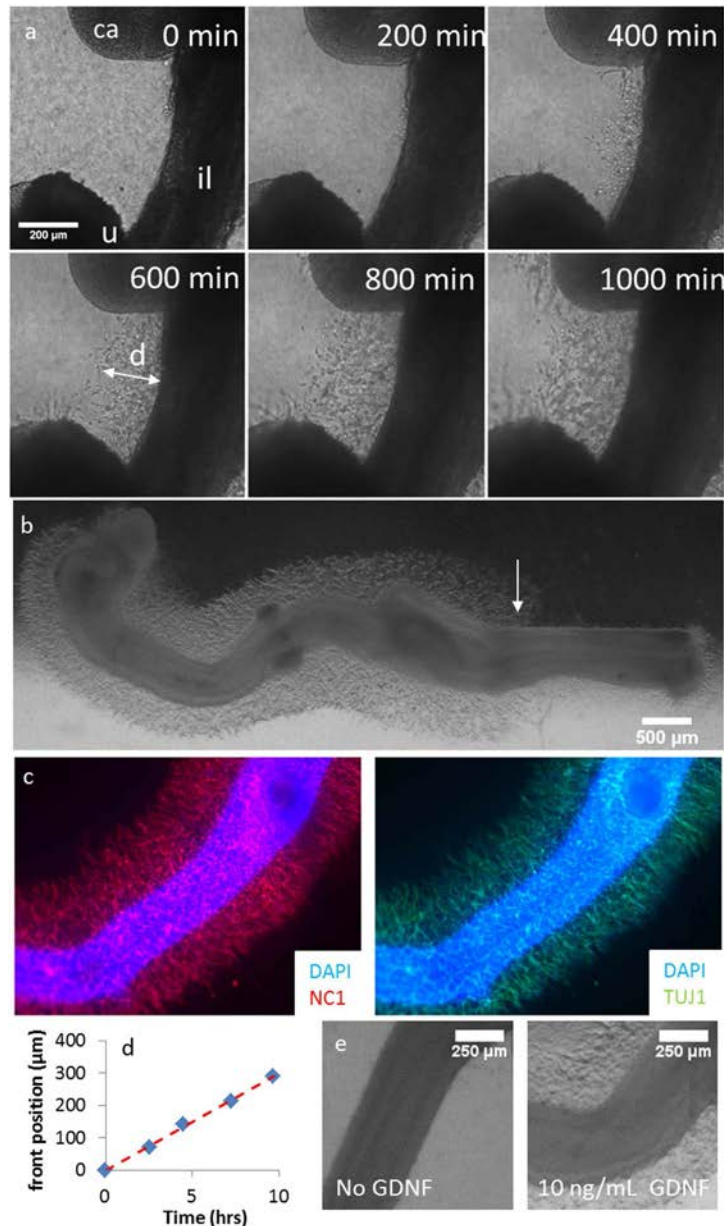


Figure 6. ENCCs from chick gut invading a 3D collagen matrix containing GDNF. (a) Extracts from time-lapse Movie 1 (see Online Material), E6 chick gut embedded in a 660 Pa gel supplied with DMEM and 10 ng/mL GDNF, on the stage of an inverted microscope maintained at 37 °C. Time is counted from the moment the gut (E6) was imaged (i.e., approximately ~1 h after embedding in the gel). il: ileum, ca: caecum, u: umbilicus. (b) Wider field view of the ENCC halo surrounding a gut in the same conditions, after 48 h of culture, left: rostral, right: distal. The distance traveled by ENCCs is greatest at the position of the ENCC migratory front in the gut, i.e., at the entrance of the hindgut at this stage (arrow). This distance is shorter at more rostral positions, yielding the overall pear shaped pattern observed in all cultures. (c) DAPI, NC1 and TUJ1 fluorescence staining of a gut in a 1500 Pa gel (gel no. 4) after 72 h of culture. All cell outgrowths labeled ($n = 7$) showed similar patterns of staining for NC1 and TUJ1. (d) Mean distance d of the ENCC migration front from the gut wall as a function of time extracted from (a). (e) Comparison of ENCC migration from E5.5 midguts placed in a 660 Pa gel after 24 h of incubation without GDNF (left) or with 10 ng/mL GDNF (right). See Figure S5 for the full concentration trial.

midgut explants (at stage E5.5/E6.5) overnight on glass and on 2D PDMS substrates of different stiffnesses (28 kPa, 15 kPa and 1.5 kPa) coated with fibronectin (FN). We compared the capacity of cells to escape from the explant and migrate on these substrates. The cell outgrowths, composed of ENCC (NC1+/TUJ1+/Dapi+) and mesenchymal cells (NC1-/TUJ1-/Dapi+), were similar for all stiffnesses considered (Figure S2), indicating that ENCCs and mesenchymal cells were able to adhere and to migrate equally well in the range 1.5 kPa to GPa (glass). We then cultured gut explants on FN-coated polyacrylamide (PAA) gels⁴¹ of gut mesenchyme-like stiffness (see

Fig. 1): 1980 Pa, 220 Pa and 120 Pa (Fig. 5). Both ENCCs (arrows) and mesenchymal cells (arrowheads) are able to migrate from the gut explant when cultured on the 1980 Pa PAA gel (Fig. 5, top and middle left panels). On 220 Pa gels, the cell outgrowth was less extended and mostly composed of ENCC with very few mesenchymal cells (Fig. 5, top and middle central panels, arrows and arrowheads respectively). On the softest gel (120 Pa) in contrast, the great majority of explants displayed no cell outgrowths (Fig. 5, table) or very reduced ones with only ENCCs (Fig. 5, top and middle right panels, arrows).

ENCC morphology was similar on 1980 Pa and 220 Pa substrates. The ENCCs displayed extended lamellipodia, revealing their capacity to adhere and spread efficiently on these substrates (Fig. 5, high magnification in the lower left and central panels, arrows). On 120 Pa PAA gels, ENCCs were more clustered but some of them exhibited protrusions and lamellipodia at the periphery of clusters indicating that ENCCs are able to adhere and spread (Fig. 5, lower right panel, arrow). Thus, ENCCs can interact with and migrate on substrates of stiffnesses similar to those measured for the embryonic gut at stage of ENCC colonization (220 Pa). The mesenchymal cells however could barely escape from the gut explants cultured on substrate rigidities below 1500 Pa, indicating an alteration of both their adhesion and migration capacities under this threshold.

ENCC migratory front speed in 3D gels decreases with increasing matrix stiffness. As ENCCs migrate in a 3D environment, we carried out a 3D migration test by embedding the duodenum to distal colon segment of embryonic chick guts (E5.5–6) in collagen gels (see Materials & Methods) supplied with the ENCC chemoattractant GDNF and nutrients. Figure 6a (excerpts from time-lapse Movie 1, available online) shows cells emerging from the gut wall and penetrating the collagen gel within hours after the start of incubation. Figure S3 shows that ENCCs are present both below and above the plane of the gut, indicating that they have invaded the gel surrounding the gut in all directions. Figure 6b shows a lower magnification view of the same gut after 24 h of culture. The cells that have migrated from the midgut form a halo. Immunolabeling of the samples for TUJ1 and NC1 (Fig. 6c) confirmed that these cells were ENCCs. The breadth of this halo increased rostro-caudally (Fig. 6b), reaching a maximum close to the position of the ENCC migratory front within the gut (white arrow Fig. 6b). In older guts (E9.5), the ENCCs form a cone (Figure S4d, arrow) extending in the rostro-caudal direction, confirming that the more rostral cells depart later, possibly because these more mature cells are less sensitive to GDNF signaling. Low-magnification time-lapse imaging (Movie 2) revealed that the shape of the halo resulted from the more distal cells leaving the gut earlier than the more rostral cells. No cells leaving the hindgut wall were observed, even in guts old enough for this part of the digestive tract to be already colonized. However, cells were observed leaving the cloaca (Movie 2). During the first 10 h of the experiment, ENCCs were found to advance at a mean speed of $\sim 30 \mu\text{m}/\text{h}$ (Fig. 6d) in a 660 Pa gel. The stiffness of the 660 Pa gel is similar to that of the chick embryonic mesenchyme (Fig. 1), and the speed of migration measured in this gel was similar to that *in vivo* in chick⁴² or mouse guts³. Although differences in the mechanisms regulating ENCC migration in collagen gels compared to *in vivo* and intact gut segments grown *ex vivo* have been reported^{7,43–45}, collagen gels do offer an opportunity to examine ENCC migration in a 3D environment. PIV tracking of the displacements of small particles embedded in the gel surrounding the gut showed that ENCCs pulled on the collagen gel to migrate (Figure S5). No migration occurred in the absence of GDNF (Fig. 6e), consistent with the known chemotactic effect of this molecule on ENCC⁸, but it should be stressed that NCCs at an earlier stage migrate from the neural tube in collagen gels without the addition of chemoattractant^{46,47}. The density of the ENCC migratory front and its mean distance from the gut wall were found to increase as GDNF concentration increased from 0 to 10 ng/mL; further increases in GDNF concentration did not stimulate ENCC migration further (Figure S6).

Porosity and gel stiffness were controlled by modifying collagen concentration, gelling temperature and the final pH of the gel (Figure S7). Seven gels spanning physiological bulk mesenchyme stiffness values (Figs 1, 4) from 150 Pa to 15 kPa were thus obtained. We imaged the structure of the gels by SHG microscopy (Figure S6) and assigned the gels to three porosity groups (low, average, high) on the basis of the fraction of the area occupied by pores greater than $3 \mu\text{m}$ in diameter: fewer than 25% (low porosity) between 25 and 40% (average) and more than 40% (high). The characteristics of the gels are summarized in Fig. 7a. One E5.5 gut was embedded in each gel and the final GDNF concentration was kept constant at 10 ng/mL. Migration distance was evaluated from microscopy images (Fig. 7b) by measuring the average distance of the ENCC wavefront from the ileum wall (Fig. 6a). Two independent experiments were carried out (Fig. 7c,d) independently for all seven gels, and an additional independent experiment for a subset of gels (Figure S8).

The breadth of the ENCC halo was strongly correlated with gel stiffness, decreasing monotonously with increasing gel stiffness (Fig. 7b–d). Migration distance was always greatest in the softest (150 Pa) gel; migration was either completely halted (Fig. 7d) or delayed by at least 20 hours and restricted to a small (up to $80 \mu\text{m}$) region around the gut (Figure 7c) in the hardest gels, the 5 kPa (no. 6) and 15 kPa (no. 7) gels. For intermediate elasticity values (540 Pa–3000 Pa), migration distances were intermediate between these two extremes. Remarkably, in this range of elasticity, two pairs of gels that had very similar elastic moduli (nos. 2&3 and nos. 4&5) but differed strongly in porosity and collagen content (the less porous gels had a higher collagen concentration, see Fig. 7a) yielded similar migration distances (detailed comparisons for these gels are shown in Figure S9). Thus, ENCC migration is strongly modulated by and correlated with environmental stiffness.

At a given collagen concentration, migration distance was dependent on gel fiber structure (which, in turn, determines elastic modulus and porosity). Indeed, gels 1 and 6 had identical collagen concentrations of 2 mg/mL (Figs 7c,d & S10) but yielded migration distances of $600 \mu\text{m}$ (gel 1) or 0 (gel 6, higher fiber thickness). In the specific case in which collagen concentration is varied but pH and gelling temperature are kept constant, the Young modulus increases linearly with collagen concentration (as found here and in Wolf *et al.*⁴⁸). From the results presented above, it follows that in this case ENCC migration distance from gut explants decreases with increasing collagen content (as can be seen by comparing gel pairs 1&2 and 3&4). Such a decrease has been reported for NCCs migrating from neural tubes in 3D collagen gels without GDNF^{47,49}.

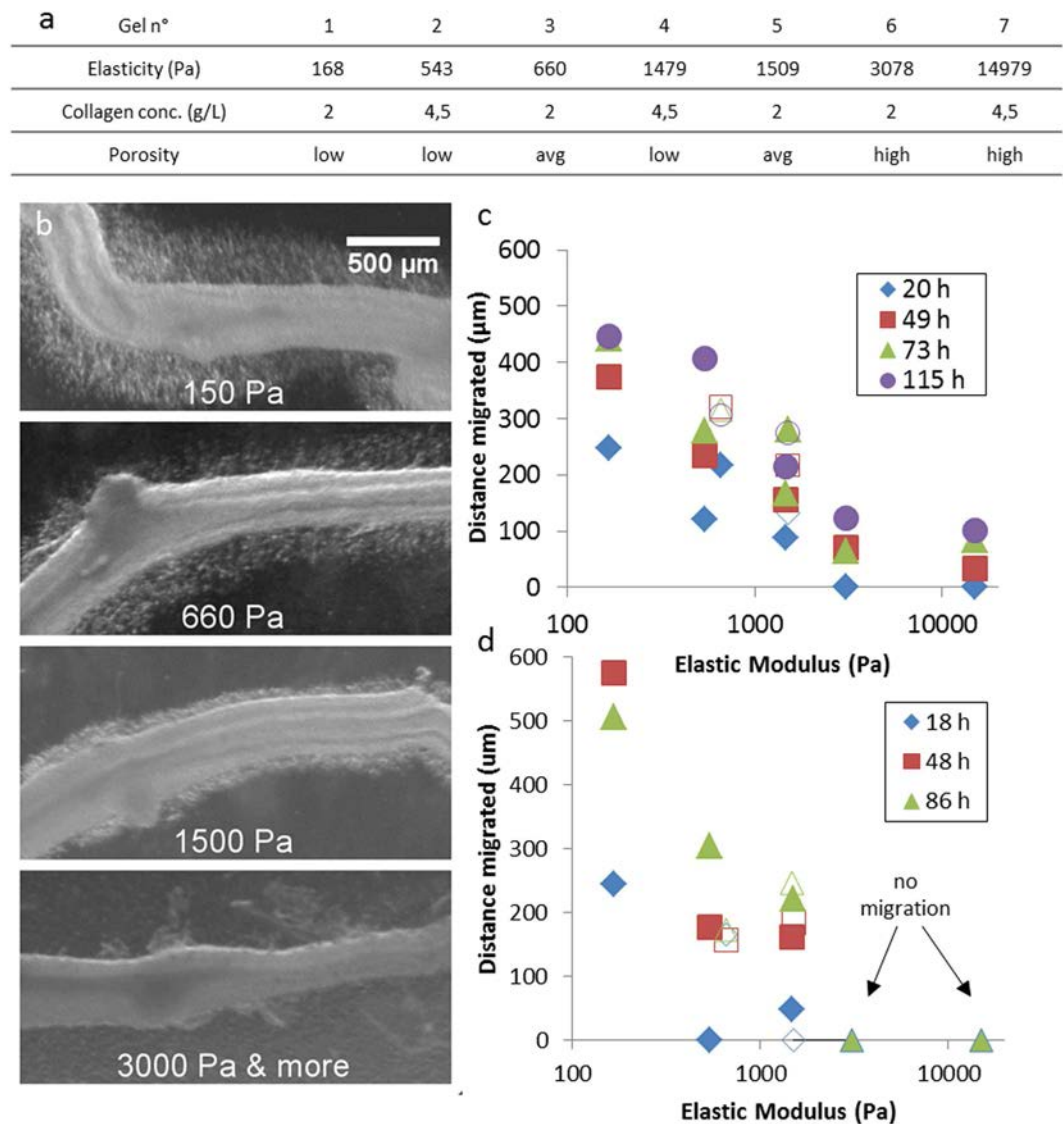


Figure 7. Effect of gel stiffness on ENCC migration. (a) Characteristics of the seven collagen gel formulations considered in this work, sorted in order of increasing Young modulus. (b) Migration halo around E6 chick guts embedded in gels of increasing stiffness, after 18 h of incubation. (c,d) Mean distance of the migration front from the gut wall as a function of gel elastic modulus at different times for two independent experiments. Error bars are smaller than the symbol width. For the two pairs of gels (2&3 and 4&5) with very similar stiffnesses but different porosities, the more porous gel is indicated by an open symbol. No migration was seen over an 86 h period for gels 6&7 in (d).

Migration distance did not depend on porosity alone, as gels with similarly low porosities (gels 1, 2, and 4) yielded different migration distances (Figs 7c,d & S9). The softer gels (gels 1&2) used in our study tended to have very small pores (mostly $< 1 \mu\text{m}$), whereas the stiffer gels (gels 6&7) had larger pores (mostly $> 3 \mu\text{m}$). Remarkably, these larger pores did not favor ENCC migration.

Proteolysis is required for ENCC migration in collagen gels. It has recently been shown that matrix metalloproteases (MMPs) are essential for enteric⁵⁰, trunk and cervical⁵¹ NCC migration. We therefore investigated whether the observed dependence of ENCC migration distance on collagen gel stiffness was dependent on the collagenase-type enzymes produced by NCCs. We inhibited MMPs with GM6001 (also called ilomastat). A representative result is shown in Fig. 8.

For all guts tested ($n = 4$), GM6001 inhibited ENCC outgrowth, as shown by comparisons with untreated guts ($n = 4$). We confirmed that GM6001 did not affect other cell motility functions unrelated to proteolysis: it had no effect on ENCC migration on 2D substrates (Figure S11) at the same concentration ($20 \mu\text{M}$). Thus, the ENCCs actively degrade the collagen gel matrix in order to progress. It should be noted that 3D cell migration in collagen gels has been shown to occur with⁴⁸ or without remodeling/degradation of the gel matrix⁵², depending on the cell type considered.

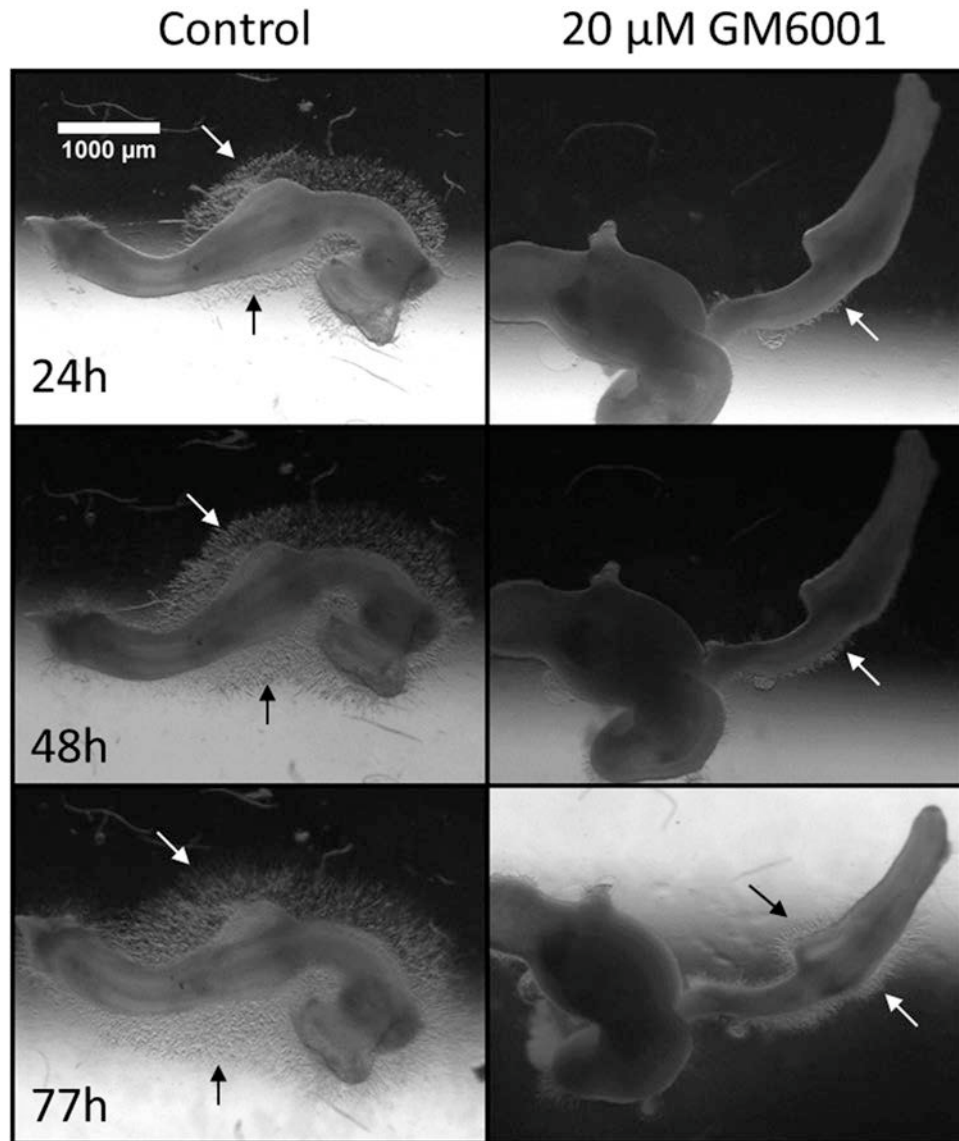


Figure 8. Representative ($n = 4$) effect of $20\ \mu\text{M}$ GM6001 on ENCC migration. E5 gut embedded in a 150 Pa gel, with 10 ng/mL GDNF, with or without GM6001. Arrows indicate the position of the ENCC migratory front.

Discussion

On 2D substrates, ENCCs migrated over a large range of stiffnesses, from several hundred Pa to 1 MPa. One outcome of our result is that ENCCs can interact, spread and migrate on very soft surfaces (100–200 Pa) unlike mesenchymal cells that originated from the same explants. This correlates with the ability of ENCCs to colonize embryonic gut tissue presenting a similar range of elasticity, as revealed by our measurements. It indicates that these cells may be particularly well adapted to migrate on soft environment. This probably reflects differences in intrinsic cell elastic properties, contractility or to adhesion receptor repertoire, and their ability to adapt the migratory machinery to the elasticity of the 2D environment. The difference of behavior between ENCCs and mesenchymal cells to substrate elasticity is most likely related to cell-type. Previous studies have for example shown that fibroblasts and endothelial cells exhibit a round-shape on very soft surfaces while neutrophils can spread^{53,54}. Glioma cells exhibit a dramatic reduction in the speed of locomotion on softer substrates²⁴, whereas neurons produce more branched neurites⁵⁵.

In 3D gels, elasticity was found to be an accurate predictor (Fig. 7b,d) of ENCC migration distances, hinting at a possible underlying physical mechanism: to progress within the gel, the cells have to “push” collagen fibers aside, deforming or even remodeling the gel locally. The energetic demand on the NCCs should increase with the stiffness of the medium or fiber thickness. However, in addition to this process, our experiments with MMP inhibitors showed that proteolysis of the surrounding matrix was also required for ENCCs to migrate in collagen gels. Thus, for cells migrating into a dense collagen gel, the time it takes for the collagenase enzymes to degrade the matrix will clearly be proportional to collagen concentration, but will also depend on collagen fibril structure and the area accessible to the enzymes. MMPs are probably more efficient at degrading high surface-to-volume

ratio collagen fibers, such as those present in weakly reticulated gels (gels 1&2), and this would probably affect the progress of cells in gels containing thick collagen fibers (gels 6&7). The slower migration of ENCCs in stiffer gels can thus be explained in terms of biochemical and/or physical effects, with both probably contributing to some extent. Anderson⁵⁰ demonstrated that the ENCC migration speed decreases in mouse hindgut when MMPs are inhibited by GM6001, further stressing the importance of ECM cleavage for ENCC migration. We note that zinc-protein inhibition by GM6001 also affects the signaling pathways Notch⁵⁶, ephrin⁵⁷ and EGF signaling⁵⁸; Ephrin signaling is involved in cell-cell repulsion following engagement, which is important for coordinated migration and neuronal axon guidance⁵⁹.

We found that gel porosity alone was not correlated with migration distance. This result may seem at odds with recent findings by Wolf *et al.*⁴⁸ suggesting that pore size and nuclear deformability are the factors determining cancer cell migration in collagen matrices. We highlight several differences that may explain this discrepancy: the cancer cells studied by Wolf *et al.* were less deformable than ENCCs as they could not penetrate filter pores smaller than 2–3 μm ⁴⁸, whereas NCCs have been shown to pass through pores of less than 0.9 μm in diameter⁶⁰. As the sizes of the pores used here and in their work were similar (1–10 μm), it seems reasonable to suggest that pore size may be a limiting factor for the cells studied by Wolf *et al.* but not for ENCCs. Another important difference lies in the fact that Wolf *et al.* calculated cell speed from the total path length (including go, stop and reversal phases) extracted from single-cell to-and-fro trajectories, whereas we followed the ENCC migratory front position as a function of time. Finally, we cannot rule out the possibility of differences between cell types. Newgreen⁶⁰ studied the influence of physical parameters of the ECM on NCC migration and suggested that the effective size of the microspaces between fibrils in the ECM were determinants of NCC migration. We show here that increased fibril organization (increased fibril length, thickness, and connectivity of the collagen fiber network), which is directly related to stiffness, determines migration speed, whereas pore size, at least within the 1–10 μm range, does not. In addition to providing fundamental insights into the mechanisms of ENCC migration, our results highlight the need to control the gel formation process precisely (in particular gelling temperature and pH) when comparing the outcomes of 3D migration assays.

Tensile testing showed that the *in-vivo* bulk elasticity of the mesenchyme was in the range 100–1000 Pa (for chick) and 1–3.5 kPa (for mice), corresponding to gels 1–4 and gels 4–6, respectively (Fig. 7a). During the development of both chicks and mice, tissue stiffness increases with gut age during the period of ENCC colonization, such that the elasticity perceived by the migrating ENCC in the hindgut is two to three times that perceived in the midgut. AFM indentation provides an estimate (the probe is larger than ENCC protrusions) of the force that the ENCCs must apply to penetrate the mesenchyme. We found that this force increased by a factor ~6 with increasing gut age from E4.5–E5 to E8 (Fig. 2b), consistent with the results obtained for tensile testing. SHG imaging revealed that embryonic gut stiffening was linked to a gradual process of collagen enrichment and organization. SHG signal intensity was found to be uniform in the gut up to E6 (E12.5 for mice), corresponding either to a non-specific background signal (noise) or to short, uniformly distributed collagen fibrils. At E7–E8 (E14.5 in mice), distinct, circularly-arranged collagen fibers appeared throughout the gut in both chicks and mice (Figs 3 and 4b, S12–13). Collagen fiber density was found to increase in the chick hindgut from E6 to E8 (Fig. 3). As we demonstrated *in vitro* that increasing stiffness, within the physiological range (100 Pa–5 kPa) by increasing collagen fibril organization slows down ENCC progression in 3D (Fig. 7), and that ENCCs must actively degrade collagen to progress (Fig. 8), our results suggest that distal tissues may be harder to invade because they are reached at a later stage and are thus stiffer. Using mice guts with fluorescently labeled ENCCs, Druckenbrod *et al.*⁶¹ measured the speed of ENCCs in the different regions of the gut. They found that the average speed of the ENCC wavefront in the ileum and in the hindgut are respectively $45 \pm 10.8 \mu\text{m}/\text{h}$ ($n = 4$) and $30 \pm 7.8 \mu\text{m}/\text{h}$ ($n = 5$), i.e., the migration speed in the hindgut is 33% lower than that in the ileum. We found that the stiffness of the ileum at E12.5 is $1452 \pm 253 \text{ Pa}$ ($n = 8$) while the stiffness of the hindgut at E13.5 is $2551 \pm 524 \text{ Pa}$ ($n = 5$), i.e., the stiffness at the level of the ENCC migration front increases by 75% between E12.5 and E13.5. The inverse correlation between stiffness and migration speed we found in collagen gels (Fig. 7) is therefore also qualitatively observed *in-vivo*, suggesting that the decrease of the ENCC migration speed in the distal parts of the gut may be due to developmental stiffening. We cannot exclude that other factors, such as a different mechanism of chemoattraction, or an endothelin-3 mediated effect may play equally important roles in explaining why the ENCC migration speed decreases in the hindgut. We note that our observations are also potentially relevant for ENCCs invading the colon via the transmesenteric pathway⁶², as increased stiffness of the midgut and hindgut may prevent the cells from crossing the midgut-mesentery and mesentery-hindgut junctions.

ENCCs depleted of $\beta 1$ -integrins cannot colonize the hindgut, resulting in a Hirschsprung-like phenotype¹¹. Integrins are ECM mechanoreceptors that have been linked to MMP- and adhesion-based migration in 3D substrates. It is therefore likely that ENCCs must exert a traction force on the ECM via integrins to progress in the hindgut, a phenomenon also observed when ENCCs invade collagen gel (Figure S5). Our results suggest that the need for this traction force may be particularly important at late stages of ENCC invasion, because of the comparatively high stiffness and collagen density of the hindgut.

In addition to conditional mouse mutants in which NCCs are depleted of $\beta 1$ -integrins, several mouse models of Hirschsprung disease (*edn3/EDNRB*⁶³, *Sox10*¹³) display a delay, by about one day, in the chronology of ENCC migration with respect to the wild type. Thus, they reach the proximal hindgut at E13.5, rather than E12.5. In one study⁶³ in which young ENCC donor guts were grafted onto older ENCC-free host hindguts, the one-day-old gut was completely impervious to ENCC, suggesting the existence of a “time window” for ENCC colonization, that could be due to developmental stiffening of the hindgut (Fig. 4a). However, in another study⁶⁴, ENCCs were able to colonize older hindguts, although the speed of migration decreased in proportion with the increase in host gut age. Additionally, a haploinsufficient mouse model (*Tcof1*^{+/-})^{65,66} has recently been shown to present an ENCC migration delay of about one day whilst displaying complete ENS formation at late stages of development. It therefore seems that ENS formation can be completed even in old hindgut, unless the *Ret*⁶⁴ and *Tcof1*^{+/-}⁶⁵

mutations otherwise affect ENCC migratory pathways, mechanosensing or the properties of gut tissues. It seems reasonable to conclude that developmental stiffening may contribute to the slowing of ENCC progression and aggravate conditions in which the ENCC progenitor pool is already affected in other ways^{64,65} (reduced proliferation, adhesion and/or early differentiation).

Our findings provide new insight into ENS ontogenesis and additional mechanisms likely to contribute to the NCC migratory defects underlying neurocristopathies⁶⁷, such as Hirschsprung disease. In about 50% of Hirschsprung disease cases, the underlying cause is unknown⁶⁸. The observation that proteolysis is required for ENCCs to invade collagen gels (Fig. 8) and chick gut *in vivo*⁵⁰ indicates that identifiable candidate genes could include genes encoding MMPs or regulating the mechanotransduction response of NCCs. Future studies aiming to determine whether tissue stiffness is a limiting factor for the speed of ENCC migration *in vivo*, could investigate the direct correlation between local tissue stiffness and ENCC speed in the gut, in mice with fluorescently labeled ENCCs. Methods to soften the tissue could help to improve the outcome of cellular therapies^{69,70} based on NCC transplantation in the aganglionic gut, in neonates with a high stiffness of mature tissue likely to slow or halt cell migration. Understanding the physical limits of NCC will finally further our understanding of cancer⁷¹, as the invasive cell behavior essential for normal embryonic development can lead to deleterious tissue invasion and metastasis in adults.

Materials & Methods

Animal models. Fertilized chicken eggs were purchased from Centre Avicole d'Ile de France (CAIF, France) and incubated at 37.5 °C for up to 9 days. Fertilized quail eggs were purchased from “Les cailles de Chanteloup” (Corps-Nuds, France) and incubated at 38 °C for 5.5 days. Exact staging of the guts was achieved by morphological comparisons, as previously described⁷². Precise staging was required, because the position of the ENCC migratory front changes over both space and time. We used the results of a previous study²⁹ to infer the approximate position of the ENCC migratory front.

The lethal spotted (Edn3^{ls/+}) mouse has been described elsewhere⁷³. Lethal spotted mice were crossed to produce Edn3^{ls/+}, Edn3^{ls/ls} and wild-type embryos, and age was determined by considering the detection of a vaginal plug to correspond to E0.5. Experiments were performed in accordance with the ethics guidelines of the INSERM and CNRS and were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Institut Curie (National registration number: #118).

Sample preparation. The digestive tract was dissected and the mesentery was completely removed. The dissected guts were either used as such (tensile testing), or embedded in collagen gels (migration assays) or low-melting point agarose gels (Type VII, Sigma-Aldrich) at 37 °C. For AFM and SHG analyses, the guts were embedded in agarose and a double-blade cutter (Multirex, France) was used to cut 1 mm-thick transverse slices from different parts of the gut. Slices were immobilized by “gluing” them onto the base of a Petri dish with liquid agarose. The samples were hydrated with PBS, kept at 4 °C, and imaged within 5 h by AFM or SHG microscopy.

Uniaxial tensile test. The method we use is described in a report by our group²⁶. The gut was placed in a rectangular, optically transparent tank filled with PBS and immobilized at its anal end by pinning. The stomach was inserted into a hook formed at the end of a glass fiber (length ~10 cm, diameter ~15–20 μm) and the gut was sprinkled with carbon particles for particle image velocimetry (PIV) analysis. The glass fiber was produced by pulling a heated Pasteur pipette to a length of about 10 cm and the hook was formed by applying heat to end of the pulled pipette. Before measurement, the bending stiffness of the fiber was measured in air, by placing it in a horizontal position and hanging small weights (pieces of known lengths of a thin plastic wire of known linear mass) at its end. The force-angular deflection characteristic was linear over the 0–30° range and yielded a sensitivity $s = 1.32 \pm 0.05 \mu\text{N}/^\circ$ (per degree of deflection of the end of the fiber). The same fiber was used for all measurements reported in this study, and the forces applied were in the range 0–20 μN (angle: 0–15°). Stress was calculated by dividing the force applied by the local section area of the gut. The mean radius of the gut in different regions was measured on high-magnification images, to infer the local cross-section $S = \pi r^2$. We did not consider the cross-sectional area of the lumen, because it accounts for less than 5% of the total gut cross section at early stages of gut development (see Fig. 3). The fiber enters the PBS-air interface at a 90° angle. We used high PBS levels (~15–20 cm) to eliminate the contribution of meniscus forces to fiber deflection. The fiber was secured at its other end to a μm-stepper motor. The speed of the motor (fiber displacement) was adjusted to the length of gut studied, to achieve a strain rate of ~10%/min for all guts. The deflection of the fiber and the deformation of the gut were monitored simultaneously, from the side, by a camera. The deformation of each region (HG, ileum, jejunum) was calculated by PIV (Tracker plugin for ImageJ, courtesy of O. Cardoso) for the carbon tracers.

For collagenase tests, guts were treated with 1 mg/mL (50–200 U/mL) collagenase type IV (Life Technologies) in PBS supplemented with 0.9 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂.

Atomic force microscopy (AFM). AFM elasticity maps were obtained with a Nanowizard I (JPK Instruments, Germany) instrument equipped with a 100 μm z-piezo module (CellHesion) and a liquid-cell-adapted cantilever holder. The cantilever probes (Novascan, USA) were functionalized with a spherical (10 μm diameter) borosilicate glass indenter and had a typical stiffness of ~60 mN/m, as measured by the thermal tuning procedure in air. The stiffness of the cantilevers was further confirmed by the reference spring cantilever calibration method and was found to be consistent, to within 10%, with the results of the thermal tuning procedure. Force curves were collected in PBS at room temperature, at a constant indentation speed of 50 μm/s and a maximum indentation force of 1 nN, such that the indentation depth was less than 5 μm (the radius of the indenter). The elastic modulus was obtained by performing Hertz fits of the indentation force against depth curves. Elasticity maps were obtained by scanning between 20 × 20 (400 force curves) and 40 × 40 points

(1600 force curves) on a $100 \times 100 \mu\text{m}$ area. The resolution of the scans was therefore between 2.5 and $5 \mu\text{m}$. The position of the tip relative to the sample was recorded with a CCD camera at the beginning and end of the scan, to ensure that no substantial drift of the sample had occurred during the duration of the scan. The low-quality pictures of the CDD camera were then compared with the high-quality images of the gut sections obtained by microscopy (Nikon, 10X or 20X), and the elasticity maps were superimposed onto the microscopy images. We typically obtained 5–10 elasticity maps for any given sample. The mean elasticity of the mesenchyme was calculated by averaging the elastic modulus obtained over the area occupied by the mesenchyme. Extreme values of the modulus resulting from measurement or fitting problems were excluded from the calculation of the average.

Second-harmonic generation (SHG) imaging. SHG images of collagen in chick gut sections were obtained with an upright Leica SP5 microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) coupled to a femtosecond Ti:sapphire laser (Chameleon, Coherent, Saclay, France) tuned to a wavelength of 810 nm for all experiments. The beam was circularly polarized. We used a Leica Microsystems HCX IRAPO 25x/0.95 W objective. The SHG signal was detected in epi-collection through a 405/15-nm bandpass filter, by an NDD PMT (Leica Microsystems), with a constant voltage supply, at constant laser excitation power, allowing the direct comparison of SHG intensity values.

2D organotypic cultures. Polyacrylamide hydrogels (PAA) were produced 24 h before culture, according to a previously established protocol⁷⁴. PAA gel surfaces, used for 2D cultures, were treated with sulfo-SANPAH (0.2 mg/mL, Pierce Biotechnology), activated with 365-nm UV light source, rinse with HEPES several times and then incubated with bovine plasma fibronectin (FN, Sigma) at a final concentration of $20 \mu\text{g/ml}$ in PBS and incubated overnight at 37°C .

Uncoated PAA hydrogels were stored in PBS at 4°C for at least 24 h, to equilibrate, before atomic force microscopy (AFM). PAA Young's moduli were determined at room temperature in PBS. Up to four independent samples were studied. Elasticity maps, for five different regions per sample, were obtained by scanning 4×4 points (16 force curves) or 8×8 points (64 force curves) of a $100 \times 100 \mu\text{m}$ area. Mean elastic moduli (\pm SEM) of 1976.3 ± 287.7 Pa, 220.5 ± 57.7 Pa and 120.6 ± 41.0 Pa were obtained for gels containing final acrylamide/bis-acrylamide percentages of 10%/0.03%, 3%/0.06% and 3%/0.03%, respectively.

Two-dimensional organotypic cultures of E5.5 quail midgut explants were performed on the glass bottoms of $\varnothing = 35$ mm μ -Dishes and $\varnothing = 35$ mm μ -Dish elastically supported surfaces (ESSs) of 28 kPa, 15 kPa and 1.5 kPa (Biovalley) coated overnight with FN ($20 \mu\text{g/ml}$, Sigma). E6.5 chick midgut explants were cultured on FN-coated PAA hydrogels. Culture was performed overnight in DMEM/F12 (Gibco) medium supplemented with insulin-transferrin-selenium (Gibco), in a damp atmosphere containing 5% CO_2 /95% air, at 37°C .

Immunostaining and microscopy. Cultures were fixed by incubation with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature. Cells were permeabilized by incubation with 0.5% Triton X-100 for 5 minutes at room temperature before blocking with 30 mg/mL bovine serum albumin (BSA, Sigma) in PBS. Cultures were first immunostained with an antibody against NC1 (mouse IgM, produced in-house, diluted to $10 \mu\text{g/ml}$) and a Cy3-labeled donkey anti-mouse IgM secondary antibody (Jackson, diluted 1/300). Cultures were then blocked by incubation with control anti-mouse IgG for 20 minutes in the dark at room temperature and immunolabeled with Alexa Fluor 488-labeled mouse anti-TUJ1 (class III beta-tubulin) antibody (Covance, diluted 1/500) and with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes, diluted 1/1000). Fluorescence image acquisition was performed on an epifluorescence-histology microscope (Eclipse 90i Upright) at the Nikon Imaging Centre @ Institut Curie-CNRS. This microscope was equipped with a CCD Camera (CoolSNAP HQ2, Photometrics) and piloted with MetaMorph software. Entire explant images were reconstituted with Photoshop software, with the adjustment of brightness and contrast over the entire image to enhance fluorescence signals.

Collagen gel migration assays. Our protocol was inspired by the work of Nagy *et al.*⁷. Collagen type I was obtained from rat tail tendon after acidic extraction, as previously described⁷⁵. Collagen gels were prepared on ice by sequentially adding 20 mM acetic acid to collagen type I to dilute it to an appropriate concentration, together with M199 medium and 1 M carbonate-bicarbonate pH 9 to adjust final pH. Gelling occurred within 5 minutes of the neutralization of the collagen solution at room temperature or on a heating plate at 37°C . Seven different collagen hydrogels were synthesized by varying the collagen concentration (2 or 4.5 g/L), gelling temperature (37°C or room temperature) and final pH (6.5, 7 or 8.5). The stiffness of the collagen gels was assessed by shear rheology after 1 h of polymerization at the appropriate temperature with a strain of 0.1% at 1 Hz (MCR 302, cone/plate geometry of 25 mm, Anton Paar). We converted shear strength to Young moduli, assuming a Poisson ratio $\nu = 0.5$. Pore size was determined from the second-harmonic generation stack (SP5 with objective x25, Leica, and pulsed Ti laser from Spectra-Physics), with Fiji software. Gel porosity and modulus (SEM < 10%) were highly reproducible.

The liquid collagen solution (1 mL) was poured into a custom-made, gut-sized cylindrical cell ($\varnothing = 2$ cm, height = 1 cm). Each chick gut was transferred, with the help of tweezers, to a separate cell. We straightened the gut as far as possible and made sure it was positioned in the bulk of the collagen solution before it gelled. After 45 minutes, a stationary state of polymerization was reached. We added 1 mL DMEM (4.5 g/L glucose with GlutaMAX, Life Technologies) supplemented with 1% by weight penicillin and streptomycin (Life Technologies) and glial-derived nerve growth factor (GDNF, R&D Systems, USA) applied to the top of the gel. The reagents quickly diffused into the bulk of the gel. The resulting embedded guts were then incubated at 37.5°C and 100% relative humidity. The supernatant was replaced every 24 h with freshly prepared DMEM+PS+GDNF. Ilomastat (GM6001, Merck-Millipore) was added to the medium at a final concentration of $20 \mu\text{M}$ for gels and supernatants, as previously described⁴⁸. Time-lapse imaging (1 image/min) was performed on an inverted microscope

(Leica) or a binocular (Leica) microscope, at 37.5°C. Cell migration images were obtained by removing the samples from the incubator at fixed time points (from 18 h to 115 h) and imaging them with a binocular microscope under transmitted light. The mirror was adjusted so the samples were illuminated in twilight (pseudo-Nomarski mode) to enhance the contrast of the migrating cells.

References

1. Le Douarin, N. M. & Teillet, M. A. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **30**, 31–48 (1973).
2. Young, H. M. *et al.* Colonizing while migrating: how do individual enteric neural crest cells behave? *BMC Biol.* **12**, 23 (2014).
3. Young, H. M. *et al.* Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut. *Dev. Biol.* **270**, 455–473 (2004).
4. Burns, A. J. & Douarin, N. M. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* **125**, 4335–4347 (1998).
5. Le Douarin, N. & Kalcheim, C. *The Neural Crest 2nd Edition*, (Cambridge University Press, 2009).
6. Wallace, A. S. & Burns, A. J. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* **319**, 367–382 (2005).
7. Nagy, N. & Goldstein, A. M. Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Dev. Biol.* **293**, 203–217 (2006).
8. Young, H. M. *et al.* GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Dev. Biol.* **229**, 503–516 (2001).
9. Anderson, R. B. *et al.* The Cell Adhesion Molecule L1 Is Required for Chain Migration of Neural Crest Cells in the Developing Mouse Gut. *Gastroenterology* **130**, 1221–1232 (2006).
10. Breau, M. A. *et al.* Lack of beta1 integrins in enteric neural crest cells leads to a Hirschsprung-like phenotype. *Development* **133**, 1725–1734 (2006).
11. Breau, M. A., Dahmani, A., Broders-Bondon, F., Thiery, J.-P. & Dufour, S. Beta1 integrins are required for the invasion of the caecum and proximal hindgut by enteric neural crest cells. *Development* **136**, 2791–2801 (2009).
12. Broders-Bondon, F., Paul-Gilloteaux, P., Carlier, C., Radice, G. L. & Dufour, S. N-cadherin and β 1-integrins cooperate during the development of the enteric nervous system. *Dev. Biol.* **364**, 178–191 (2012).
13. Watanabe, Y. *et al.* Sox10 and Itgb1 interaction in enteric neural crest cell migration. *Dev. Biol.* **379**, 92–106 (2013).
14. Duband, J. L. & Thiery, J. P. Distribution of laminin and collagens during avian neural crest development. *Development* **101**, 461–478 (1987).
15. Perris, R. & Perissinotto, D. Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech. Dev.* **95**, 3–21 (2000).
16. Papusheva, E. & Heisenberg, C.-P. Spatial organization of adhesion: force-dependent regulation and function in tissue morphogenesis. *EMBO J.* **29**, 2753–2768 (2010).
17. Brouzès, E. & Farge, E. Interplay of mechanical deformation and patterned gene expression in developing embryos. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 367–374 (2004).
18. Théry, M. & Bornens, M. Cell shape and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 648–657 (2006).
19. Gilbert, P. M. *et al.* Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* **329**, 1078–1081 (2011).
20. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).
21. Tenney, R. M. & Discher, D. E. Stem cells, microenvironment mechanics, and growth factor activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 630–635 (2009).
22. Discher, D. E., Janmey, P. & Wang, Y.-L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310**, 1139–1143 (2005).
23. Lo, C.-M., Wang, H.-B., Dembo, M. & Wang, Y. Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate. *Biophys. J.* **79**, 144–152 (2000).
24. Ulrich, T. A., De Juan Pardo, E. M. & Kumar, S. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res.* **69**, 4167–4174 (2009).
25. Davidson, L. & Keller, R. Measuring Mechanical Properties of Embryos and Embryonic Tissues. *Methods Cell Biol.* **83**, 425–439 (2007).
26. Chevalier, N. R., Gazquez, E., Dufour, S. & Fleury, V. Measuring the micromechanical properties of embryonic tissues. *Methods* (2015). doi: 10.1016/j.jymeth.2015.08.001
27. Majkut, S. *et al.* Heart-specific stiffening in early embryos parallels matrix and myosin expression to optimize beating. *Curr. Biol.* **23**, 2434–2439 (2013).
28. Savin, T. *et al.* On the growth and form of the gut. *Nature* **476**, 57–62 (2011).
29. Goldstein, A. M. & Nagy, N. A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo. *Pediatr. Res.* **64**, 326–333 (2008).
30. Gregersen, H. *Biomechanics of the Gastrointestinal Tract*. (Springer, 2003).
31. Odin, C. *et al.* Collagen and myosin characterization by orientation field second harmonic microscopy. *Opt. Express* **16**, 16151–16165 (2008).
32. Guilbert, T. *et al.* A robust collagen scoring method for human liver fibrosis by second harmonic microscopy. *Opt. Express* **18**, 25794–807 (2010).
33. Campagnola, P. J. & Loew, L. M. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1356–1360 (2003).
34. Cox, G. *et al.* 3-Dimensional imaging of collagen using second harmonic generation. *J. Struct. Biol.* **141**, 53–62 (2003).
35. Chen, X., Nadiarynk, O., Plotnikov, S. & Campagnola, P. J. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nat. Protoc.* **7**, 654–69 (2012).
36. Morishige, N. *et al.* Second-harmonic imaging microscopy of normal human and keratoconus cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 1087–1094 (2007).
37. Venkatasubramanian, R. T. *et al.* Freeze-thaw induced biomechanical changes in arteries: Role of collagen matrix and smooth muscle cells. *Ann. Biomed. Eng.* **38**, 694–706 (2010).
38. Sommer, G. *et al.* Biomechanical Properties and Microstructure of Human Ventricular Myocardium. *Acta Biomater.* (2015). doi: 10.1016/j.actbio.2015.06.031
39. Chen, A. C.-H. *et al.* Second harmonic generation and multiphoton microscopic detection of collagen without the need for species specific antibodies. *Burns* **37**, 1001–1009 (2011).
40. Payette, R. F. *et al.* Accumulation of components of basal laminae: association with the failure of neural crest cells to colonize the presumptive aganglionic bowel of ls/ls mutant mice. *Dev. Biol.* **125**, 341–360 (1988).
41. Tse, J. R. & Engler, A. J. Stiffness gradients mimicking *in vivo* tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PLoS One* **6**, e15978 (2011).
42. Allan, I. J. & Newgreen, D. F. The origin and differentiation of enteric neurons of the intestine of the fowl embryo. *Am. J. Anat.* **157**, 137–154 (1980).

43. Kapur, R. P., Yost, C. & Palmiter, R. D. A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development* **116**, 167–175 (1992).
44. Woodward, M. N. *et al.* Analysis of the effects of endothelin-3 on the development of neural crest cells in the embryonic mouse gut. *J. Pediatr. Surg.* **38**, 1322–1328 (2003).
45. Stewart, A. L., Young, H. M., Popoff, M. & Anderson, R. B. Effects of pharmacological inhibition of small GTPases on axon extension and migration of enteric neural crest-derived cells. *Dev. Biol.* **307**, 92–104 (2007).
46. Davis, E. M. Translocation of neural crest cells within a hydrated collagen lattice. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **55**, 17–31 (1980).
47. Tucker, R. P. & Erickson, C. A. Morphology and behavior of quail neural crest cells in artificial three-dimensional extracellular matrices. *Dev. Biol.* **104**, 390–405 (1984).
48. Wolf, K. *et al.* Physical limits of cell migration: Control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J. Cell Biol.* **201**, 1069–1084 (2013).
49. Davis, E. M. & Trinkaus, J. P. Significance of cell-to cell contacts for the directional movement of neural crest cells within a hydrated collagen lattice. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **63**, 29–51 (1981).
50. Anderson, R. B. Matrix metalloproteinase-2 is involved in the migration and network formation of enteric neural crest-derived cells. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 63–69 (2010).
51. Monsonego-Ornan, E. *et al.* Matrix metalloproteinase 9/gelatinase B is required for neural crest cell migration. *Dev. Biol.* **364**, 162–177 (2012).
52. Schor, S. L., Allen, T. D. & Harrison, C. J. Cell migration through three-dimensional gels of native collagen fibres: collagenolytic activity is not required for the migration of two permanent cell lines. *J. Cell Sci.* **46**, 171–186 (1980).
53. Evans, E., Leung, a. & Zhelev, D. Synchrony of cell spreading and contraction force as phagocytes engulf large pathogens. *J. Cell Biol.* **122**, 1295–1300 (1993).
54. Yeung, T. *et al.* Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60**, 24–34 (2005).
55. Flanagan, L. a., Ju, Y.-E., Marg, B., Osterfield, M. & Janmey, P. A. Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport* **13**, 2411–2415 (2002).
56. van Tetering, G. *et al.* Metalloprotease ADAM10 Is Required for Notch1 Site 2 Cleavage. *J. Biol. Chem.* **284**, 31018–31027 (2009).
57. Atapattu, L., Lackmann, M. & Janes, P. W. The role of proteases in regulating Eph/ephrin signaling. *Cell Adh. Migr.* **8**, 294–307 (2014).
58. Santiskulvong, C. & Rozengurt, E. Galardin (GM 6001), a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, blocks bombesin- and LPA-induced EGF receptor transactivation and DNA synthesis in Rat-1 cells. *Exp. Cell Res.* **290**, 437–446 (2003).
59. Klein, R. Eph/ephrin signalling during development. *Development* **139**, 4105–9 (2012).
60. Newgreen, D. F. Physical influences on neural crest cell migration in avian embryos: contact guidance and spatial restriction. *Dev. Biol.* **131**, 136–148 (1989).
61. Druckenbrod, N. R. & Epstein, M. L. The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. *Dev. Biol.* **287**, 125–133 (2005).
62. Nishiyama, C. *et al.* Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nat. Neurosci.* **15**, 1211–1218 (2012).
63. Druckenbrod, N. R. & Epstein, M. L. Age-dependent changes in the gut environment restrict the invasion of the hindgut by enteric neural progenitors. *Development* **136**, 3195–3203 (2009).
64. Hotta, R., Anderson, R. B., Kobayashi, K., Newgreen, D. F. & Young, H. M. Effects of tissue age, presence of neurones and endothelin-3 on the ability of enteric neurone precursors to colonize recipient gut: Implications for cell-based therapies. *Neurogastroenterol. Motil.* **22**, 17–19 (2010).
65. Barlow, A. J., Dixon, J., Dixon, M. J. & Trainor, P. A. Balancing neural crest cell intrinsic processes with those of the microenvironment in Tcof1 haploinsufficient mice enables complete enteric nervous system formation. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1782–1793 (2012).
66. Barlow, A. J., Dixon, J., Dixon, M. & Trainor, P. A. Tcof1 acts as a modifier of Pax3 during enteric nervous system development and in the pathogenesis of colonic aganglionosis. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1206–1217 (2013).
67. Bolande, R. The neurocristopathies: unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Hum. Pathol.* **5**, 409–429 (1974).
68. Butler Tjaden, N. E. & Trainor, P. A. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Transl. Res.* **162**, 1–15 (2013).
69. Hotta, R. *et al.* Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon. *J. Clin. Invest.* **123**, 1182–1191 (2013).
70. Burns, A. J. & Thapar, N. Neural stem cell therapies for enteric nervous system disorders. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 1–12 (2013). doi: 10.1038/nrgastro.2013.226
71. Theveneau, E. & Mayor, R. Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev. Biol.* **366**, 34–54 (2012).
72. Southwell, B. R. Staging of intestinal development in the chick embryo. *Anat. Rec. - Part A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **288**, 909–920 (2006).
73. Stanchina, L. *et al.* Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. *Dev. Biol.* **295**, 232–249 (2006).
74. Tse, J. R. & Engler, A. J. Preparation of Hydrogel Substrates with Tunable Mechanical Properties. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **10**, 10.16 (2010).
75. Gobeaux, F. *et al.* Fibrillogenesis in Dense Collagen Solutions: A Physicochemical Study. *J. Mol. Biol.* **376**, 1509–1522 (2008).

Acknowledgements

This work was funded by ANR-12-BSV2-0019 and by the Labex “Who Am I?”. NRC was supported by a Labex “Who Am I?” postdoctoral fellowship. EG was supported by a PhD fellowship from the Ministère de l’éducation nationale, de l’enseignement supérieur et de la Recherche. SD was supported by Centre National de la recherche scientifique (CNRS) and Institut Curie. NB and YW were supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). We would like to thank J. Heysch for technical assistance; I. Grandjean, S. Jannet and S. Boissel from the Mice Facility of Institut Curie, Paris, and Marjorie Coltery from the Transgenic mice facility of IMRB. We thank V. Fraissier, Lucie Sengmanivong and the Nikon Imaging Center@CNRS-Institut Curie and PICT-IBiSA, Institut Curie, Paris, member of the French National Research Infrastructure France-BioImaging (ANR-10-INSB-04).

Author Contributions

N.R.C., E.G., L.B., S.D. and V.F. designed the study; N.R.C., E.G., C.V., E.V., L.B. and V.F. performed the research; L.B., T.G., L.M., S.G., Y.W. and N.B. contributed samples, analytic tools and revised the paper; N.R.C., E.G., S.D. and V.F. analyzed the data; N.R.C. and E.G. wrote the paper. The authors have no conflict of interest to declare.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Chevalier, N.R. *et al.* How Tissue Mechanical Properties Affect Enteric Neural Crest Cell Migration. *Sci. Rep.* **6**, 20927; doi: 10.1038/srep20927 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary information

Supporting information to “How Tissue Mechanical Properties Affect Enteric Neural Crest Cell Migration”

N.R. Chevalier, E. Gazquez, L. Bidault, T. Guilbert, C. Vias, E. Vian, Y. Watanabe, L. Muller, S. Germain, N. Bondurand, S. Dufour, V. Fleury

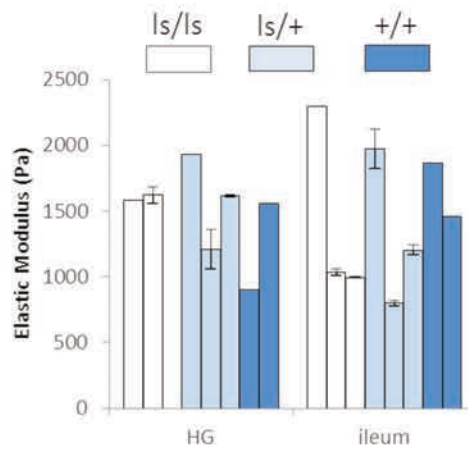


Figure S1: Elastic modulus obtained from tensile testing of the guts of *ls/ls*, *ls/+* and *+/+* from two different litters of E12.5 mice, at the start of hindgut invasion by ENCCs. For each gut, modulus in the hindgut (HG) and ileum were extracted; in one case (missing bar), the segment deformation could not be reliably computed. Error bars are SEM of 2-3 successive tensile tests, and are not indicated when only one test was performed. Average stiffnesses \pm SD for the *ls/ls*, *ls/+* and *+/+* genotypes are: 1603 ± 26 Pa ($n=2$), 1587 ± 361 Pa ($n=3$), 1357 ± 465 Pa ($n=2$) for the hindgut and 1665 ± 890 Pa ($n=3$), 1325 ± 595 Pa ($n=3$), 1508 ± 285 Pa ($n=2$).

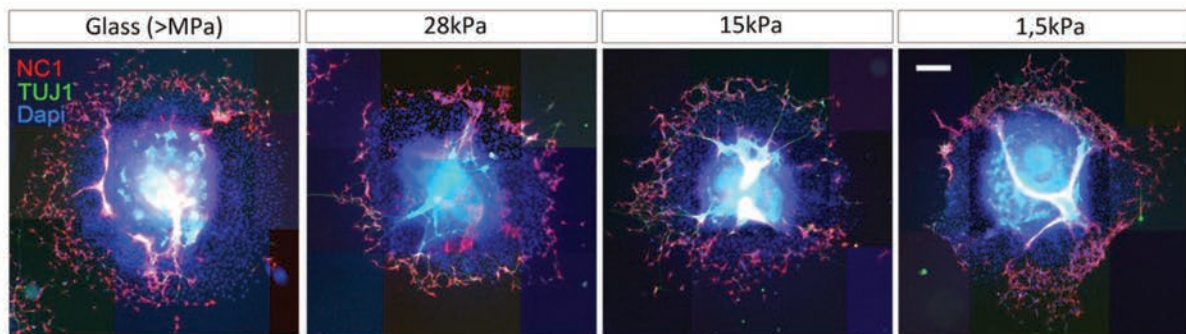


Figure S2: 2D migration assay of ENCCs on FN-coated substrates. Quail (stage E5,5) explants were cultured overnight on FN-coated glass and FN-coated PDMS substrates of different rigidities. The explants were immunostained for NCC marker (NC1, red), neuronal marker of ENCC (TUJ1, green), and Dapi (nucleus, blue). The number of explants analyzed for glass substrate, 28kPa and 15kPa is $n=8$ for each conditions and for 1,5kPa, $n=7$. Bar= $200\mu\text{m}$.

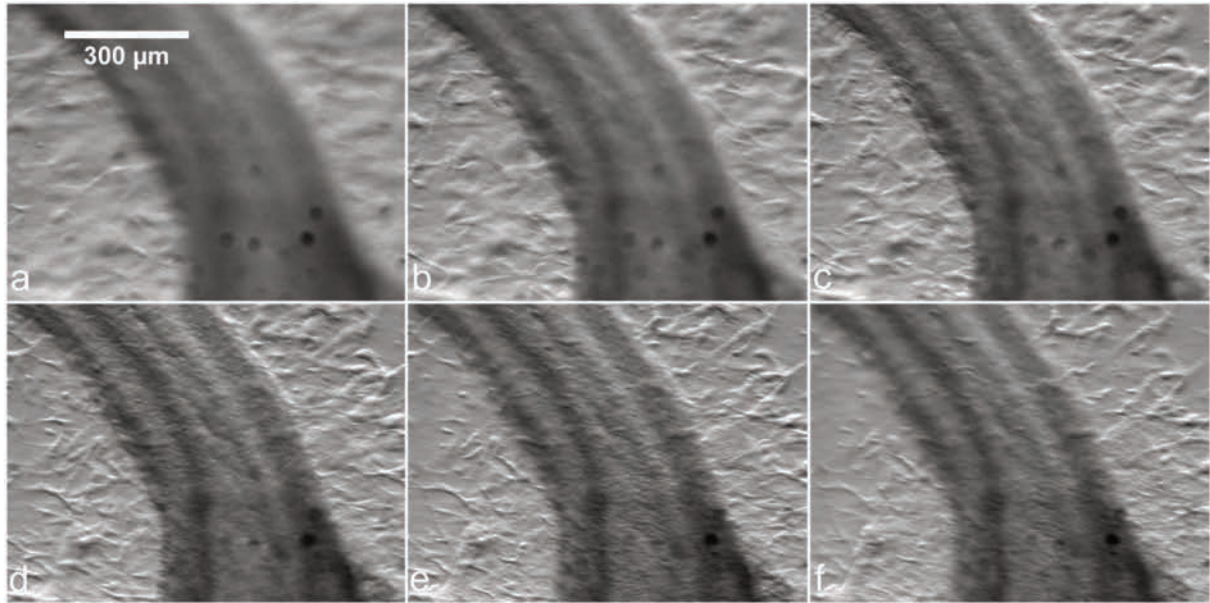


Figure S3 : High magnification view at different focal positions (a to f : below to above the gut) of the midgut of a E5.5 gut embedded in a 660 Pa gel, supplied with DMEM and 10 ng/mL GDNF, after 48H culture. ENCCs are distinctly seen below (a-b), in the plane of (c,d) and above the gut (e-f).

Movie 1

Accelerated (x3060) time-lapse of 17 h of a 1 image/minute time-lapse movie of the ileum of a HH28 chick gut incubated at 37.5°C on an inverted microscope. Time is counted from the moment the gut was imaged, i.e., approximately ~30min after embedding it in a 660 Pa gel supplied with DMEM and 10 ng/mL GDNF. The dark tubular segment is the post-umbilical midgut (ileum); the umbilicus is seen in the lower left corner while the upper right corner features a caecal appendix.

Movie 2

Accelerated (x8743) time-lapse performed for 12 h on a HH28 gut, 7 h after it was embedded in the softest collagen gel ($E=150$ Pa), at 10 ng/mL GDNF concentration and incubated at 37.5°C. Field size is 4.34 x 2.91 mm. The gut is imaged with a standard binocular in transmitted light but the mirror was set so it was illuminated in twilight: small thickness / refraction index differences such as those induced by the migrating ENCCs are thus revealed. Only the proximal hindgut is in focus.

The movie shows several interesting features of ENCC migration:

1. The more distal the ENCCs area located, the earlier they leave the gut, giving rise to the characteristic pear-shaped halo described in the main text.
2. No ENCCs migrate through the hindgut wall, however they are seen to exit through the cloaca (where the organ was sectioned from the embryo body)
3. Several bubbles were accidentally included in the gel upon gelation and get filled with liquid DMEM. These take the forms of circles, 5 of which are in contact with the gut (stomach-duodenum junction, duodenum, umbilicus, 2x HG). It is distinctly seen that the ENCCs travel faster in these collagen free regions and that they also pull on these defects and resorb them (especially visible on the defect close to the stomach), i.e., they remodel the gel matrix.

4. The fact that the ENCCs pull on the gel to migrate can also be evidenced by observing that impurities in the gel surrounding the gut are pulled towards the gut as the ENCCs progress. PIV tracking of the displacements of these impurities over a 1000 min period is shown on Figure S5.
5. Single “pioneer” cells or protrusions, that seems to explore the surroundings ahead of the ENCC migratory front are distinctly seen when zooming in the preumbilical gut region.

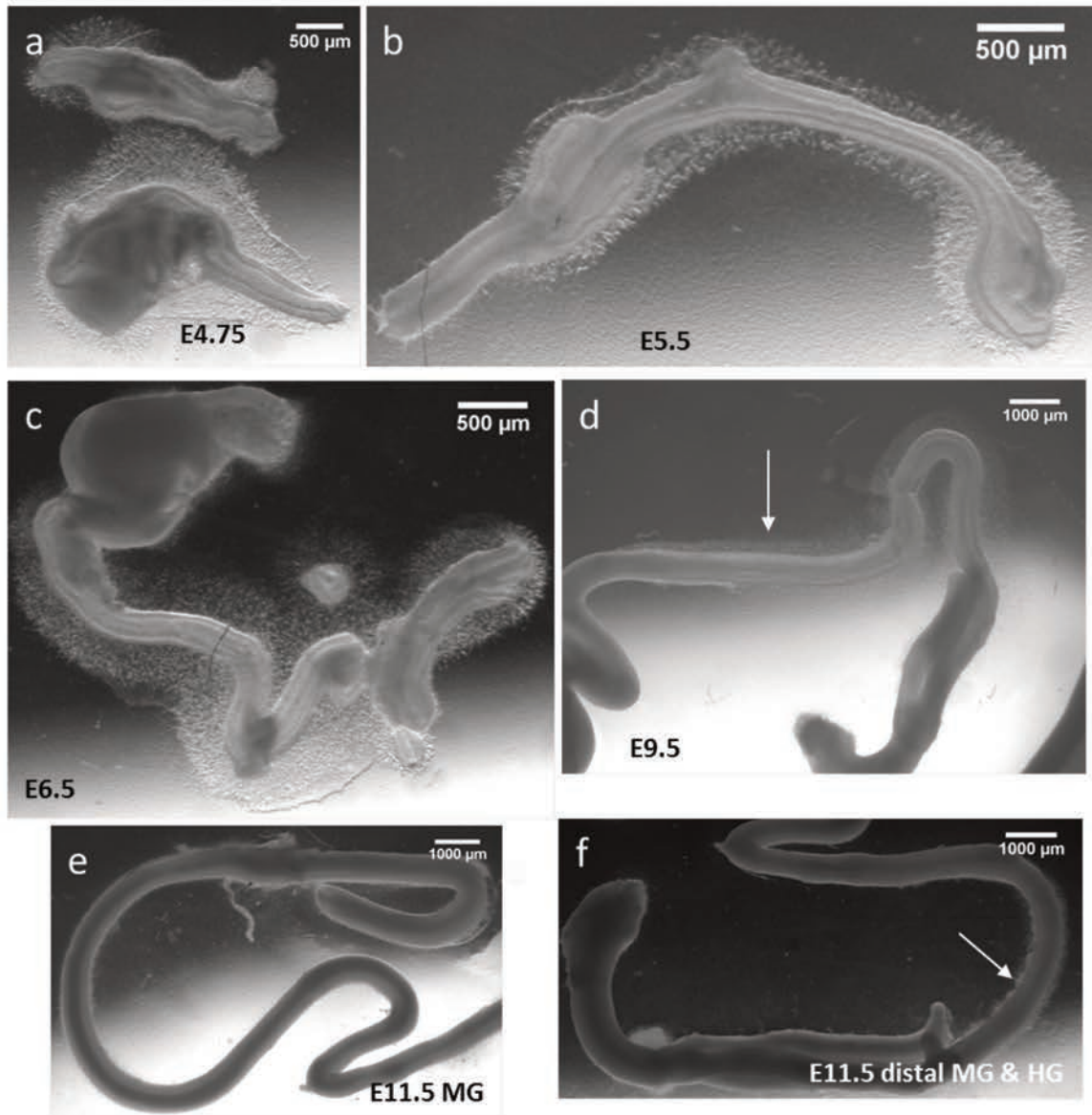


Figure S4: Effect of gut age on ENCC migration after 48h culture. All guts were placed in a 660 Pa gel and supplied with DMEM, final concentration of GDNF in gel & supernatant: 10 ng/mL. ENCCs migrate extensively throughout for 4.75 (a), 5.5 (b) and 6.5 (c) day old guts. At 9.5 days (d), migration still occurs but with a 1 day of delay. The ENCCs are seen to form a cone (white arrow) that extends in the rostro-caudal direction, confirming that the more rostral cells depart later, probably because of a delayed response of these more mature cells to GDNF signaling. For 11.5 day old guts (e-f), migration is strongly delayed and only occurs in a very restricted region of the ileum (white arrow). In all cases, even when the hindgut has been colonized by crest cells (d-f), cells never emerge from the wall of the hindgut. MG: midgut; HG: Hindgut.

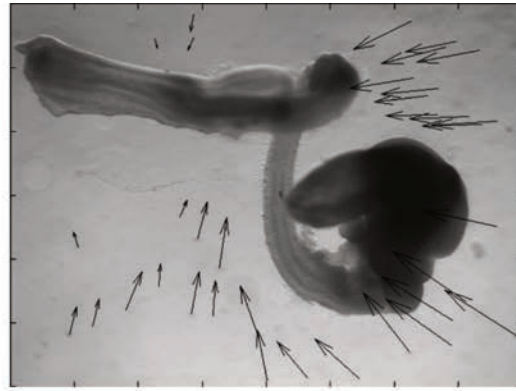


Figure S5 : Displacements of impurities in the gel during migration of ENCCs out of the gut, computed by PIV. The gel is pulled towards the gut as ENCCs migrate out the gut, into the gel.

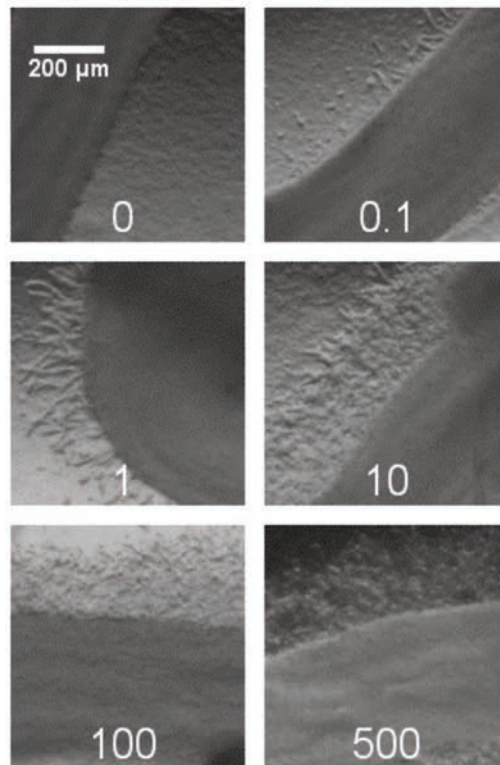


Figure S6 : Effect of GDNF concentration on ENCC migration, in units of ng/mL, for same age E5.5 guts in 660 Pa gels, after 48 h, close-ups around the midgut are shown. Migration distance and the density of the ENCC migratory front increase from 0 to 10 ng/mL, and then saturate above 10 ng/mL.

Gel n°	1	2	3	4	5	6	7
Collagen (mg/mL)	2	4,5	2	4,5	2	2	4,5
pH	6,5	6,5	6,5	6,5	7	8,5	8,5
Gelation T°C	37	37	20	20	20	20	20
Elastic modulus (Pa)	168	543	660	1479	1509	3078	14979

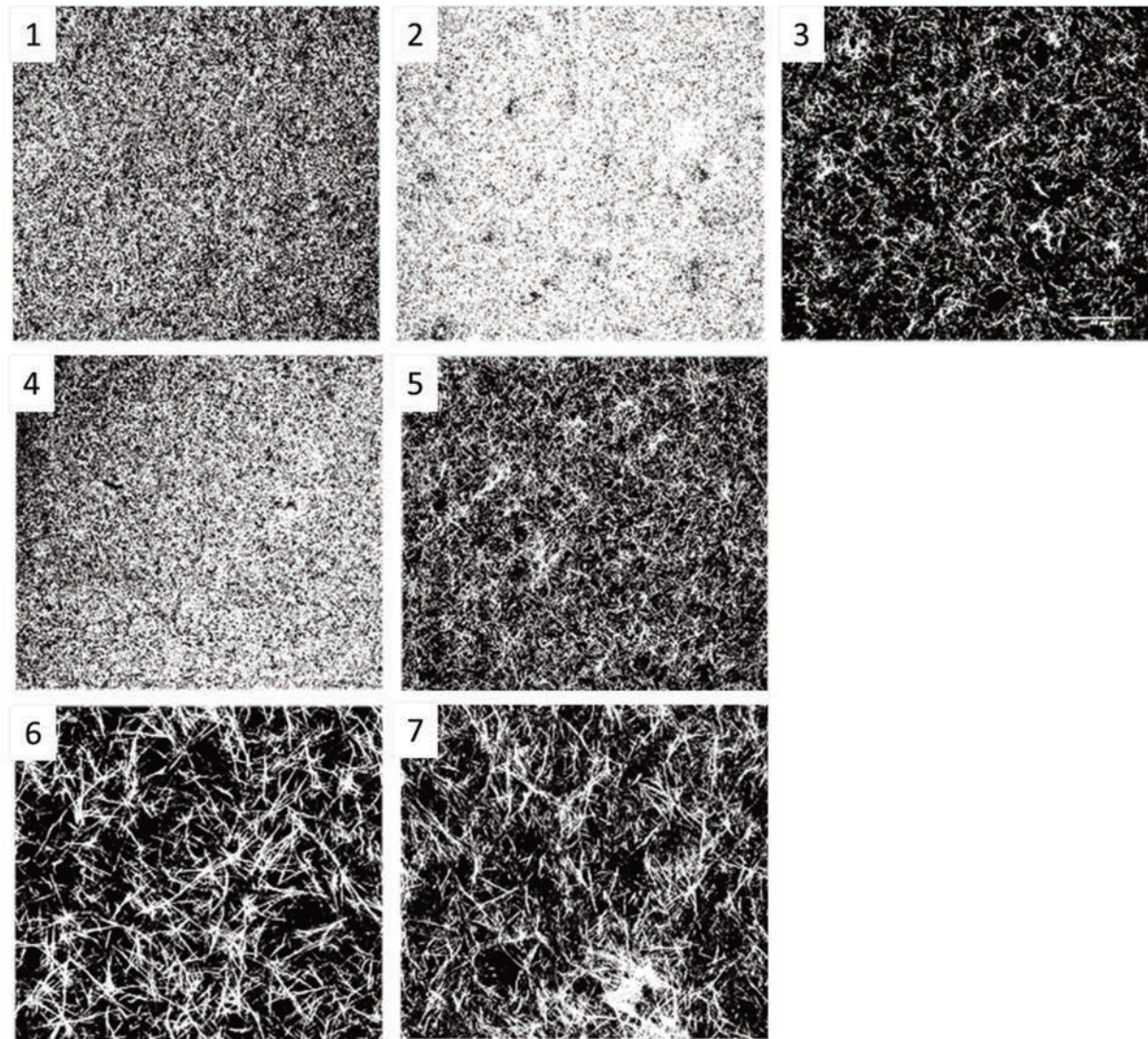


Figure S7: Collagen gels: collagen content, pH and temperature of gelation and resulting elastic moduli of gels and collagen fiber organization as imaged by SHG. The field of view of each image is 295.2 x 295.2 μm .

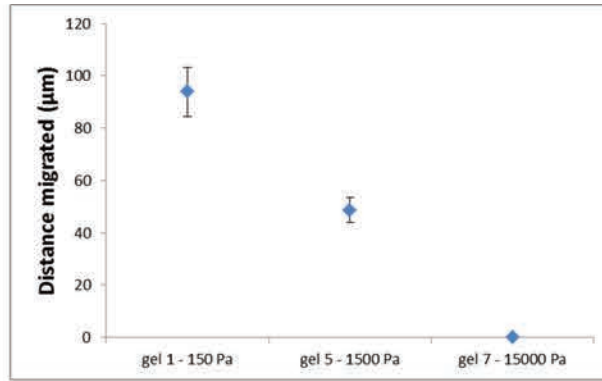


Figure S8: Independent migration assay tested for a subset of gels (gel n°1, 5 and 7) after 20h culture, confirming the trend on the influence of stiffness of Figure 7, main text.

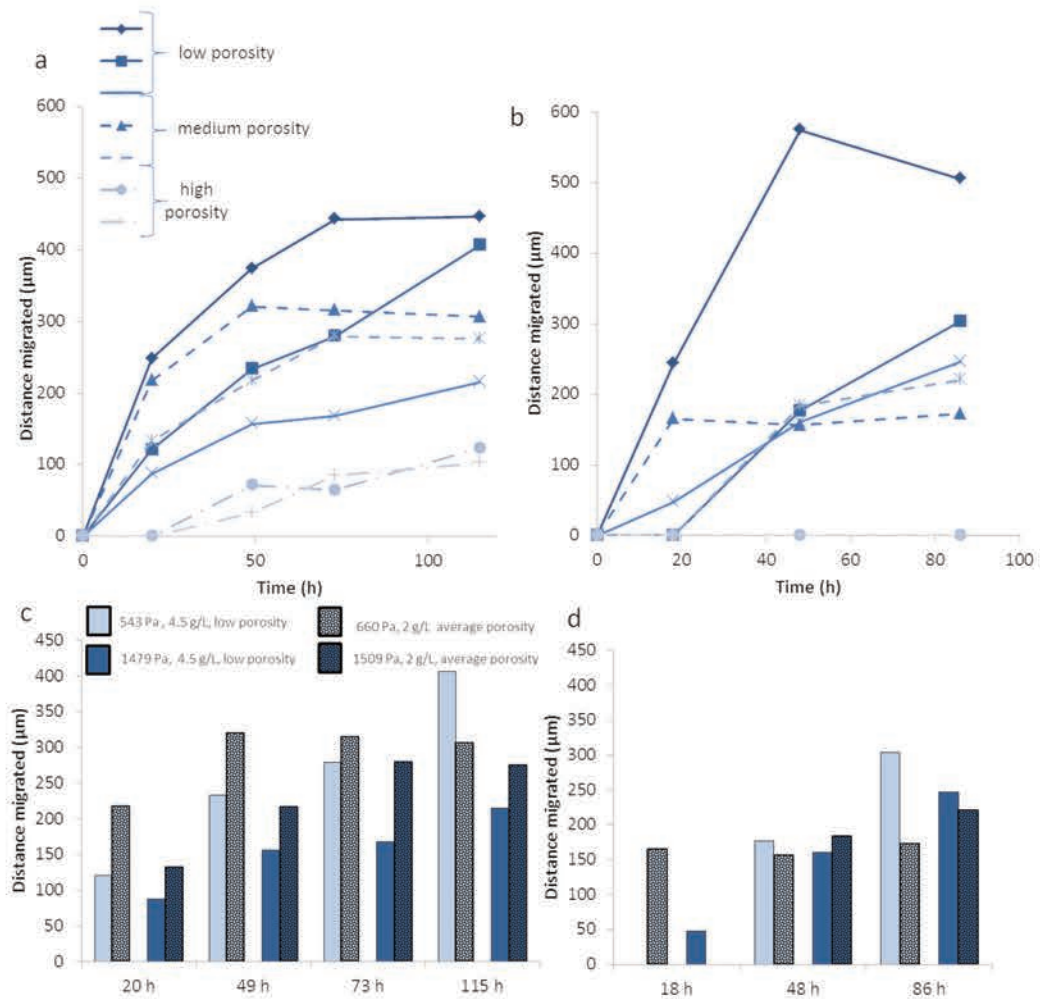


Figure S9: Effect of porosity for all gels (a-b) and plotted as bar histograms only for the two pairs of gels with equal stiffness but differing porosity (c-d). a-b) The gels can be classified in three categories: low porosity (gels 1,2,4 - solid lines), medium porosity (gels 3 & 5, dashed lines), high porosity (gels 6&7, dash-dot lines). Migration distances are plotted versus time for the two experiments performed (a, b). A direct correlation with porosity cannot be established. High porosity alone does not promote ENCC migration (gels 6,7), nor does very low porosity prohibit ENCC migration (gels 1, 2,4).

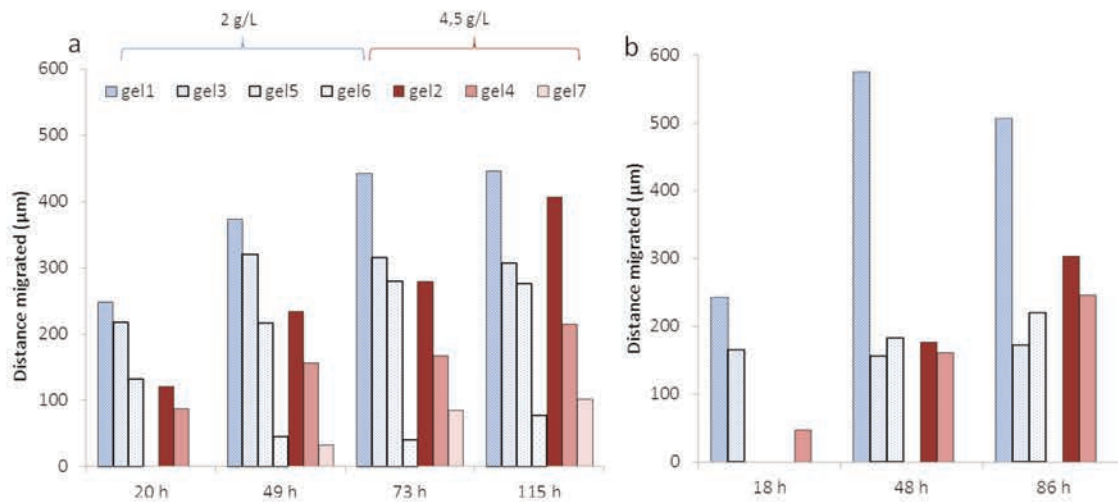


Figure S10: Effect of collagen concentration on migration distance. Two different collagen concentrations were used 2g/L (hashed bars, 4 different gels) and 4.5 g/L (full bars, 3 different gels). For each concentration, the gels are sorted from left to right in order of increasing elastic modulus. For a given concentration, the decreasing migration distance vs. elastic modulus trend is clearly seen.

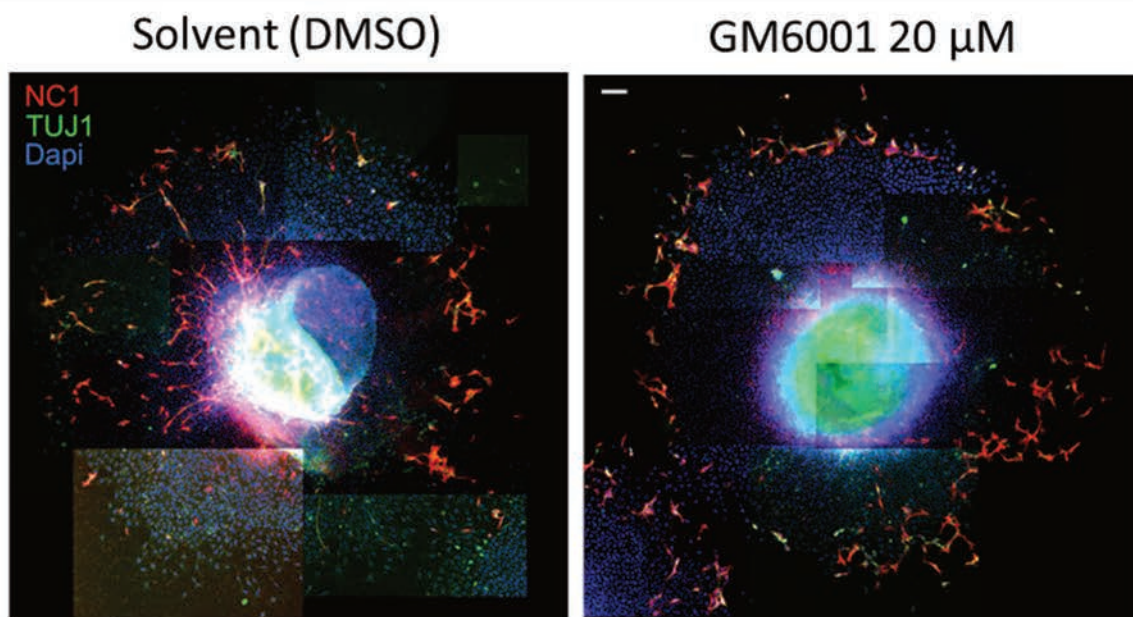
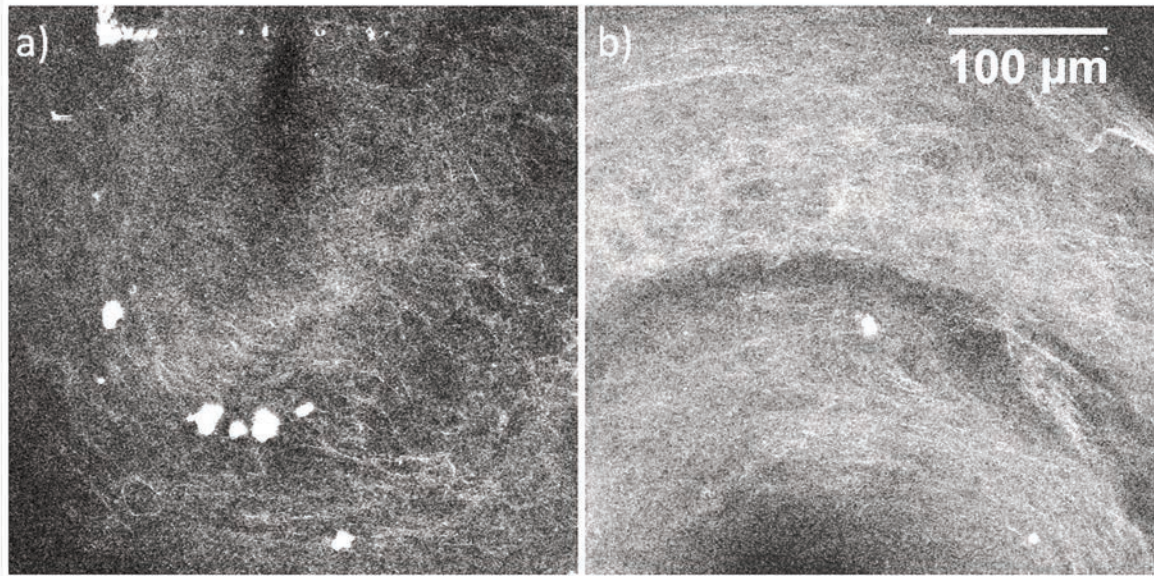
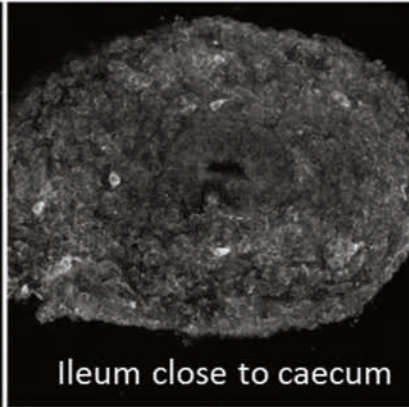
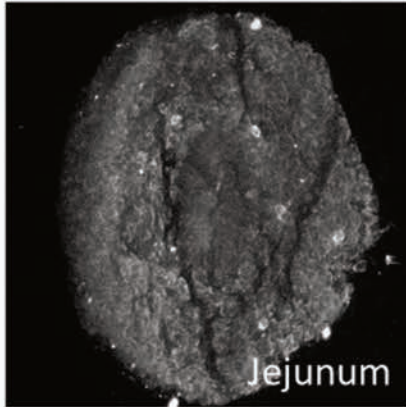


Figure S11: 2D migration assays in the presence of GM6001. E5.5 chick midgut explants were cultured overnight with GM6001 (20 µM) dissolved in DMSO or as a control only with DMSO. Reconstituted pictures of the explants immunostained with NC1 (red), TUJ1 (green) and Dapi (blue) show that GM6001 does not seem to alter ENCC migration in 2D. A similar ENCC outgrowth was present in all conditions (n=4 explants analyzed for each condition). Bar= 100µm

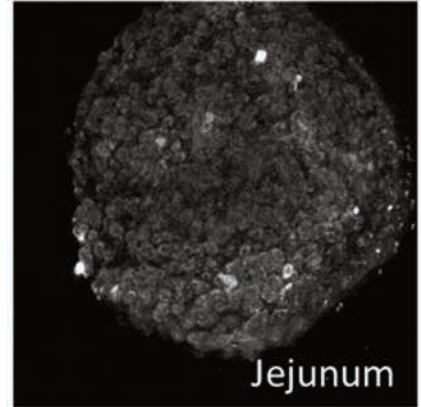


FigureS12 : SHG images on a different batch of eggs of chick hindgut at age a) E6 and b) E8. Acquisition parameters are equal between these two images. The SHG signal intensity increases with age in the hindgut; the fibers also become more organized in concentric rings.

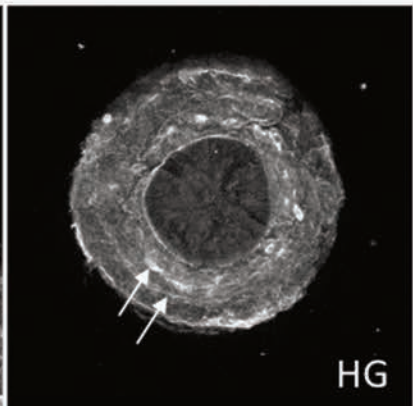
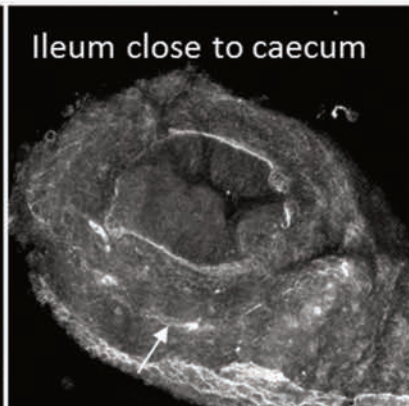
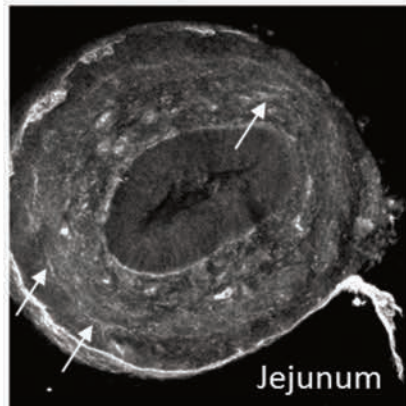
E12.5 *Is/+*



E12.5 *Is/Is*



E14.5 *Is/+*



E14.5 *+/+*

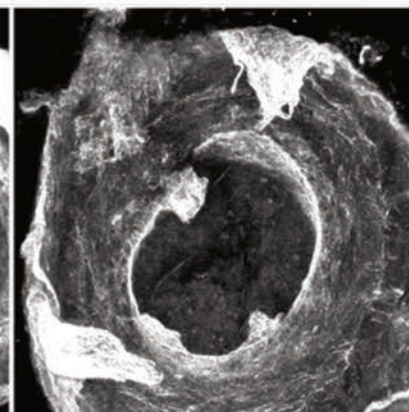
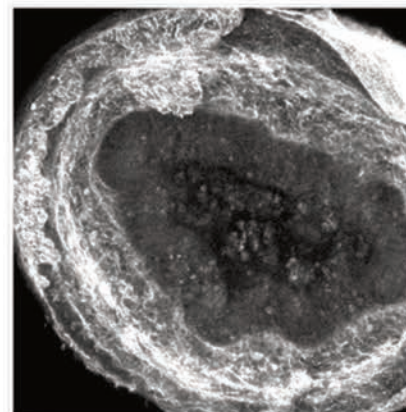
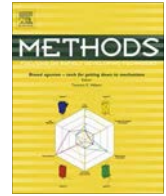


Figure S13: Full data set of mouse gut SHG images at E12.5 and E14.5, the genotype and section position along the rostro-caudal axis is indicated. The images are maximum z-projections of 3 μm -step z-stacks over a total depth of 100 μm from the section surface. All the acquisition parameters of the SHG microscope were kept constant between samples so that SHG signal intensities could be compared across ages and gut regions. White arrows on E14.5 *Is/+* point out circularly arranged collagen fibers which are very distinctly seen on the E14.5 *+/+* sample, but are not present at E12.5.

Article 3



Measuring the micromechanical properties of embryonic tissues



Nicolas R. Chevalier^{a,*}, Elodie Gazguez^{b,c,d,1}, Sylvie Dufour^{b,c,d,1}, Vincent Fleury^a

^aLaboratoire Matière et Systèmes Complexes, Université Paris Diderot/CNRS UMR 7057, 10 rue Alice Domon et Léonie Duquet, 75013 Paris, France

^bUMR144, CNRS-Institut Curie, Paris, France

^cUniversité Pierre et Marie Curie, UPMC, Paris, France

^dUniversité Paris-Est, UPEC, Faculté de Médecine, Créteil, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2015

Received in revised form 21 July 2015

Accepted 4 August 2015

Available online 5 August 2015

Keywords:

Young modulus

Stiffness

Atomic force microscopy

Embryo

Mechanics

Cantilever

ABSTRACT

Local mechanical properties play an important role in directing embryogenesis, both at the cell (differentiation, migration) and tissue level (force transmission, organ formation, morphogenesis). Measuring them is a challenge as embryonic tissues are small (μm to mm) and soft (0.1–10 kPa). We describe here how glass fiber cantilevers can be fabricated, calibrated and used to apply small forces (0.1–10 μN), measure contractile activity and assess the bulk tensile elasticity of embryonic tissue. We outline how pressure (hydrostatic or osmotic) can be applied to embryonic tissue to quantify stiffness anisotropy. These techniques can be assembled at low cost and with a minimal amount of equipment. We then present a protocol to prepare tissue sections for local elasticity and adhesion measurements using the atomic force microscope (AFM). We compare AFM nanoindentation maps of native and formaldehyde fixed embryonic tissue sections and discuss how the local elastic modulus obtained by AFM compares to that obtained with other bulk measurement methods. We illustrate all of the techniques presented on the specific example of the chick embryonic digestive tract, emphasizing technical issues and common pitfalls. The main purpose of this report is to make these micromechanical measurement techniques accessible to a wide community of biologists and biophysicists.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

It is becoming increasingly clear that the mechanical properties of biological tissues at all length scales, from cells to complete organisms, play an important role in determining key developmental events such as differentiation [1], migration [2], and organ [3–5] or body [6–8] formation. It is therefore important to have at hand methods that allow for a precise and quantitative determination of the mechanical properties (stiffness, viscosity, adhesion) of embryonic tissues. Measurements of these properties allow addressing a range of important biological issues, as we now illustrate by a few examples.

- Engler et al. [1,9] demonstrated that mesenchymal stem cells differentiate preferentially to neurons, muscle or bone tissue depending on the stiffness of the substrate on which they are cultured. Durotaxis [10,11], the phenomenon by which cells tend to migrate toward stiffer areas in 2D cultures, has revealed a fundamental mechanism of cell locomotion in mechanically

heterogeneous environments. Extending these findings in vivo will require assessing the mechanical microenvironment of cells in their native environment, the tissue.

- Several diseases including fibrosis [12–14], collagen diseases [15] (e.g. brittle bone disease) or cancer [16] are associated to pathological modifications of normal tissue stiffness [17,18], and linked to the abnormal expression or functioning of extracellular matrix proteins involved in tissue mechanical integrity (e.g., collagen, elastin). Animal models are commonly used to better understand the molecular and cellular basis of these diseases. Characterization of the mechanical properties of these knockout or mutant embryonic tissues will better our understanding of the link between genetic mutation and the resulting pathological phenotype.
- Recent research has unveiled the importance of mechanics in the morphogenesis of organs and body structures. For example, neurulation in the early chick embryo [6], mesoderm specification in the drosophila [8], brain fold formation [19], have all been found to result from the mechanical buckling of tissues sheets. The formation of gut loops [4] has been explained as a mechanical coiling instability induced by internal stresses in a conjunctive tissue, the mesentery. Stiffening of organs and embryonic structures is an essential feature of the

* Corresponding author.

E-mail address: nicolas.chevalier@univ-paris-diderot.fr (N.R. Chevalier).

¹ Present address: INSERM U955, Equipe 6, F-94000 Créteil, France.

morphogenesis of an embryo [20]. All of these investigations have relied on measuring the heterogeneous mechanical properties of tissues or tissue assemblies. The importance of mechanical forces and tissue deformability has long been recognized in the area of plant development [21] and is coming nowadays back to the forefront [22] with the advent of sophisticated characterization methods such as the atomic force microscope (AFM).

- The application of controlled mechanical stresses resembling those experienced *in vivo* during normal embryonic development is a powerful method to understand the link between mechanics and morphogenesis and improve protocols for *ex vivo* tissue and organ culture. It is well-known that culturing muscle strips requires applying a periodic longitudinal stress to the organ [23]. We are only starting to unveil the importance of mechanical stresses in the formation of other structures such as the lung [24], the heart [25] etc. Furthermore, the determination of the inotropic (contractile) effects on tissues (e.g. heart cardiomyocytes, gut smooth muscle) of signaling molecules and peptides such as Ca^{2+} , neurotransmitter agonists and antagonists is important for understanding their role in embryonic development and for regenerative medicine [26].

The main challenges faced by scientists seeking to determine the mechanical properties of embryonic tissues are the small (μm to mm), soft (in the 10^2 – 10^4 Pa range) and visco-elastic (giving rise to time-dependent phenomena) nature of the material. In this paper, we present three different methods. The first two methods – uniaxial tensile testing and inflation – are based on applying tensile stress or pressure using elongated glass fibers or pipettes. They can be assembled at low cost and, although we focus on a particular organ – the embryonic gut –, they can be adapted to a wide variety of different tissue types and geometries. The principle of these methods have been elaborated by others [27,28]. Cantilevers in particular have been applied to a wide range of different biophysical problems like the elastic properties of the arterial wall [29], sarcomere contractility [30], embryonic epithelia [31] and cell monolayers [32]. The goal of this paper is to explain in simple terms how they work and to share our experience of some particular methodological issues: fiber fabrication, calibration, attachment to the embryonic tissue, strain and stress extraction using simple ImageJ plugins. In particular, we present an original and versatile tissue attachment technique using a hook formed at the end of the cantilever fiber. The goal of this report is to make these methods accessible to a wider community of biologists and biophysicists. The last part of this report is devoted to the use of the atomic force microscope to determine the elastic properties of embryonic tissue sections. We present a comprehensive AFM sample preparation protocol and nanoindentation maps on whole embryonic tissue sections. To our knowledge, the AFM maps we present are the first (1°) elasticity maps of native unfixed embryonic tissue, (2°) comparisons of AFM indentation results in formalin fixed and unfixed conditions on whole tissue sections, (3°) comparisons of the elastic modulus deduced by AFM with an independent measurement method, bulk uniaxial tensile testing.

2. Uniaxial tension test

The uniaxial tension test we present can be applied to tissue strips, tubes or more complicated geometries such as blastulas [6]. It is a miniaturized version of the tensile force setups that have been used by physiologists to measure muscle tone and contraction characteristics [33]. Typical forces that must be applied to embryonic organs to measure their linear elastic properties are in the range 0.1–10 μN . It is difficult to find commercially available

force gauges suitable for this force range. Moreover, non-invasive attachment of the embryonic organ to the force gauge remains a major technical issue. Here we show how glass fiber cantilevers can be fabricated and used to both measure force and provide anchoring of the sensor to the embryonic tissue. Deformation is measured from particle image velocimetry analysis of movies of the organ as it is put under increasing mechanical tension. The measurement can be performed in a thermalized bath of culture medium or physiological buffer.

2.1. Fiber fabrication and calibration

The angular sensitivity (angular deflection of the fiber per unit force) of a cylindrical fiber of length L , diameter d and material elastic modulus E scales as $s \propto L^2/2Ed^4$. Maximizing the sensitivity of the fiber therefore requires making them as long and thin as possible. We fabricate such fibers by heating glass Pasteur pipettes with a flame and manually pulling on them. With some training, it is possible to fabricate fibers with very high sensitivities (typically up to $10^\circ/\mu\text{N}$). After pulling, bends can be added to the design of the fiber. As a general rule, the heavier parts of the pipette will be pulled down by gravity when heated, while the lighter ones (e.g. pipette end) will be drawn up by the convection currents of the flame. Fig. 1a shows a small hook that was formed by quickly applying heat with a Bunsen burner flame to the end of the fiber, causing it to curl. The final form of the hook can then be adjusted by cutting with a silicon carbide blade.

After fabrication, the fiber can be calibrated by fastening small weights of known mass at the end of the fiber and measuring the resulting deflection (Fig. 1a). The weights we use are thin pieces of wire. The linear mass λ (g/m) of a long (~ 1 m) piece of wire is first measured with a balance. For very sensitive fibers, we recommend using ultra-fine metal (e.g. copper) wire; thicker plastic or metal wire can be used for less sensitive fibers. We then cut small pieces of length l_i (if necessary measured using a binocular) resulting in a set of masses $m_i = \lambda l_i$. A hook or a stop (small ball of glue or molten glass) at the end of the fiber prevents the weights from slipping off the fiber during calibration. For very sensitive fibers ($s > 1^\circ/\mu\text{N}$), the fiber and weights should be immersed in a liquid to abolish any perturbations from air currents and electrostatic forces. For fiber sensitivities $< 1^\circ/\mu\text{N}$, calibration can be performed in air. Fig. 1b shows a typical calibration curve, we found it to be linear up to at least 30° deflection. Once calibrated, fibers should be stored in a safe environment; they can be used for years if handled carefully.

2.2. Measurement setup

Fig. 1c shows the schematic setup of a uniaxial embryonic tissue tensile test. One should be especially watchful of the following issues:

1. Attachment of the tissue. One end of the tissue can be conveniently immobilized by lining the container bottom with a thin (~ 1 mm) sheet of 1:50 Polydimethylsiloxane (PDMS, Sylgard silicon oil) so that the tissue can be pinned using ultra-fine ($\varnothing = 50 \mu\text{m}$) needles (Euronexia). PDMS is commonly used as a cell-culture substrate and is optically clear, so that the tissue can be illuminated from below. Attachment of the tissue to the cantilever depends on tissue geometry. For tissue strips, or tubes, such as the gut depicted in Fig. 1c–e, we have found that forming a small hook (Fig. 1a) by applying heat at the pipette end allowed for an easy, robust, and minimally invasive way of securing the organ to the fiber. For tissue sheets, at least two points of attachment are required. This can for example be

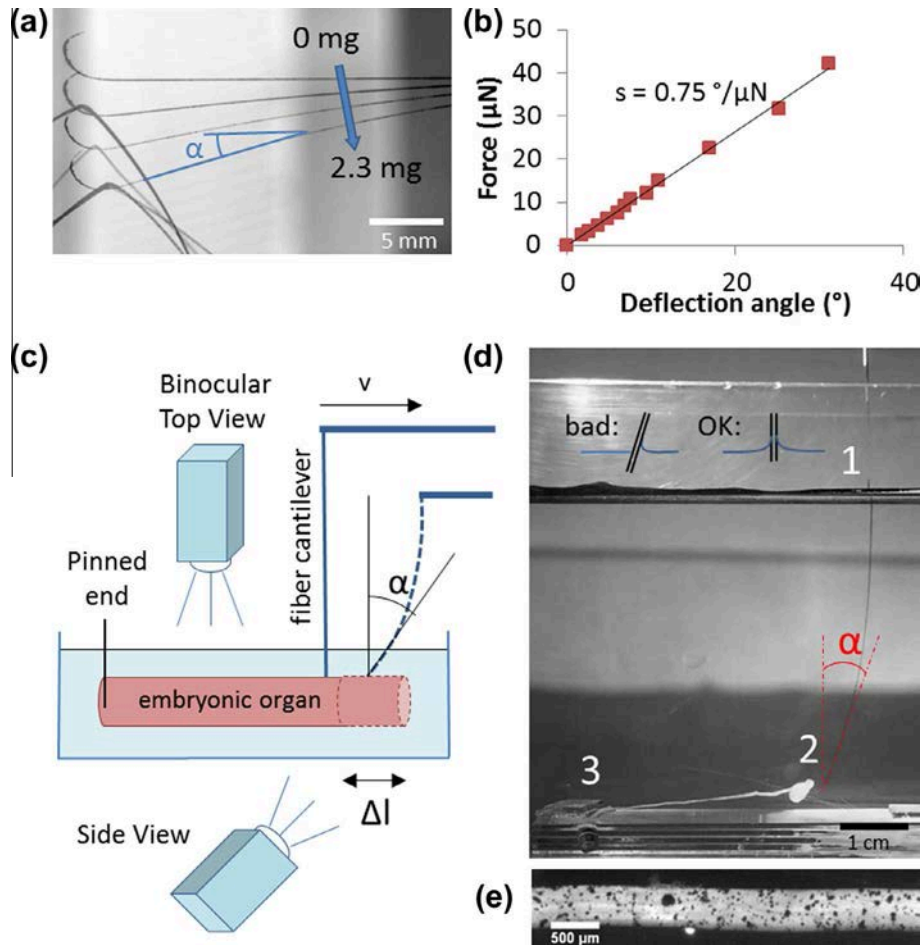


Fig. 1. Fiber cantilever calibration and measurement setup. (a) Four overlaid pictures of the unloaded fiber and after it has been weighted with three increasing weights (wires of increasing length). For each weight, the fiber deflection angle α is measured. The complete fiber is about 10 cm long. (b) The resulting deflection angle vs. applied force calibration curve is linear for small fiber deflection angles (up to 30°); the inverse of the slope gives the sensitivity of the fiber. (c) Scheme of the uniaxial tensile test. The fiber support is pulled at a speed v by a motorized stage. Strain and stress are monitored by the “side view” camera. An additional camera mounted on a binocular can monitor deformation for high resolution strain mapping. Shape of the gut and fiber at rest and after a force α/s , resulting in a deformation Δl is applied, are indicated respectively by full and dotted lines. (d) Side view of a 10-day old embryonic chick gut mounted in the uniaxial traction setup. Medium level in the trough is high so that the fiber always forms a 90° angle with the air–water interface (1), even when loaded. The embryonic stomach (2) provides an anchor in which the hook at the end of the fiber can be inserted. The organ is immobilized at its other end (3) by a glass plate or can be pinned to a Sylgard-lined container. (e) Higher magnification view of an 8-day old embryonic chick midgut sprinkled with carbon particles for Particle Image Velocimetry (PIV) analysis of deformation, as seen with the “top camera”.

achieved by gluing a fine rod (e.g., needle or glass fiber) perpendicularly to the cantilever end. The tissue sheet is then drawn over the two extremities of the rod. Other ways of attaching embryonic tissue include using glue (e.g. Vetbond surgical glue), gels (low melting-point agarose) or electrocauterization. Care should however be taken when applying these methods as they might affect the native mechanical properties of the tissue.

2. Capillary forces. When the fiber cantilever enters the physiological medium – air interface at an angle, torque is generated by capillary forces and bends the fiber (scheme Fig. 1d, “bad”). This torque may modify the apparent sensitivity of the fiber. If the capillary force acts close to the fiber tip (very low medium levels), the deflection angle due to capillary forces can be estimated as $\alpha_{cap} = s\gamma/d\cos^2\theta$, where s is the pipette sensitivity, γ the surface tension of the medium, d the fiber diameter and θ the angle between the fiber and the vertical. This effect can be minimized by (1°) using high water levels, such that the torque exerted by capillary forces has a small lever arm and acts in a region where the fiber is thicker, (2°) making sure the fiber and interface form a close to 90° angle (scheme Fig. 1d, “OK”) when the fiber is at rest. In this configuration, the meniscus is symmetric and no torque is generated. Small deflections of

the fiber–medium angle at the level of the medium–air interface (due to loading of the fiber end) will therefore lead to a minimal amount of capillary torque. Surfactants such as soap can be used to check the influence of capillary forces in a given setup: if the fiber angle/position does not significantly change upon adding soap, capillary forces can be deemed negligible.

The other end of the fiber is secured to a stepper motor (Newport M-UTM linear stage with ESP300 controller) that allows pulling on the tissue with a constant speed v . For an organ of length L , the strain rate is then given by v/L . We used typical speeds $v \approx 50 \mu\text{m/s}$ giving strain rates on the order of 0.1 min^{-1} , at a 1 Hz image sampling frequency. In general, it is necessary to perform measurements at different strain rates and different samples should be compared at the same strain rate. For embryonic gut, we have found that the elastic modulus does not depend on strain rate as long as the latter is higher than the typical viscoelastic relaxation time of the tissue, meaning that the tissue does not significantly relax over the time it takes to perform the tensile test (~ 30 s). It is crucial to let the embryonic organ relax (~ 30 min) and come back to its initial length before and between each tensile test. Under these conditions, we found that elastic modulus variations between successive tensile tests on the same sample were small,

within ± 10 –20% of the average. If no stepper motor is available, the fiber can be translated with the help of a micromanipulator vise rotated manually or via a motor.

A camera (we use a 1600×1200 px Stingray FT-201, Allied Vision Technologies, equipped with a Computar macro lens $\times 0.3$ –1) looking at the setup sidewise monitors fiber deflection over the course of the tensile test. This camera can also be used to monitor organ deformation, as shown in Fig. 2. The elastic properties of the sample can be determined with a high spatial resolution by monitoring strain by using a separate camera mounted on a binocular or a microscope (Fig. 1c, “top view” and representative image in Fig. 1e). When using a separate camera for strain monitoring, it is important for it to be synchronous with the “stress” camera so that stress and strain state of the organ can be unambiguously determined at each time point.

Deformation of the sample can be automatically extracted from a movie granted the tissue has sufficient texture. When monitoring strain at high magnification, the cells of the tissue might provide this texture when illuminated by diffuse (e.g., 90° illumination) or transmitted light. Reflected light should by all means be avoided, as the shimmering reflections of the tissue surface cannot be used to track displacements. At lower magnifications, texture can be enhanced by adding extraneous particles. We have found

ground carbon powder (soot) to be especially convenient for that purpose as the particles are readily dispersed in a physiological buffer, have the required size (~ 1 – $10 \mu\text{m}$), adhere well to the embryonic tissue, and provide excellent contrast. A representative movie from which the stress and strain data in Fig. 2 were extracted is provided as Supplementary material (Movie 1).

2.3. Data analysis

The main steps of the data analysis process are summarized in Fig. 2. We note x_{ij} the x coordinate of point number i in frame number j of a movie. For strain analysis, N regularly spaced points of coordinates $(x_{1,1} \dots x_{N,1})$ in the 1st frame of the movie are selected along the segment of tissue to be analyzed. A Particle Image Velocimetry (PIV) software such as the Tracker plugin ([34], courtesy of O. Cardoso) is used to track the coordinates of these points in the movie. Further data treatment can be handled using a programming environment such as Matlab. The displacement of each point i in frame j relative to the first image in the movie, $\Delta_{ij} = (x_{ij} - x_{i1})$ is first computed. Fig. 2b shows a typical example of the displacement as a function of position along the length of the organ for 6 different frames in a movie. The strain (deformation) in each frame is the slope of the position-displacement curve

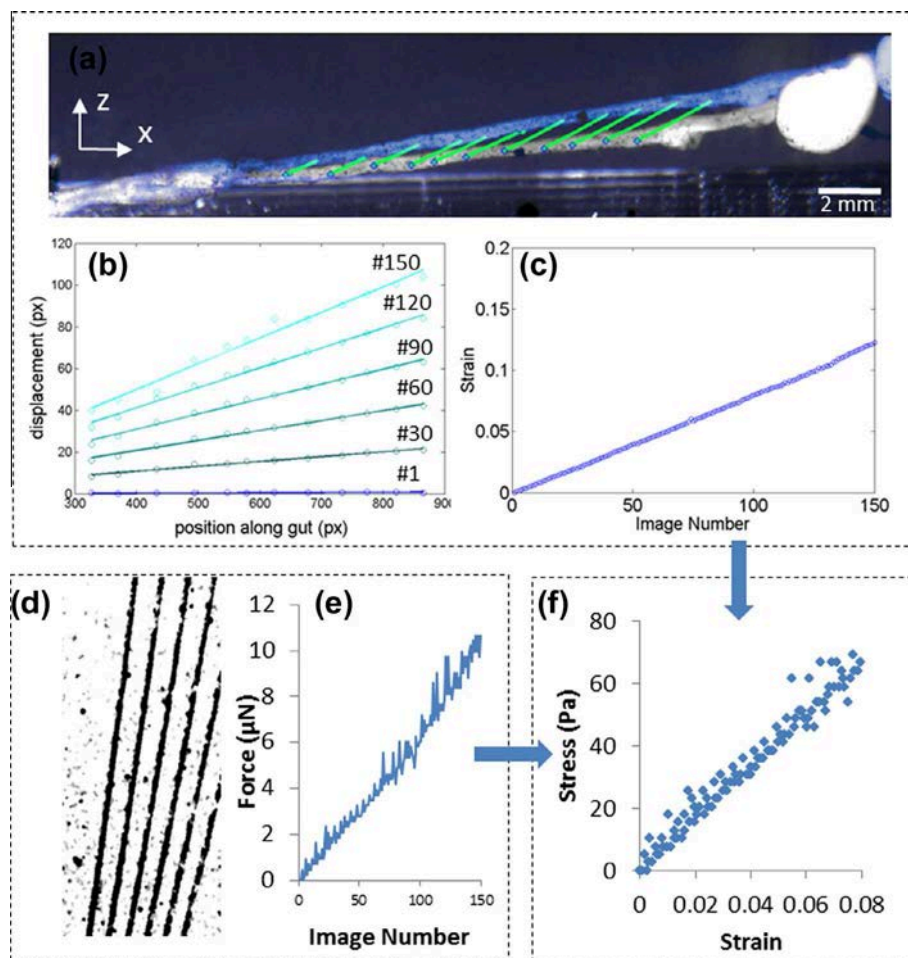


Fig. 2. Strain and stress analysis of a 6.5-day old embryonic midgut. (a) The initial (rest) and final (maximum tension) position of the organ are superimposed in this image, in white and blue respectively. The green lines indicate the trajectories from the rest to the tensed state of points spaced regularly along the length of the organ. The trajectories are automatically computed for the 150 frames of the movie by PIV tracking. As the organ is immobilized at its left end, the displacement increases from left to right. (b) x -component of displacement as a function of the x position along the gut, for the points shown in (a), for frames #1, 30, 60, 90, 120 and 150 in the movie. The slope of each curve is the strain. (c) Strain extracted for all frames in the movie. (d) Overlay of five different fiber positions during tensile test, fiber angle is automatically extracted from the movie by the Hough Linear ([38], courtesy of M. and W. Burge) ImageJ plugin. (e) The resulting force exerted by the fiber can then be computed for all frames in the movie. The stress is the force F divided by the organ cross section A : $\sigma = F/A$. (f) Putting (e) and (c) together, the stress–strain characteristic of the embryonic organ can be plotted, the slope is the elastic modulus.

[35] and can be extracted to yield the strain for all frames in the movie (Fig. 2c). Stress is extracted from a movie of fiber deflection. Fiber angle can be automatically computed by thresholding the movie to extract a line and using the Hough Linear algorithm (Fig. 2d). Since deformations are evaluated relative to the first image in the stack, fiber deflections should also be evaluated relative to the first image, i.e., the force F_j applied in frame j (Fig. 2e) is defined as $F_j = (\alpha_j - \alpha_1)/s$ where s is the fiber sensitivity ($^\circ/N$), and α_j the fiber angle in frame j . The first image does not need to be the zero-stress state; in certain circumstances, it can be useful to apply a small pre-stress to unfold the tissue. The pre-stress should however be kept small if the linear elastic properties of the sample are to be measured. Noise in the force curve (Fig. 2e) is due to the fact that the line representing the fiber is thick (Fig. 2d), causing variations in the output of the Hough linear algorithm: this can be improved by optimizing lighting conditions of the fiber during the tensile test and edge detection and thresholding during processing of the movie. As can be seen in Fig. 2a, the fiber slightly lifts the organ in the z -direction during the extension. As a result the force exerted by the tissue on the fiber does not have a rigorously constant direction (as when applying the weights during the calibration procedure). In our case this z -lift resulted in minor corrections to the applied stress (<5%) but depending on fiber length, applied stress and tissue type, it may be important to correct for this angular deviation either during the measurement (by changing the z -position of the fiber during the extension) or during data analysis. The force applied to the tissue should finally be converted to a stress by dividing by the local tissue cross section A . For the approximately cylindrical midgut of Fig. 2a and since the gut lumina is small, the section is well approximated by $A = \pi r^2$, where r is the gut radius as measured with a high-magnification binocular. In general, as the diameter can be somewhat variable along the length of the segment analyzed, uncertainties on tissue cross section are one of the main contributions to the uncertainty of the final elastic modulus. Once the strain and stress have been determined for all frames in the movie, they can be combined to yield the stress–strain characteristic of the tissue. For biological tissues, the stress–strain plot is usually linear for small strain values; the slope in this region is the linear elastic modulus of the material. Strain stiffening [36] is often observed at higher strains for biological gels or tissues. In a study to determine the evolution of the elasticity of the embryonic gut at different developmental stages [37], we found that the uncertainty on elastic modulus was ± 20 –30%. This uncertainty originates from the determination of gut diameter for segments that are not strictly cylindrical (e.g., the hindgut), whereas it is smaller and dominated by stretch-to-stretch variability for the more straight cylindrical segments (e.g., the jejunum). We found sample-to-sample variability at a given developmental stage to be in the range 10–20%.

3. Quantifying stiffness anisotropy

We have so far only considered tissue elasticity along one direction. Owing to the specific orientation of cells and extracellular matrix, many tissues present anisotropic stiffness properties. In the gut for example, the stiffness along a direction parallel to the gut axis is different from the orthoradial (i.e., along the gut perimeter) stiffness. To probe the orthoradial stiffness, it is necessary to apply a stress perpendicularly to the gut wall. This can be achieved by applying pressure to the lumina of the organ via a cannula, as depicted in Fig. 3a. Granted that the cannula–organ junction and the free end of the organ are both sealed tight, the pressure inside the lumina can be controlled by regulating the height h of a water column, $\Delta P = \rho gh$. For embryonic tissues ($E \sim 1000$ Pa), a few centimeters of water are usually sufficient to induce significant

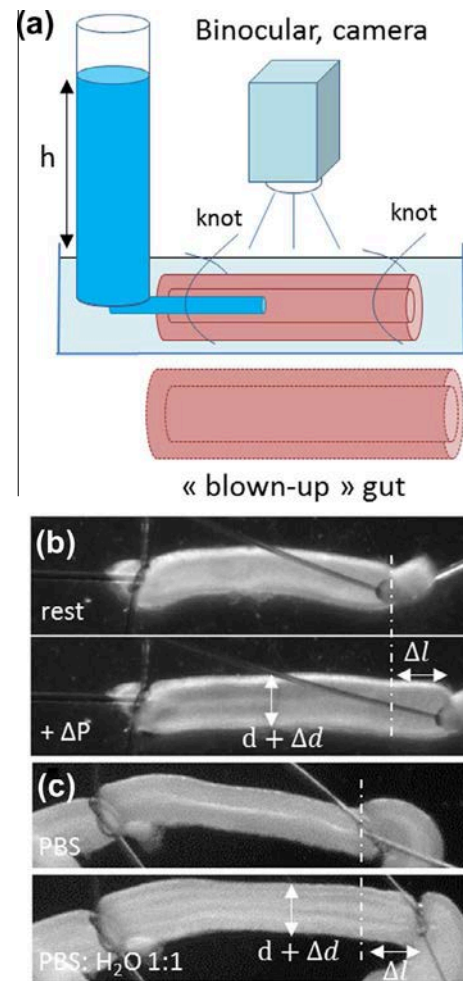


Fig. 3. Applying pressure. (a) Scheme of setup. A cannula (pulled glass pipette) is inserted in the lumina. The cannula–gut junction and the gut are sealed by tying a knot with a thin hair. A column of physiological buffer of height h applies a pressure $\Delta P = \rho gh$. (b) Example of resting (top) and pressurized (bottom) state using the setup described in (a), 8 day old gut. The cannula is seen on the left side. Gut length increases a factor 1.5–2 more than gut radius. (c) An osmotic shock also triggers a pressure increase, in a 7.5-day-old gut. Top: physiological PBS buffer. Bottom: PBS:H₂O 1:1 mixture. As the lumina is only accessible through small openings at the rostral (oesophagus) and caudal (cloaca) end, replacement of the fluid in the lumina by diffusion through these openings is slow and the liquid in the lumina can therefore be assumed to have the tonicity of PBS and/or luminal fluid. Note that the knots shown in this experiment are used here as fiducial markers and are not required for the generation of osmotic pressure in the gut tissue, as segments lying outside of these knots also swelled. As when applying pressure via a cannula, we found that the gut length increased a factor 1.5–2 more than gut radius after placing the organ in PBS:H₂O 1:1.

deformations. We have found that thin hair strands (Fig. 3b) or fine suture thread can be used to tie micron-size knots to seal a segment of gut. We caution that it is in general difficult to ensure complete tightness of the embryonic organ and cannula in this setup. If the longitudinal modulus of an organ has already been determined by the method described in Figs. 1 and 2, it is however possible to determine the orthoradial modulus of an organ by comparing the relative distensions along the longitudinal and radial directions induced by a pressure increase in the lumina, even when the organ is not perfectly sealed tight. This is shown in Fig. 3b, where a pressure increase applied through a column of physiological medium triggers an elongation Δl of the gut length and an increase in diameter Δd . For a pressurized cylindrical vessel of outer radius R , it can be shown [39] that the orthoradial wall tension at the gut outer border $\sigma_\theta(R)$ is two times higher than the wall tension at the

hemispherical end σ_z , i.e., $\sigma_\theta(R) = 2\sigma_z$. Defining the orthoradial and elastic moduli E_θ and E_z , respectively as $E_\theta = \sigma_\theta(R)/(\frac{\Delta d}{d})$ and $E_z = \sigma_z/(\frac{\Delta l}{l})$ the ratio of orthoradial to longitudinal elastic modulus can be deduced from the ratios of deformation: $E_\theta/E_z = 2(\Delta l/l)/(\Delta d/d)$. In Fig. 3b, we experimentally find the elongation $\Delta l/l$ to be a factor 1.5–2 higher than the diameter change $\Delta d/d$, which means that the orthoradial elastic modulus E_θ is a factor 3–4 higher than the longitudinal elastic modulus E_z . This confirms the strong stiffness anisotropy in tubular organs such as the gut. Stretching and inflating are complementary methods as they can be applied successively to yield quantitative values of both E_z and E_θ on the same sample. We finally note that a simpler way of increasing the internal pressure of a tissue is to apply an osmotic shock by placing it in a hypotonic solution. In Fig. 3c a photograph of an embryonic gut is shown in a physiological PBS buffer and after it was placed in a hypotonic PBS:H₂O 1:1 mixture. The gut elongates and increases in diameter. We find the osmotic shock to yield a similar ratio 1.5–2 of elongation over diameter increase than that found by applying hydrostatic pressure to the gut lumina. Changes in osmotic pressure have been previously used to apply pressure to tumor spheroids [40] and also for the mechanical characterization of articular cartilage in free-swelling tests [41]. Osmotic swelling properties may vary according to tissue type [42]. For example, in the case of the gut, the amount and kinetics of swelling of the epithelium most probably differ from those of cells located, say, in the muscularis. Nonetheless, the pressure pattern remains radially symmetric and these differences should not reflect on the ratio E_θ/E_z . In general, we believe that this osmotic pressure approach can easily give access to tissue relative elastic modulus contrasts along different directions when the cells in the sample are sufficiently homogeneous (e.g. isolated epithelium) or symmetric (as in the case of the GI tract).

4. Atomic force microscopy

Biological tissues are composed of different layers. A section of gut for example is organized in concentric sheets, the mucosa (epithelium), submucosa (connective tissue), muscularis (muscle layer) and serosa (outermost layer). The uniaxial tensile test we presented measures the average modulus of these different tissue types. In many instances, it may be desirable to measure the elastic properties of a particular tissue layer. In adult artery biomechanics, this is achieved by isolating each tissue layer and measuring their elastic properties separately. As dissociation of embryonic tissues is generally difficult, an alternative method consists in reducing the size of the probe and measure the mechanical properties of embryonic tissue cross sections. This can be achieved by nano-indenting the tissue using an atomic force microscope. Atomic force microscopy has been used extensively to measure stiffness of substrates for cell culture [43] and the stiffness properties of individual cells [44]. Studies pertaining to whole native tissues are however more rare: they concern mainly bones [45], cartilages [46] or arteries [47,48] and usually feature only topographical data; elastic modulus properties have only been studied in a few cases [47,49]. The topography of live embryonic tissue has recently been studied with the AFM [50]. One recent study has used the AFM to measure mechanical properties of blastulas at gastrulation stage [51], but to the best of our knowledge we present here the first elastography maps of live embryonic tissue.

4.1. Sample preparation

One of the key issues in AFM imaging and nano-indentation is to properly and non-invasively hold the sample in order for it

not to be dragged along by the cantilever tip during scanning. Agarose gel has been used to embed plant samples and embryonic tissues for AFM studies [22,50]. Other sample holding techniques have been reported [48]. We have used agarose gel and found it appropriate to (1°) keep the tissue in a hydrated state, (2°) mechanically immobilize it, (3°) provide support to perform tissue sections with a surface smooth enough for the AFM, (4°) fix the tissue with formaldehyde after the AFM scan and perform immunohistochemistry. We use low-melting point agarose (Type VIIA, Sigma) solutions in PBS at 3% w/w. After boiling, we cool the agarose solution down back to 37 °C by placing it in a heated water bath. Any evaporation losses should be corrected by adding distilled water to guarantee iso-osmotic conditions. At this point the agarose is poured in a small Petri dish ($\varnothing = 40$ mm) and the embryonic organ is transferred with a minimal amount of physiological buffer to the liquid agarose. The agarose is then further cooled to 20 °C, the embryonic tissue is kept positioned in the bulk of the gel with the help of tweezers. It is important not to perturb the gel in the few tens of seconds before it gels, as this can significantly reduce gel mechanical integrity and compromise proper sample holding. Complete solidification of the gel takes about ~30 min and can be monitored by measuring the light diffused by the gel in a time-lapse movie. After the gel solidifies, sections can be performed using either a vibratome, or a double-bladed cutter. We found it convenient to fabricate our own double-bladed knife by gluing two razor blades (Gillette) to a spacer. The thickness of the spacer and of the blades (typically ~100 μm each) defines the total thickness of the slices. Section thickness should be a factor ~10–100 higher than the maximum AFM indentation depth (typically a few μm) to ensure that only the elasticity of the tissue is probed and not that of the underlying substrate. We used 1 mm thick slices. It is important that the two section planes be parallel so that the section is as horizontal as possible for AFM scanning. The slices can then be glued to Petri dish bottoms using liquid low-melting point agarose as a glue. Vetbond glue can also be used but may lead to difficulties in viewing the sample in transmitted light as it becomes white when reticulated. Using thick samples is useful to help making sure that no Vetbond or agarose comes into contact with the surface to be analyzed. The sample should be submerged in PBS just after gluing to the Petri dish bottom. It can now be transferred to the AFM stage and the AFM tip can be submerged. It is again appropriate to check with a time-lapse movie at high magnification that a stationary state is reached where the tissue sample remains immobile over the time it takes to perform a scan (typically 1–30 min depending on resolution), as slight temperature variations may cause the gel to swell or contract and the tissue sample to be displaced.

4.2. Scanning

As embryonic tissues are notoriously soft [52], very low bending stiffness cantilevers must be used to maximize signal to noise ratio. We used $k_{\text{measured}} \sim 60$ mN/m ($k_{\text{announced}} = 30$ nN/m) rectangular silicon cantilevers (Novascan) functionalized with a 10 μm borosilicate glass beads. A 1 nN maximal indentation force yielded typical indentation depths of 0.5–3 μm for live embryonic tissue and about 0.1–0.5 μm for formaldehyde fixed tissue. These values are appropriate as they are below the radius of the indenter (5 μm). We typically use indentations speeds of up to 50 $\mu\text{m/s}$. Resulting strain rates for each indentation are on the order of 10^3 min^{-1} , much higher than those used for the tensile test. As the apparent elastic modulus of cells [53] can vary with indentation speed, it is important when comparing different samples to keep a constant indentation speed. The AFM we use is a JPK Nanowizard I equipped

with the CellHesion platform, which allows for a 100 μm -displacement amplitude of the tip along the z-axis during a scan. We found this latter feature to be essential as it made it possible to scan large areas (100 \times 100 μm) without exiting the z-scan range. The total number of indentations in a scan, z-travel length and indentation speed along the z-axis determine the total duration of a scan. As we found unfixed tissue samples to present altered mechanical properties \sim 6 h after dissection, it is important to choose a combination of these parameters that allows to retrieve the required information in a timely manner.

4.3. Analysis

In Fig. 4a, we show one example of a tissue section overlaid with 3 elasticity maps obtained by AFM indentation. Elasticity was deduced by fitting the force-indentation depth curves using the Hertz model. The concentric ring organization of the different gut layers can readily be distinguished in the elasticity maps. We found the epithelium (innermost region) to be the stiffest region, followed by the muscularis (outermost region) while the submucosa, which is located between the epithelium and muscularis is softest. AFM elastic moduli increased with developmental stage from E4 to E8 [37]. Similar developmental stiffening was observed for chick embryonic hearts [20]. The AFM elastic moduli we find are in the range 10–200 Pa, in line with AFM measurements performed on chicken embryo blastula explants at gastrulation stage [51]. It is also comparable to the elastic modulus of cultured leukocytes [54] or neurons [55], but much softer than many other cell types [56] like fibroblasts (0.6–12 kPa) or endothelial cells (0.2–18 kPa). Comparisons between AFM results obtained on 2D cultured cells with our tissue-scale measurement are not straightforward. The embryonic tissue we consider is composed of cells and extra-cellular matrix (ECM) and the cells in the not yet fully differentiated mesenchyme of the gut are not densely packed. After performing live tissue sections, we therefore probe the properties of cells and of the surrounding ECM. Moreover, as the cantilever bead is lowered on the tissue, cells can be displaced, rather than being compressed. This situation is different from most AFM studies performed on 2D cultured adherent cells [56], where there is less or no ECM, where cantilever tip radii are usually much lower (typically \sim 100 nm) and where adherence of the cell to the substrate bottom reduces the overall displacement of the cell during indentation. The fact that we find higher elastic moduli in the epithelium than in the mesenchyme lends support to this explanation: the cells in the epithelium are more difficult to displace as they are bound together by tight junctions and anchored to the basal lamina. Finally, performing the transverse section also disrupts the surface mechanical properties of the gut by damaging cells and sectioning of fibers and cell–cell connections. To assess the amount of cell death, we used Trypan blue staining. This dye is rapidly excluded by living cells but stays inside the cytoplasm of dead cells, coloring them blue. We detected the presence of stained (dead) cells at the sample surface (Fig. 4d). Epithelial cells were never stained and staining was also reduced in the region of the muscularis. In spite of this unavoidable damage (the organ has to be dissected and sliced open to perform AFM inside the tissue), the protocol we describe gives access to non-trivial information concerning the relative elastic modulus variations at different developmental stages [37], and for different histological regions within one tissue section (Fig. 4).

The elastic modulus values deduced from AFM indentation are also almost an order of magnitude lower than the values deduced from uniaxial tensile testing, (typically AFM: \sim 20–200 Pa, tensile testing: \sim 200–1000 Pa). In addition to the surface damage discussed above, we believe another possible explanation of this discrepancy could be due to the fact that the tensile test measures the

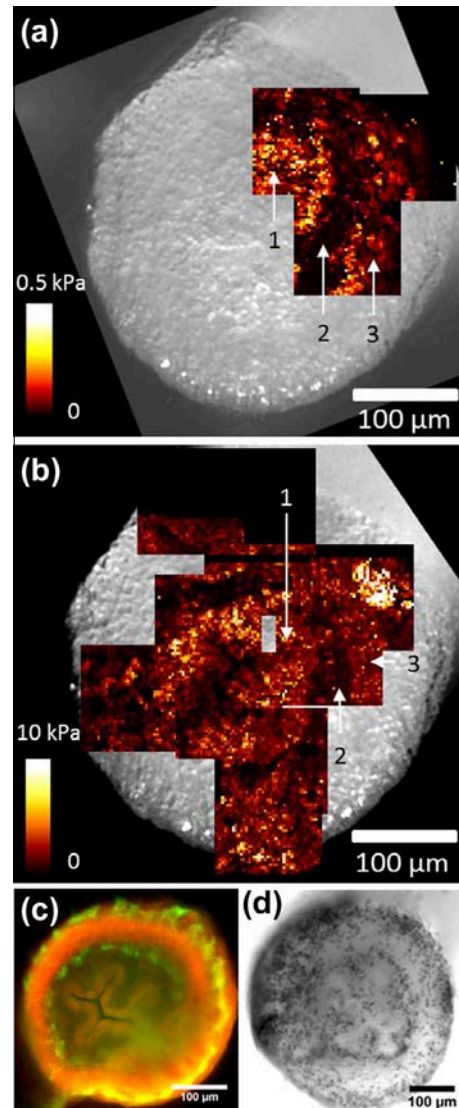


Fig. 4. Atomic force microscopy maps of an 8-day old embryonic midgut, embedded in a 3% agarose gel. (a) Three elastic modulus maps obtained within 3 h after dissection, overlaid on a microscopy image. Dark/light pixels correspond to soft/hard regions respectively. The concentric organization of the gut layers is apparent in the modulus maps: the mucosa (1, it comprises the epithelium) and muscularis (3) are stiff and separated by a softer region, the submucosa (2). Elastic modulus values are very low: 0–0.5 kPa. Acquisition parameters are: 1 nN indentation force, 50 $\mu\text{m}/\text{s}$ indentation speed, 10 μm indentation bead diameter, scan size 100 \times 100 μm , 40 \times 40 pixels. (b) Elastic modulus maps of the same section after it was fixed with formaldehyde (room temperature, 2 h). The elasticity contrasts of the three concentric regions are preserved, but the absolute elastic modulus range is a factor 20 higher: 0–10 kPa. Acquisition parameters are the same as in (a). (c) Fixed agarose sections can be immuno-labeled for smooth muscle (red, anti- α smooth muscle actin antibody, Abcam ab5694) and enteric neurons (green, TUJ1 antibody, Abcam ab14545) and the resulting images put in registry with AFM elastic modulus or adhesion maps. The peripheral ring of neurons and smooth muscle are part of the muscularis; the inner ring of neurons is in the submucosa; epithelium surrounding the lumina can also be readily distinguished. (d) Representative Trypan blue (Life Technologies) staining of freshly cut sections of E9 gut.

section-averaged tensile modulus while the AFM measures the local compressive modulus: longitudinal fibrous structures (e.g. collagen, elastin) which are in a tensile state in the traction assay likely contribute less to the elasticity of the organ than when under compression (AFM).

To obtain the mean elastic modulus of a particular region, it is possible to average over particular regions of each stiffness map. For example the mean elastic modulus of the mucosa (white arrow

1 in Fig. 4a) of the freshly dissected tissue is 112 ± 82 Pa, where the uncertainty is the mean roughness, which gives a good description of elastic modulus variations of the surface. For the submucosa (white arrow 2 in Fig. 4a), we find 22 ± 9 Pa. Fig. 4b shows 12 elastic moduli maps of the same tissue section after it was formaldehyde fixed for 2 h. The same general contrasts of elasticity between epithelium (mucosa), muscularis and submucosa are found after fixation, but average elastic moduli were found to be a factor ~ 25 higher after fixation. A similar stiffening (factor 40) was measured on single cells after treatment with glutaraldehyde [57]. Fig. 4c finally shows that thick agarose gel tissue sections can be treated by immunohistochemistry (IHC) either before or after nano-indentation to reveal the important cell types and histological layers within the sample. An important potential of the technique we present is therefore its ability to make cross-correlations between AFM elasticity maps and histological data. In agreement with other investigators [50], we found that AFM scanning was easier after formaldehyde fixation, as the higher elastic modulus resulted in smoother indentation curves and the tissue remains stable over the course of the measurement. Our measurements show that the same qualitative elasticity contrasts between muscularis, mucosa and submucosa are conserved before and after fixation of the tissue with PFA. We note that the AFM can also be used to retrieve local adhesion (force required to detach the indenter bead upon retraction from a particular tissue region) maps and cross-correlate them with histological data.

5. Conclusion

We have presented how μN forces can be applied using a fiber cantilever or a pressurization cannula, and how the resulting deformation can be read out to extract the elastic properties of embryonic tissue. The atomic force microscope (AFM) can be used to extract elasticity and adhesion maps of embryonic tissue sections at a μm scale. We have described an AFM sample preparation protocol, assessed the effects of formaldehyde fixation on elasticity maps and compared the Young moduli obtained by AFM with those obtained from other bulk measurement techniques.

These micromechanical techniques make it possible to determine the evolution of tissue elastic properties over the course of embryonic development, measure viscoelastic properties of tissue [58], determine quantitatively mechanical disruptions in normal and pathological conditions, investigate correlations between cell mechanical environment and cell migration and differentiation behavior, determine the contributions of specific molecules to elasticity by selectively removing them using enzymes (e.g. collagenase or elastase [59]), assess the contractile force (inotropic effect) generated by molecules on embryonic organs and finally apply controlled forces over long time periods to tissues and organs in culture to evaluate their impact on biological processes.

6. Ethics

Experiments were performed in accordance with the ethical guidelines of the INSERM and CNRS. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was funded by ANR-12-BSV2-0019 ENSINTED and by the Labex “Who Am I?”. NRC was supported by a Labex “Who Am I?” postdoctoral fellowship. E.G. was supported by a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement et de la Recherche.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.08.001>.

References

- [1] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, *Cell* 126 (2006) 677.
- [2] J.R. Lange, B. Fabry, *Exp. Cell Res.* 319 (2013) 2418.
- [3] A.E. Shyer, T. Tallinen, N.L. Nerurkar, Z. Wei, E.S. Gil, D.L. Kaplan, C.J. Tabin, L. Mahadevan, *Science* 342 (2013) 212.
- [4] T. Savin, N.A. Kurpios, A.E. Shyer, P. Florescu, H. Liang, L. Mahadevan, C.J. Tabin, *Nature* 476 (2011) 57.
- [5] N. Desprat, W. Supatto, P.A. Pouille, E. Beaufort, E. Farge, *Dev. Cell* 15 (2008) 470.
- [6] V. Fleury, N.R. Chevalier, F. Furfaro, J.L. Duband, *Eur. Phys. J. E* (2015).
- [7] E. Farge, *Curr. Top. Dev. Biol.* 95 (2011) 243.
- [8] T. Brunet, A. Bouclet, P. Ahmadi, D. Mitrossilis, B. Driquez, A.-C. Brunet, L. Henry, F. Serman, G. Béalle, C. Ménager, F. Dumas-Bouchiat, D. Givord, C. Yanicostas, D. Le-Roy, N.M. Dempsey, A. Plessis, E. Farge, *Nat. Commun.* 4 (2013) 2821.
- [9] J.R. Tse, A.J. Engler, *PLoS One* 6 (2011) e15978.
- [10] C.-M. Lo, H.-B. Wang, M. Dembo, Y. Wang, *Biophys. J.* 79 (2000) 144.
- [11] L.G. Vincent, Y.S. Choi, B. Alonso-Latorre, J.C. del Alamo, A.J. Engler, *Biotechnol. J.* 8 (2013) 472.
- [12] P.C. Georges, J.-J. Hui, Z. Gombos, M.E. McCormick, A.Y. Wang, M. Uemura, R. Mick, P.A. Janmey, E.E. Furth, R.G. Wells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293 (2007) G1147.
- [13] R.L. Lieber, S.R. Ward, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 305 (2013) C241.
- [14] W. Carver, E.C. Goldsmith, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013).
- [15] H. Kuivaniemi, G. Tromp, D.J. Prockop, *FASEB J.* 5 (1991) 2052.
- [16] C.T. Mierke, *Prog. Phys. Phys.* 77 (2014) 076602.
- [17] P.A. Janmey, R.T. Miller, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 9.
- [18] P.A. Janmey, R.G. Wells, R.K. Assoian, C.A. McCulloch, *Differentiation* 86 (2013) 112.
- [19] P.V. Bayly, R.J. Okamoto, G. Xu, Y. Shi, *Phys. Biol.* 10 (2013) 016005.
- [20] S. Majkut, T. Idema, J. Swift, C. Krieger, A. Liu, D.E. Discher, *Curr. Biol.* 23 (2013) 2434.
- [21] B. Moulia, *J. Exp. Bot.* 64 (2013) 4617.
- [22] A. Peaucelle, S.A. Braybrook, L. Le Guillou, E. Bron, C. Kuhlemeier, H. Hofte, *Curr. Biol.* 21 (2011) 1720.
- [23] S. Rangarajan, L. Madden, N. Bursac, *Ann. Biomed. Eng.* 42 (2014) 1391.
- [24] M. Unbekandt, P.M. del Moral, F.G. Sala, S. Bellusci, D. Warburton, V. Fleury, *Mech. Dev.* 125 (2008) 314.
- [25] S.E. Lindsey, *Front. Physiol.* 5 (2014) 1.
- [26] J. Xi, M. Khalil, N. Shishechian, T. Hannes, K. Pfannkuche, H. Liang, A. Fatima, M. Hausteiner, F. Suhr, W. Bloch, M. Reppel, T. Sarić, M. Wernig, R. Jänisch, K. Brockmeier, J. Hescheler, F. Pillekamp, *FASEB J.* 24 (2010) 2739.
- [27] B.A. Filas, V.D. Varner, D.A. Voronov, L.A. Taber, *J. Vis. Exp.* (2011).
- [28] L. Davidson, R. Keller, *Methods Cell Biol.* 83 (2007) 425.
- [29] C.S. Roy, *J. Physiol.* 3 (1881) 125.
- [30] F.C. Minozzo, B.M. Baroni, J.A. Correa, M.A. Vaz, D.E. Rassier, *Sci. Rep.* 3 (2013) 2320.
- [31] C. Wiebe, G.W. Brodland, *J. Biomech.* 38 (2005) 2087.
- [32] A.R. Harris, J. Bellis, N. Khalilgharibi, T. Wyatt, B. Baum, A.J. Kabla, G.T. Charras, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 2516.
- [33] S.S. Segal, B.R. Duling, *Am. J. Physiol.* 256 (1989) H838.
- [34] <https://sites.google.com/site/oliviercardoso/Home/plugins>.
- [35] L.R.B. Feynman Richard P, L. Sands Matthew, *The Feynman Lectures on Physics, Volume II* (1969).
- [36] R.M. Statics, *Nature* 435 (2005).
- [37] N.R. Chevalier et al., unpublished results.
- [38] <http://imagingbook.com/>.
- [39] S.T. JM Gere, *Mechanics of Materials*, Nelson Thornes Ltd, 1999.
- [40] M. Delarue, F. Montel, D. Vignjevic, J. Prost, G. Cappello, M. Curie, I. Curie, *Biophys. J.* 107 (2014) 1821.
- [41] D.A. Narmoneva, J.Y. Wang, L.A. Setton, *Biophys. J.* 81 (2001) 3066.
- [42] R.E. Day, P. Kitchen, D.S. Owen, C. Bland, L. Marshall, A.C. Conner, R.M. Bill, M.T. Conner, *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 1840 (2014) 1492.
- [43] M.T. Frey, A. Engler, D.E. Discher, J. Lee, Y.L. Wang, *Methods Cell Biol.* 83 (2007) 47.
- [44] D.J. Müller, Y.F. Dufrene, *Trends Cell Biol.* 21 (2011) 461.
- [45] J.Y. Rho, T.Y. Tsui, G.M. Pharr, *J. Biomech.* 31 (1998) 21.
- [46] M. Stolz, U. Aebi, D. Stoffler, *Biol. Med.* 3 (2007) 53.
- [47] A.J. Engler, L. Richert, J.Y. Wong, C. Picart, D.E. Discher, *Surf. Sci.* 570 (2004) 142.
- [48] T. Reichlin, A. Wild, M. Dürrenberger, A.U. Daniels, U. Aebi, P.R. Hunziker, M. Stolz, *J. Struct. Biol.* 152 (2005) 52.
- [49] C.A. Grant, N.H. Thomson, M.D. Savage, H.W. Woon, D. Greig, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 4 (2011) 535.

- [50] Y.M. Efremov, E.A. Pukhlyakova, D.V. Bagrov, K.V. Shaitan, *Micron* 42 (2011) 840.
- [51] J. Henkels, J. Oh, W. Xu, D. Owen, T. Sulchek, E. Zamir, *Ann. Biomed. Eng.* 41 (2013) 421.
- [52] L. Davidson, R. Keller, Elsevier, 2007 (p. 425).
- [53] S. Nawaz, P. Sánchez, K. Bodensiek, S. Li, M. Simons, *PLoS One* 7 (2012).
- [54] M.J. Rosenbluth, W.A. Lam, D.A. Fletcher, *Biophys. J.* 90 (2006) 2994.
- [55] E. Spedden, C. Staii, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 16124.
- [56] T.G. Kuznetsova, M.N. Starodubtseva, N.I. Yegorenkov, S.A. Chizhik, R.I. Zhdanov, *Micron* 38 (2007) 824.
- [57] J.L. Hutter, J. Chen, W.K. Wan, S. Uniyal, M. Leabu, B.M.C. Chan, *J. Microsc.* 219 (2005) 61.
- [58] J. Yao, V.D. Varner, L.L. Brilli, J.M. Young, L.A. Taber, R. Perucchio, *J. Biomech. Eng.* 134 (2012) 024502.
- [59] F. Gao, D. Liao, A.M. Drewes, H. Gregersen, *Neurogastroenterol. Motil.* 21 (2009).

III - Effet de l'élasticité sur la différenciation des progéniteurs entériques

Afin d'analyser si l'élasticité de l'environnement peut influencer la différenciation des cellules progénitrices entériques, il faut tout d'abord les isoler du reste de la population des CCNEs. Nous avons pour cela utilisé la technique des neurosphères, développée par Bondurand *et al* (Fig. 30) (Bondurand, Natarajan et al. 2003).

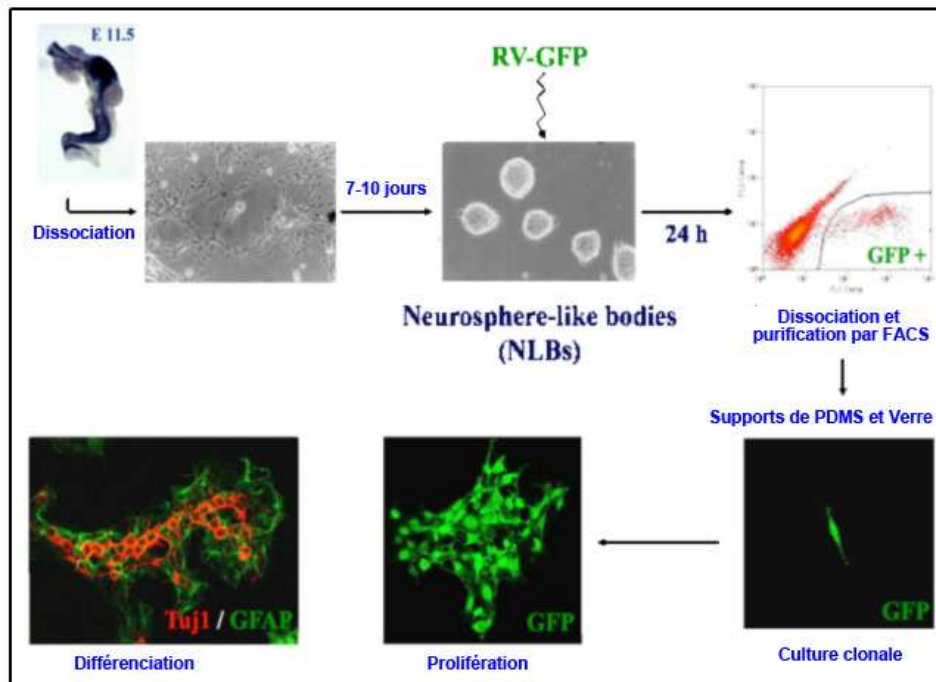


Figure 29 : Modèle des neurosphères entériques

Cette technique, composée de plusieurs étapes, permet dans un premier temps d'amplifier en CCNEs les cultures primaires d'intestins embryonnaires dissociés au stade E12.5. L'amplification se fait grâce un milieu spécifique contenant 15% d'extrait embryonnaire de poulet et des facteurs de croissances fibroblastiques qui maintient les CCNEs et les cellules progénitrices tout en permettant l'élimination progressive des autres types cellulaires de l'intestin (cellules mésenchymateuses et épithéliales). Le milieu de culture est changé tous les 2 jours et après quelques jours de cultures, des neurosphères se forment contenant des CCNEs et des cellules progénitrices indifférenciées.

La deuxième étape consiste en une étape de tri cellulaire par FACS après infection au préalable des neurosphères par un rétro-virus GFP. Ce rétrovirus s'intègre spécifiquement

dans les cellules en cours de divisions, il infecte donc préférentiellement les cellules progénitrices. Ainsi, sur la base de leur expression de la GFP, les cellules progénitrices sont triées et remises en cultures en condition clonale sur des supports commerciaux de PDMS de 28 et 1,5 kPa coatés de FN et sur des supports de verres utilisés comme contrôles.

Après 5 jours et 7 jours de cultures, les cultures clonales sont fixées et immunomarquées pour les marqueurs suivant : Sox10 (marqueur fortement exprimé par les cellules indifférenciées), Tuj1 (marqueur neuronal), B-FAPB (marqueur précoce de différenciation gliale) et GFAP (marqueur de cellules gliales). Les noyaux sont marqués au DAPI. De même, l'effet de l'EDN3 combiné à la rigidité du support sera analysé par traitement des cultures clonales avec ou sans EDN3.

Nous présentons ci-dessous les résultats préliminaires représentatifs de trois expériences indépendantes de cultures à 5 jours. Les analyses à 7 jours sont en cours ainsi que les analyses quantitatives (Rapport de cellules Tuj1 positives sur le nombre de cellules Sox10 positives). Enfin, une expérience sur l'effet de l'EDN3 a été réalisée et les analyses sont également en cours.

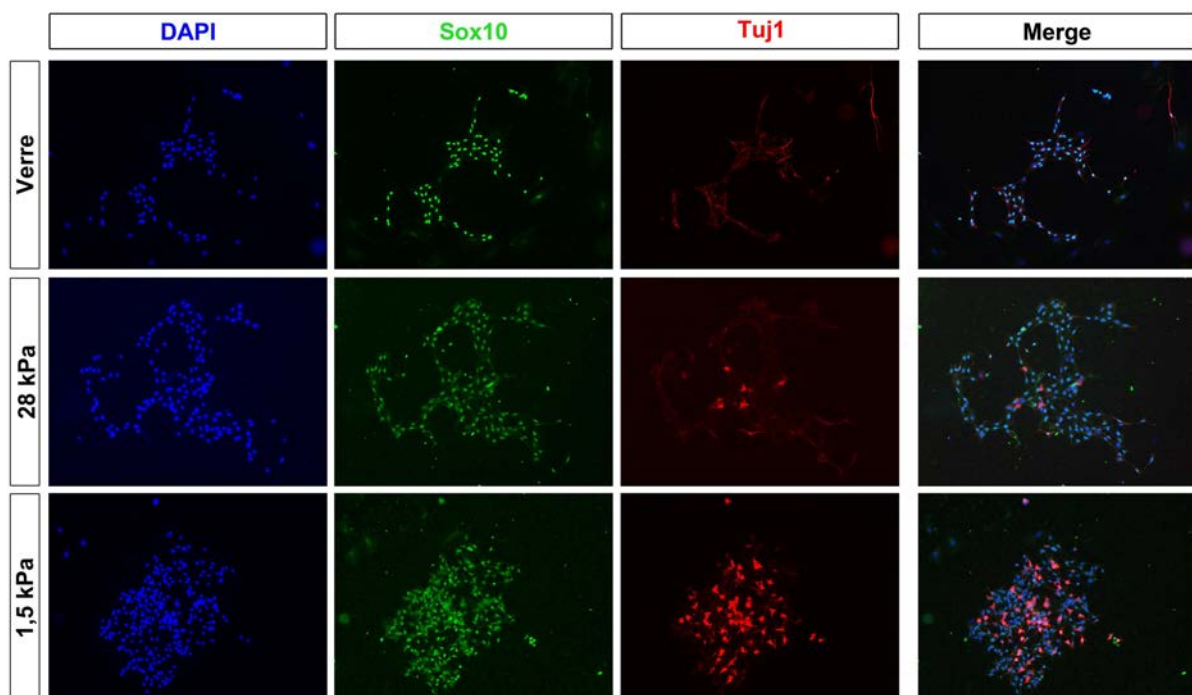


Figure 30 : Immunofluorescences de colonies clonales de progéniteurs entériques mises en cultures pendant 5 jours sur des supports de PDMS de rigidités différentes

Nos résultats préliminaires semblent indiquer que la différenciation neuronale est favorisée sur le support le plus mou de 1,5 kPa. En effet, il semblerait qu'il y ait plus de

cellules exprimant fortement Tuj1 sur le support à 1,5 kPa. Cependant, le marquage à 5 jours de B-FABP n'a pas donné de signal exploitable. Il semblerait que la morphologie de la colonie soit également plus compacte sur ce support et les colonies semblent plus grandes. Une analyse de la prolifération par marquage Phospho-Histone 3 est en cours.

CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I - Interactions génétiques et fonctionnelles entre l'EDN3 et les intégrines- β 1 au cours de la colonisation embryonnaire des CCNEs

I – A: *Edn3* et *Itgb1* agissent en synergie lors du développement du SNE

Plusieurs interactions génétiques ont été montrées comme gouvernant le développement du SNE, en particulier entre *Itgb1* et *Sox10* (Watanabe, Broders-Bondon et al. 2013) suggérant qu'*Itgb1* puisse agir comme gène modificateur lors de la colonisation des CCNEs. Par l'utilisation de mutants *Edn3^{ls/ls}* également invalidés de manière non conditionnelle et conditionnelle pour *Itgb1*, nous avons montré l'existence d'une interaction génétique entre *Edn3* et *Itgb1* lors du développement du SNE.

Nos observations phénotypiques montrent que l'hétérozygotie non conditionnelle (i.e touchant tous les tissus) d'*Itgb1* introduite dans le contexte de la mutation *Edn3* (β 1^{neo}; *Edn3^{null}*) induit une aggravation du phénotype entérique et du défaut organisationnel du réseau neuronal observés chez les simples mutants *Edn3^{null}*. Cependant, l'aggravation de ces phénotypes n'est pas retrouvé chez les hétérozygotes conditionnels β 1^{het}; *Edn3^{null}*. Ces observations suggèrent donc que les intégrines- β 1 agissent également sur la colonisation des CCNEs de manière non CCNE-autonome. Les intestins double-mutants (β 1^{null}; *Edn3^{null}*) présentent un retard aggravé de la colonisation en comparaison de chacun des simples mutants conditionnels et des contrôles, associé à un défaut aggravé de l'organisation du réseau neuronal formé dans les parties colonisées.

De plus, les CCNEs double-mutantes présentent des capacités migratoires dramatiquement altérées (vitesse de migration et persistance) en comparaison de tous les autres génotypes, comme visualisé par imagerie *time-lapse ex-vivo* des mutants conditionnels exprimant la YFP. Ce défaut de migration peut en partie être responsable du retard de colonisation observé chez les DM. Nous sommes en train d'analyser si d'autres défauts cellulaires additionnels ne participeraient pas également au phénotype, comme une apoptose précoce des CCNEs au moment de l'invasion du *foregut* à E9.5. En effet, bien que non quantifié, il semblerait qu'il y ait moins de CCNEs dans les estomacs des DM, leurs les bordures extérieures étant dépourvues de CCNEs (non montré). De plus, la taille de la population de CCNEs pouvant influencer leurs capacités migratoires, c'est donc un

paramètre important qu'il faut analyser. Ainsi, tôt au cours du développement du SNE, la voie EDN3/EDNRB agit en synergie avec la signalisation des intégrines- $\beta 1$ et ensembles elles contrôlent la colonisation des CCNEs.

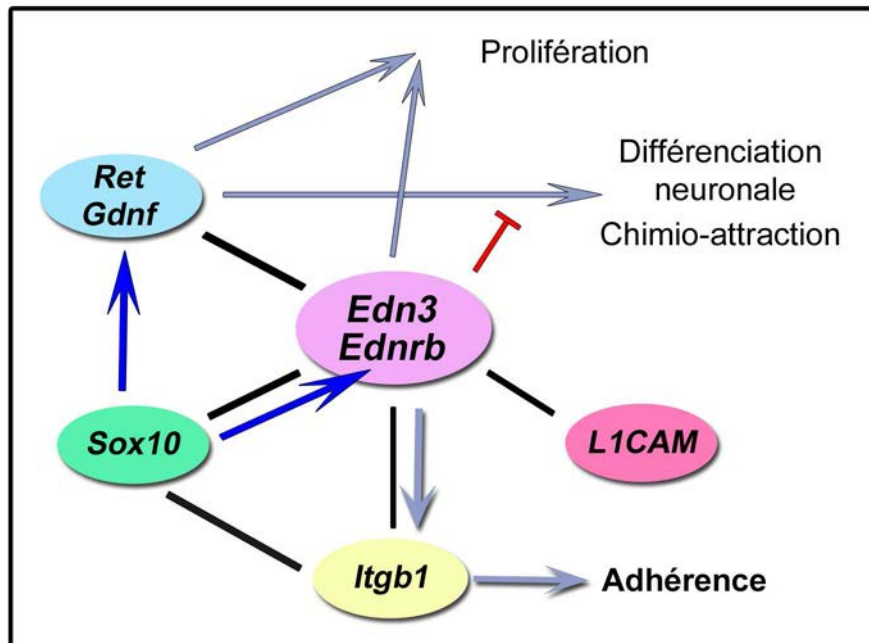


Figure 31 : Interaction génétiques et fonctionnelles entre *Edn3* et *Itgb1*

Schéma récapitulant les interactions génétiques et fonctionnelles de l'EDN3 au cours du développement du SNE. Les traits noirs indiquent les interactions génétiques, les flèches bleues indiquent un contrôle de l'expression génétique, les flèches grises et rouges les interactions fonctionnelles

I – B: L'EDN3 promeut l'adhérence des CCNEs en régulant positivement la formation d'adhérences focales intégrines- $\beta 1$

Nous avons montré pour la première fois que l'EDN3 stimule *in vitro* les capacités d'adhérences des CCNEs et ce sur différentes protéines de la MEC que l'on retrouve exprimées par l'intestin embryonnaire. En effet, l'EDN3 stimule la maturation et la formation de nouvelles adhérences focales (FA) intégrines- $\beta 1$ formées par les CCNEs sur la FN, la TNC ainsi que la VN, après 24h de traitement. En particulier, tout comme il a été montré pour les cellules de gliomes (Lange, Kammerer et al. 2007), l'EDN3 favorise l'adhérence des CCNEs lorsqu'elles sont mise en culture sur de la FN malgré la présence de TNC. La TNC, fortement exprimée au niveau du cæcum, a en effet été montrée comme perturbant l'adhérence des CCNEs à la VN (Breau, Dahmani et al. 2009). Nos résultats indiquent un effet similaire de la TNC sur l'adhérence à la FN, comme montré par la diminution significative de la taille des FA intégrines $\beta 1^+$ /Paxilline $^+$ mesurée sur FN+TNC. Ainsi l'EDN3, qui est fortement exprimée au

niveau du cæcum, pourrait stimuler l'adhérence des CCNEs à la FN lorsqu'elles envahissent ce dernier et dont l'environnement est moins permissif à la migration à cause de la forte expression de TNC.

Nous avons également cherché à savoir si l'EDN3 n'agissait que sur les intégrines- β 1 ou si son effet pouvait être étendu à d'autres types d'intégrines. Nous avons pour cela analysé les intégrines- β 3, qui représentent en plus des intégrines- β 1, un autre type de récepteur à la VN. Si les CCNEs expriment bien ce récepteur, comme démontré par immunomarquages de coupes congelées d'intestins embryonnaires (Breau, Pietri et al. 2006), nos analyses 2D indiquent en revanche que les CCNEs ne forment pas, ou de taille très réduites, d'adhérences dépendantes des intégrines- β 3 sur la VN. En effet, les adhérences β 1 sont stimulées par l'EDN3, alors que cette dernière n'a pas d'effet sur les intégrines- β 3. La perméabilisation des cultures au préalable des immunofluorescences peut dans certains cas altérer les adhérences non stabilisées. Afin de s'assurer que le peu de signal β 3 détectable ne provenait pas d'un problème lié à la perméabilisation, nous avons également analysé des immunomarquages réalisés sans perméabilisation. Nos résultats indiquent donc que l'EDN3 agit en renforçant les adhérences formées par les intégrines- β 1 mais probablement pas en modifiant le type d'intégrines engagées. **Il serait cependant intéressant d'étendre l'étude à d'autres sous-unités d'intégrines β , telles que β 5 également exprimées par les CCNEs et d'analyser les sous-unités α engagées comme α 4 sur la FN ou α 6 sur la Laminine (Breau, Pietri et al. 2006).**

L'EDN3 favorise l'état indifférencié des CCNEs, notamment car elle maintient l'expression de Sox10 (Bondurand, Natarajan et al. 2006). Nous avons donc analysé la réponse des CCNEs à des temps courts de traitement (30 min, 1h et 3h) afin de déterminer si l'effet de l'EDN3 sur les propriétés adhésives des CCNEs était indépendant de son rôle sur le maintien à l'état progéniteur des CCNEs. L'augmentation significative du nombre et de la taille des FA intégrines- β 1 visible dès 30 min de traitement indique un effet direct de l'EDN3 sur l'adhérence des CCNEs par le déclenchement d'une cascade de signalisation régulant la formation et la maturation des FA. L'effet observé est similaire chez les CCNEs provenant de culture d'intestin de poulet indiquant de plus que cet effet n'est pas spécifique d'une espèce donnée.

I – C: L'EDN3 module la dynamique membranaire des CCNEs

En plus de son effet rapide sur la formation et la maturation des FA, nous avons également mis en évidence un rôle de l'EDN3 dans le remodelage du cytosquelette d'actine, la stimulation de la croissance et la stabilisation du lamellipode des CCNEs. Cet effet est visible dès 15 min de traitement environ et est corrélé avec la présence d'un signal WAVE2 à la périphérie des lamellipodes. Nos observations sont en adéquation avec les données de la littérature montrant un effet rapide de l'antagoniste BQ788 sur la morphologie des CCNEs qui s'arrondissent et sont altérées temporairement dans leur migration (Druckebrod and Epstein 2009). De plus, il a été montré que l'EDN3 induisait chez les CCNEs une activation rapide et temporaire de Rac1 (Goto, Sumiyama et al. 2013), protéine de la famille des Rho-GTPases impliquée dans la formation du lamellipode. Cette dernière active le complexe WAVE (comportant la protéine WAVE2 notamment) indispensable à la polymérisation de l'actine par ARP2/3 (Krause and Gautreau 2014). Ensemble, ces résultats démontrent clairement un effet positif de la voie EDN3/EDNRB sur la régulation de la polymérisation de l'actine et la formation du lamellipode.

Par ailleurs, si Rac1 favorise la formation des adhérences naissantes qui permettent en retour la stabilisation du lamellipode, les adhérences focales peuvent également par *feedback* positif activer et maintenir Rac1 à la membrane, comme nous l'avons décrit dans l'introduction. On peut donc formuler la question suivante: **l'EDN3 agit-elle en parallèle et de manière indépendante sur le cytosquelette d'actine et les FA ou bien agit-elle seulement sur l'un des processus qui en retour favorise le second ?** De nouvelles analyses *time-lapse* de la dynamique membranaire des CCNEs suivie d'une analyse quantitative de leurs FA intégrine- β 1 pourraient être réalisées après traitement des cultures par un inhibiteur d'ARP2/3 (CK-666) et de Rac1 (NCS 23766), afin de vérifier si l'augmentation du nombre et de la taille des FA est toujours visible. A l'inverse, une analyse *time-lapse* de CCNEs provenant de cultures d'explants de mutants β 1^{null} sur un support permissif en présence d'EDN3 pourrait être réalisé afin de vérifier si son effet sur le lamellipode a toujours lieu.

De plus, il est également intéressant de noter que dans le cas des cultures de CCNEs de souris, si l'effet de l'EDN3 sur les FA est très largement partagé par l'ensemble de la population de CCNEs, toutes ne semblent pas répondre en terme de croissance et de

stabilisation du lamellipode (21% des CCNEs analysées chez la souris, chez le poulet en revanche ce pourcentage, beaucoup plus élevé, est de 72%). Il serait intéressant d'analyser plus en détail le phénotype des CCNEs dont la formation du lamellipode est déclenchée par l'EDN3 (cellules indifférenciées ou engagées dans une voie neuronale ou gliale ?) ainsi que l'expression du récepteur EDNRB. En effet, il se peut qu'il existe des différences de niveau d'expression de l'EDNRB en fonction de l'engagement des CCNEs dans leur voie de différenciation.

I – D: Les CCNEs mutantes *Edn3^{Isls}* présentent des propriétés adhésives altérées

Afin d'approfondir nos analyses *in vitro*, nous avons analysé l'impact de la mutation de l'*Edn3* sur l'expression des intégrines- β 1 par les CCNEs *in vivo*. Les immunomarquages de coupes congelées d'intestins embryonnaires mutants *Edn3^{Isls}* indiquent que les CCNEs expriment les intégrines- β 1. Cependant, le nombre de FA positives pour les intégrines- β 1 est significativement réduit lorsque les CCNEs mutantes sont mises en cultures sur de la FN. Ces résultats *in vitro* suggèrent donc que l'absence d'EDN3 impacte les capacités adhésives intrinsèques des CCNEs. Ainsi nos observations, sont en adéquation avec les résultats précédemment obtenus par Druckenbrod *et al*, montrant que l'invalidation spécifique aux CCNEs de l'EDNRB conduit à des défauts cellule-autonome de migration *in vivo* des CCNEs (Druckenbrod and Epstein 2009). Il semblerait donc qu'en plus de jouer un rôle dans le maintien d'un environnement permissif à la colonisation des CCNEs, la voie EDN3/EDNRB est également impliquée dans la régulation des processus adhésifs et migratoires des CCNEs de façon cellule dépendante (Payette, Tennyson et al. 1988). **Le défaut d'adhérence observé est-il suffisant pour expliquer (1) les défauts de migration des mutants *Ednrb* CCNEs spécifiques et/ou (2) le défaut de colonisation rapporté chez les mutants *Edn3^{Isls}* ou *Ednrb^{Isls}* ?**

(1) Nos résultats actuels ne nous permettent pas de conclure sur ce point précis. Une première approche *in vitro* pour répondre à cette question serait d'utiliser des analyses *time-lapse* des CCNEs mutantes *Edn3^{Isls}* mis en culture sur de la FN ainsi que de CCNEs provenant d'explants contrôles traités avec ou sans BQ788 (comme nous ne possédons pas la lignée *Ednrb^{LacZ}*). Nous pourrions ainsi analyser leurs capacités migratoires, suivie d'une analyse quantitative des adhérences intégrines- β 1 afin de déterminer s'il existe une

corrélation entre les défauts d'adhérences et les capacités migratoires des CCNEs en conditions pathologiques. Enfin, il serait intéressant également, au vu de l'effet de l'EDN3 sur la dynamique membranaire décrit précédemment, d'analyser si la présence d'EDN3 affecte les capacités migratoires des CCNEs *Edn3^{sls}* et des CCNEs contrôles traitées avec ou sans BQ788, toujours par l'utilisation d'image *time-lapse*.

(2) Une fois de plus, nos résultats ne permettent pas de répondre clairement à cette question, il est néanmoins raisonnable de penser qu'*in vivo*, le défaut d'adhérence observé chez les CCNEs mutantes *Edn3^{sls}* pourrait être aggravé dans un contexte où l'environnement tissulaire n'est plus permissif à la colonisation. Des expériences de cultures 2D pourraient être réalisées afin d'analyser si le défaut de formation des FA intégrines-β1 des CCNEs mutantes *Edn3^{sls}* sont aggravées en présence de TNC. De même la présence d'autres protéines de MEC, dont l'expression anormale a été mise en évidence chez les mutants *Edn3^{sls}* telles que la Laminine et le Collagène IV, pourraient être testées (Payette, Tennyson et al. 1988; Rothman, Chen et al. 1996). Enfin, l'accumulation des défauts d'adhérence et d'expression de protéines de la MEC, combinée à des défauts de différenciation neuronale précoce observé chez les mutants *Edn3^{sls}* (Bondurand, Natarajan et al. 2006) pourraient ensemble contribuer à l'échec de la colonisation des CCNEs et conduire au phénotype HSCR caractéristique des mutants *Edn3^{sls}* et *Ednrb^{sls}* (Baynash, Hosoda et al. 1994; Hosoda, Hammer et al. 1994).

I – E : Par quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) agit la voie EDN3/EDNRB ?

Quelle est la voie de signalisation activée par EDN3/EDNRB qui déclenche la formation et la maturation des adhésions focales dépendantes des intégrines-β1 ?

L'EDNRB est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, susceptible donc de déclencher de nombreuses et diverses voies de signalisation (Davenport, Hyndman et al. 2016). Cependant, à notre connaissance, aucune donnée ne semble disponible concernant les voies putatives de signalisation déclenchées par EDN3/EDNRB chez les CCNEs. Nous pouvons en revanche nous baser sur les effecteurs mis en évidence dans d'autres systèmes cellulaires, parfois proches des CCNEs. Ces effecteurs pourraient donc représenter des candidats potentiels à investiguer. Par exemple, pour les mélanocytes (dérivés des CCN), plusieurs effecteurs activés en aval de l'activation l'EDNRB

par l'EDN3 dont la phospholipase C (**PLC**) conduisant à l'augmentation du **calcium intracellulaire** et la production de diacyl glycerol (**DAG**) (Kang, Kang et al. 1998), pourraient jouer un rôle dans l'activation des intégrines chez les CCNEs. En effet, l'activation de la PLC et l'augmentation subséquente de la concentration intracellulaire de calcium et de DAG induit indirectement le recrutement de la Taline à la membrane par l'activation (indirecte) de Rap1 qui peut ainsi interagir avec RIAM qui se lie à la Taline (Anthis and Campbell 2011). De même, les protéines kinases C (**PKC**), qui sont également activées en aval de la PLC (par DAG de manière calcium dépendante ou indépendante), semble être impliquées dans la phosphorylation de la FAK et la Paxilline induite par l'activation de l'EDNRB par l'EDN3 chez les progéniteurs neuronaux du SNC (Morishita, Ueda et al. 2007). En revanche pour les astrocytes (cellules gliales du SNC), si le calcium intracellulaire et la PKC ne semblent pas impliqués dans la phosphorylation de la FAK et de la Paxilline induite par l'EDN3, l'activation de cette voie permet de restaurer la formation des FA préalablement inhibée par une injection d'analogue du cAMP (Koyama, Yoshioka et al. 2000). De façon intéressante, il a été montré pour les cellules endothéliales que la voie EDN3/EDNRB pouvait inhiber l'accumulation de cAMP intracellulaire induite par d'autre facteur (Rubanyi and Polokoff 1994) et que le traitement d'intestin *ex-vivo* par un analogue du cAMP perturbe la migration des CCNEs en réduisant l'activité de Rac1 (Goto, Sumiyama et al. 2013). De plus, la PI3K semble également impliquée dans la migration des CCNEs en régulant positivement Rac1 (Goto, Sumiyama et al. 2013), PI3K qui a également été montré comme impliqué dans la stimulation de l'étalement des cellules de gliomes induite par l'activation de l'EDNRB (Lange, Kammerer et al. 2007). Ces effecteurs pourraient donc être impliqués dans la voie de signalisation EDN3/EDNRB contrôlant les propriétés d'adhérence des CCNEs. Nous pouvons de plus émettre l'hypothèse que Rho pourrait également être un effecteur activé en aval de l'EDNRB car il est impliqué dans la maturation des FA.

Les taux d'augmentation du nombre de FA que nous observons chez les CCNEs de souris demandent que du matériel protéique (i.e les intégrines- β 1) en quantité suffisante soit disponible pour la formation de nouvelles adhérences. **Il serait intéressant d'analyser si l'EDN3 agit sur le turnover et le transport intracellulaire des intégrines- β 1.**

De même, en particulier pour les cultures long terme, **on ne peut exclure que la voie EDN3/EDNRB agisse également *in fine* sur l'amplification de l'expression génétique**

d'*Itgb1*. C'est une hypothèse qu'il serait intéressant de tester et il semblerait par ailleurs que l'EDN3 agisse sur l'expression des intégrines dans le cas des cellules de mélanomes (Bagnato, Rosano et al. 2004). Par exemple, il est envisageable dans un premier temps de réaliser un double marquage par intégrines- β 1 (anticorps MAB1997 reconnaissant également les intégrines non activées) et intégrines- β 1 en conformation activée (anticorps 9EG7 que nous avons utilisé dans cette étude) sur des cultures d'explants en présence et absence d'EDN3. Si les deux marquages sont sensiblement identiques chez les CCNEs stimulées avec de l'EDN3, cela indiquerait que l'EDN3 favorise plutôt indirectement l'activation des intégrines- β 1 en stimulant la formation des FA. Si en revanche il y a à la fois (1) plus de signal MAB1997 que de signal 9EG7 en présence d'EDN3 et (2) plus de signal MAB1997 que dans les cultures sans EDN3, alors cela nous indiquerait que la production totale d'intégrines- β 1 est augmentée et que l'EDN3 n'agirait pas seulement sur l'activation des intégrines- β 1. Deuxièmement, un autre type d'expérience peut également être effectué, une fois de plus en tirant avantage de l'expression de la YFP spécifiquement chez les CCNEs : la cytométrie en flux. Ainsi, il serait possible d'analyser le niveau d'expression des intégrines- β 1 à la membrane de CCNEs provenant d'intestin embryonnaire dissociés et traités soit à l'EDN3 soit au BQ788 (antagoniste de l'EDNRB). Enfin, pour étudier le contrôle de l'expression d'*Itgb1* par l'EDN3, des tests de luciférase sont envisageables. Il faudrait pour cela transfecter des cellules par un plasmide contenant la luciférase sous le contrôle du promoteur *Itgb1* et de les traiter par l'EDN3. Il serait préférable d'utiliser une lignée cellulaire exprimant l'EDNRB telle que les N2a (cellules de neuroblastomes). En effet, les cultures primaires utilisées jusqu'ici ne sont pas adaptées pour des tests de luciférase car elles ne fournissent pas assez de matériel au vu du faible taux de transfection généralement obtenu. Une autre option plus physiologique encore serait d'utiliser le modèle des neurosphères nous permettant d'amplifier les CCNEs, chez qui des infections aux lentivirus sont réalisables.

II – Propriétés élastiques de l'intestin embryonnaire et impact sur les comportements des CCNEs au cours du développement du SNE

Comme décrit précédemment, les paramètres biochimiques de l'environnement intestinal, telle l'expression de facteurs solubles (GDNF et EDN3) et des protéines matricielles jouent un rôle important dans la mise en place du SNE. A l'inverse, en conditions

pathologiques, comme la maladie de HSCR, l'absence de ces facteurs et/ou l'expression anormale de protéines de la MEC chez les mutants *Edn3^{Isls}* inhibent la colonisation des CCNEs. Tout comme les propriétés biochimiques, les caractéristiques élastiques de l'intestin embryonnaire pourraient également influencer la colonisation des CCNEs ou être modifiées en conditions pathologiques.

II – A: L'intestin embryonnaire se rigidifie au cours de son développement

Par l'utilisation d'un essai de traction uniaxiale, combiné à des analyses AFM de l'élasticité locale du mésenchyme intestinal, nous avons montré que les intestins embryonnaires de poulet se rigidifiaient au cours de leur développement. L'intestin passe d'une élasticité de 450/500 Pa environ à 1000 Pa, entre les stades E4.5/E5 et E7.5. Les CCNEs migrent donc dans un environnement très élastique lorsqu'elles envahissent le *midgut* entre E4.5 et E5.5, et rencontrent un environnement dont l'élasticité a doublé lorsqu'elles envahissent le *hindgut* entre E6.5 et E7.5 (un schéma détaillant la chronologie de l'avancement de la colonisation est présentée dans l'introduction Fig. 7C). Les cartes d'élasticités obtenues par AFM sur des sections fraîches d'intestins embryonnaires de poulet montrent la même tendance de rigidification au cours du temps.

Nous avons également mesuré par traction uniaxiale l'élasticité d'intestins de poulet à E5.5 traités au préalable à la collagénase (10 min). Le traitement à la collagénase réduit d'environ 43% le module d'Young mesuré sur les intestins traités. Le Collagène semble être un des constituants matriciels majeur assurant l'intégrité mécanique de l'intestin embryonnaire. Afin d'analyser de façon spatio-temporelle l'organisation fibrillaire du collagène présent dans l'intestin embryonnaire, nous avons utilisé l'imagerie SHG. Cette technique non invasive d'imagerie permet la visualisation des macromolécules organisées en fibrille ou fibres comme le Collagène I et II (Chen, Nadiarynkh et al. 2012). Nos analyses effectuées sur des échantillons non fixés d'intestins embryonnaires de poulet nous ont permis de visualiser l'apparition des fibrilles de Collagène entre les stades E6 et E8 au niveau du *midgut* et du *hindgut*. On peut noter également qu'à tous les stades analysés le signal SHG est plus important au niveau du *hindgut* qu'au niveau du *midgut* et en particulier entre les stades E7 et E8. Ces résultats suggèrent que l'organisation fibrillaire du collagène est plus importante au moment l'invasion du *hindgut* par les CCNEs.

De plus, nos résultats suggèrent que l'organisation en fibrille du collagène pourrait participer à la rigidification physiologique de l'intestin embryonnaire de poulet au cours de son développement. Des analyses complémentaires de traction uniaxiale sur des *hindguts* (au stade E7 et E8) traités à la collagénase en combinaison d'une analyse SHG (afin d'analyser dans quelles mesures l'organisation du collagène est affectée) pourraient être réalisées afin d'analyser plus précisément la contribution des fibrilles de collagène à l'élasticité de cette région intestinale (Chen, Nadiarynkh et al. 2012).

Les tests de traction uniaxiale de l'élasticité d'intestin embryonnaire de souris *wild-types*, hétérozygotes *Edn3^{ls/+}* et mutants *Edn3^{ls/ls}* donnent des valeurs sensiblement identiques entre les *midguts* des différents génotypes ainsi que pour les *hindguts* à E12.5¹⁹. L'analyse des modules d'Young en fonction du stade embryonnaire révèle la même tendance observée chez le poulet. Les intestins embryonnaires de souris se rigidifient également entre E12.5 et E14.5, passant en moyenne de 1.5 kPa à 3.5 kPa. Avec ces techniques, nous n'avons pas donc pas détecté d'incidence de la mutation *Edn3* sur la rigidité du tissu intestinal embryonnaire. Cependant, il serait intéressant d'analyser si la réponse à la rigidité est altérée chez les CCNEs mutantes pour *Edn3* (voir ci-dessous).

Une augmentation du signal SHG est également observée entre les stades E12.5 et E14.5 au niveau du *midgut*. Cependant, il serait intéressant d'effectuer des analyses supplémentaires concernant le *hindgut* de souris ainsi que d'analyser la localisation spatiale des CCNEs au sein du tissu par rapport aux fibrilles de collagène. Notons cependant que le collagène IV qui a été montré comme augmenté chez les mutants *Edn3^{ls/ls}* (Payette, Tennyson et al. 1988; Rothman, Chen et al. 1996) ne fournit pas de signal SHG car il n'est pas organisé en fibrilles.

Enfin, il serait également intéressant d'analyser si les CCNEs jouent un rôle dans le dépôt et le remodelage du collagène. Pour cela, des intestins embryonnaires de souris dépourvus de CCNEs pourraient être utilisés tels les mutants *Ret^{-/-}*. En effet ces derniers ne semblent pas présenter d'anomalie d'expression de protéines de la MEC au niveau du côlon contrairement aux mutants *Edn3^{ls/ls}* (Rothman, Chen et al. 1996). Il a par ailleurs été récemment créé un nouveau mutant murin HSCR, le mutant Holdstein, chez qui l'insertion

¹⁹ Note personnelle : il me semblait nécessaire d'effectuer un test statistique qui n'apparaît pas dans la publication. Je suis repartie des données de Nicolas Chevalier et ai effectué un test de Mann Whitney Wilcoxon à l'aide de R, entre les *midguts* contrôles (pool *Edn3^{+/+}* et *Edn3^{ls/+}*) versus *Edn3^{ls/ls}* à E12.5 ainsi qu'entre les *hindguts*. Voici les p-values : p=0.7396 pour les *midguts* et p=0.8333 pour les *hindguts*.

du minigène de tyrosinase à proximité du gène *Col6a4* (codant la sous-unité $\alpha 4$ du Collagène VI) des CCNEs, induit sa surexpression et conduit à une augmentation de la production de Collagène VI par les CCNEs elles-mêmes. Cette surexpression ralentit leur migration et conduit à une aganglionose du côlon, phénotype typique de HSCR (Soret, Mennetrey et al. 2015).

II – B: Influence de l'élasticité environnementale sur la migration tridimensionnelle des CCNEs

Les CCNEs colonisant l'intestin embryonnaire sont donc confrontées à un environnement tridimensionnel dont la rigidité augmente au fur et à mesure du développement de l'intestin, ainsi que l'organisation fibrillaire du Collagène. Afin d'analyser l'impact de l'élasticité de l'environnement sur les capacités de colonisation des CCNEs, nous avons effectué des cultures tridimensionnelles d'intestins en gels de collagène. Laurent Bidault (collège de France) a mis au point un protocole permettant la préparation de plusieurs gels de collagène de rigidité croissante. Ces gels sont obtenus en modifiant la concentration de collagène, la température de gélation et le pH de la solution. Ils sont classés selon trois types de porosités: faible, moyenne et élevée. La porosité des gels a été définie par le pourcentage moyen de pores dont le diamètre est supérieur à 3 μm . Une faible porosité traduit donc un faible pourcentage de pores de plus 3 μm , à l'inverse une porosité élevée signifie un pourcentage plus élevé de ces pores dont la majorité font entre 3 et 10 μm de diamètre. Il est important de noter également que le diamètre des fibres de collagène augmente au plus le gel est rigide. Nos résultats indiquent que **le facteur limitant de l'étendue de la colonisation des CCNEs au sein du gel est l'élasticité**, tandis que la porosité seule ne semble pas être un des paramètres déterminants. En effet, les CCNEs sont capables d'envahir les gels dont l'élasticité est proche de l'élasticité physiologique du tissu intestinal embryonnaire (150 Pa et 660 Pa), mais la distance de colonisation diminue linéairement avec l'augmentation de la rigidité. À 1500 Pa, les CCNEs n'envahissent le gel que sur une très courte distance et au-delà elles n'envahissent plus le gel du tout.

De plus, l'inhibition des MMPs par traitement des cultures 3D au GM6001 bloque la progression des CCNEs au sein des gels de faible élasticité. La dégradation de la matrice de collagène semble donc indispensable à la progression de ces dernières. Ces observations vont dans le même sens que deux études montrant que les MMPs, et en particulier la MMP-

2, sont requises pour la colonisation du *hindgut* par les CCNEs (Anderson, Turner et al. 2006; Anderson 2010). Ainsi, il est raisonnable de penser que l'augmentation de la rigidité des gels de collagène, concomitante à l'augmentation du diamètre des fibres, rend plus difficile leur dégradation par les CCNEs via les MMPs. De plus, il a été montré que l'application d'une force locale sur des fibres de collagène pouvait permettre le dévoilement de sites cryptiques de dégradation par certaines MMPs (Chang and Buehler 2014). Ainsi une hypothèse pour expliquer nos observations serait qu'au delà d'une certaine rigidité, la force appliquée sur l'environnement par les CCNEs ne serait plus suffisante pour déformer les fibres de collagène et permettent leur dégradation.

II – C: Influence de l'élasticité des supports 2D sur la migration des CCNEs et la différenciation des progéniteurs entériques

Les essais de migration 2D d'explants déposés sur des supports de PDMS et de PAA-gels recouverts de FN montrent que les CCNEs sont capables de migrer sur une large gamme de supports élastiques. En effet, une couronne de CCNEs a été observée sur la majorité des supports, allant de plusieurs 28 kPa (PDMS) à 220 Pa (PAA-gels). L'étendue de la couronne de CCNE ainsi que la morphologie de certaines CCNEs présentant un lamellipode étalé, indiquent que ces dernières sont capables d'interagir et de migrer sur les supports les plus mous utilisés pour ces essais (1,9 kPa et 220 Pa). La limite de capacité de migration semble être atteinte à partir de 120 Pa, support sur lesquels peu d'explants présentent une couronne de CCNEs. Ainsi, contrairement à certains autres types cellulaires tels que les fibroblastes ou les cellules de gliomes, les CCNEs semblent donc adaptées à des supports mous, dont l'élasticité est en réalité proche de l'élasticité physiologique de l'intestin embryonnaire (Yeung, Georges et al. 2005; Ulrich, de Juan Pardo et al. 2009). En effet, si on considère que le coefficient de Poisson des PAA-gels est de 0,480 (Boudou, Ohayon et al. 2006), dans les deux études citées précédemment, les fibroblastes présentent une morphologie arrondie en dessous de 1,4 kPa (Yeung, Georges et al. 2005) et les cellules de gliomes en dessous de 2,3 kPa (dans ces études, ce sont les modules de Coulomb qui sont donnés). Concernant nos essais, nous pouvons de plus noter que les cellules mésenchymateuses, qui émigrent d'ordinaire de l'explant avec les CCNEs, ne migrent quasiment pas sur les supports à 220 Pa contrairement aux CCNEs. **Ainsi, il semblerait que les CCNEs aient un seuil de réponse à la rigidité, en terme de migration, relativement bas.**

Pour compléter nos résultats, il serait intéressant d'analyser les vitesses et persistance de migration des CCNEs par *time-lapse* ainsi que d'analyser plus en détail les adhérences focales en fonction de l'élasticité du support 2D. De même, il faudra déterminer l'effet de l'EDN3 sur ces paramètres en fonction de l'élasticité sachant l'impact de ce peptide sur la formation des FAs.

Enfin, Engler et *al* ont montré il y a quelques années que la rigidité du support pouvait également affecter la différenciation des cellules souches (Engler, Sen et al. 2006). Afin d'aller plus loin dans l'analyse de l'effet de l'élasticité du support sur la différenciation des progéniteurs entériques, nous avons utilisé le modèle des neurosphères précédemment mis en place par Bondurand et *al* (Bondurand, Natarajan et al. 2003). Cette technique nous permet d'amplifier et d'isoler les progéniteurs entériques indifférenciés par FACS afin de les remettre en culture clonales. Nos résultats préliminaires indiquent que les progéniteurs entériques sont capables d'adhérer et de former des colonies sur toutes les rigidités testées (28 kPa et 1,5 kPa). De plus, il semblerait la rigidité la plus faible favorise la différenciation neuronale à 5 jours de culture. Les quantifications, ainsi que des analyses à des temps de cultures plus long sont nécessaires et en cours de réalisation afin de valider ces résultats. De même, l'analyse de l'effet de l'EDN3 sur les cultures clonales en fonction de la rigidité du substrat est en cours de réalisation.

II – D: Propriétés mécaniques de l'environnement et HSCR:

L'augmentation de l'élasticité de l'intestin embryonnaire peut-elle être un paramètre limitant la colonisation des CCNEs lors du développement du SNE en conditions pathologiques ? L'état actuel de nos résultats ne nous permet pas de conclure précisément sur ce point. Nos essais de traction uniaxiale montrent une rigidification des intestins embryonnaires de souris contrôles et *Edn3^{sls}* au cours du développement, sans que des différences significatives de rigidité entre ces deux génotypes n'aient été détectées, ni au niveau du *midgut*, ni au niveau du *hindgut*. Il serait cependant intéressant d'analyser au niveau local par AFM si des différences subtiles existent qui ne seraient pas détectées par les tests de traction uniaxiale. Deuxièmement, pour répondre à notre question, il serait nécessaire d'analyser les réponses migratoires des CCNEs *Edn3^{sls}* ou *Ednrb^{-/-}* confrontées à des rigidités croissantes dans un environnement tridimensionnel. En effet, nous avons décrit précédemment un défaut d'adhérence chez les CCNEs mutantes *Edn3^{sls}* qui se caractérise

par une réduction de la capacité de formation des adhérences dépendantes des intégrines- β 1. Les intégrines- β 1 étant des mécanorecepteurs et les adhérences focales nécessaires à la mécanosensation, il est possible que leur réponse à la rigidité soit perturbée. Il a par ailleurs été montré que les CCNEs mutantes conditionnelles pour *Ednr β* présentent un retard de 24h dans leur migration (Druckenbrod and Epstein 2009). Cela signifie que lorsqu'elles arrivent au niveau du *hindgut*, celui-ci présente un environnement plus mature dont l'élasticité a augmenté. Ainsi, la rigidité de l'environnement du *hindgut* combinée à d'autres défauts caractéristiques de ces mutants pourrait contribuer à l'échec de la colonisation de l'intestin distal.

Enfin pour terminer, il est important d'évoquer les thérapies cellulaires qui représentent de véritables espoirs de guérison pour les patients atteints de HSCR et d'autres pathologies du SNE. À l'heure actuelle, la prise en charge de la maladie de HSCR est essentiellement chirurgicale et palliative. La chirurgie consiste en une résection de la partie du côlon non innervée chez les patients atteints de la forme courte de HSCR ainsi qu'une anastomose rectale (Burns, Goldstein et al. 2016). Mais les complications post-chirurgicales à court et moyen termes sont nombreuses. C'est pourquoi, l'utilisation de cellules souches qu'elles soient entériques, (préservées chez l'adulte (Kruger, Mosher et al. 2002)) ou provenant d'IPS, sont particulièrement étudiée comme source de cellules pouvant être réimplantées dans les parties aganglioniques. Plusieurs limitations techniques cependant subsistent : la quantité de cellules souches qui doit être greffée pour optimiser le résultat, la longueur de la zone repeuplée obtenue qui est, à l'heure actuelle, insuffisante après la greffe dans des modèles animaux de pathologie du SNE ou encore la différenciation et dans les bonnes proportions des cellules souches en types neuronaux et de cellules gliales pour produire des ganglions fonctionnels (Burns, Goldstein et al. 2016). **Ainsi, connaître la biologie des cellules souches entériques et leurs réponses aux signaux biochimiques et mécaniques, relativement peu étudiés dans le domaine, est crucial pour l'amélioration des protocoles de cultures et d'expansion des cellules souches et *in fine* leur réponse après réimplantation.**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdo, H., M. M. Mahe, et al. (2012). "The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy-Delta(1)(2),(1)(4)-prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress." *The Journal of physiology* **590**(Pt 11): 2739-2750.
- Alexandrova, A. Y., K. Arnold, et al. (2008). "Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow." *PLoS ONE* **3**(9): e3234.
- Allan, I. J. and D. F. Newgreen (1980). "The origin and differentiation of enteric neurons of the intestine of the fowl embryo." *Am J Anat* **157**(2): 137-154.
- Amiel, J., B. Laudier, et al. (2003). "Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome." *Nature Genetics* **33**(4): 459-461.
- Amiel, J., E. Sproat-Emison, et al. (2008). "Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review." *J Med Genet* **45**(1): 1-14.
- Anderson, R. B. (2010). "Matrix metalloproteinase-2 is involved in the migration and network formation of enteric neural crest-derived cells." *Int J Dev Biol* **54**(1): 63-69.
- Anderson, R. B., A. J. Bergner, et al. (2007). "Effects of different regions of the developing gut on the migration of enteric neural crest-derived cells: A role for Sema3A, but not Sema3F." *Developmental Biology* **305**(1): 287-299.
- Anderson, R. B., A. L. Stewart, et al. (2006). "Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways." *Cell Tissue Res* **323**(1): 11-25.
- Anderson, R. B., K. N. Turner, et al. (2006). "The Cell Adhesion Molecule L1 Is Required for Chain Migration of Neural Crest Cells in the Developing Mouse Gut." *Gastroenterology* **130**(4): 1221-1232.
- Angrist, M., S. Bolk, et al. (1996). "Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a Hirschsprung disease patient." *Nat Genet* **14**(3): 341-344.
- Anthis, N. J. and I. D. Campbell (2011). "The tail of integrin activation." *Trends Biochem Sci* **36**(4): 191-198.
- Anthis, N. J., K. L. Wegener, et al. (2009). "The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction." *EMBO J* **28**(22): 3623-3632.
- Argaves, W. S., R. Pytela, et al. (1986). "cDNA sequences from the alpha subunit of the fibronectin receptor predict a transmembrane domain and a short cytoplasmic peptide." *J Biol Chem* **261**(28): 12922-12924.
- Askari, J. A., P. A. Buckley, et al. (2009). "Linking integrin conformation to function." *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 165-170.
- Aube, A. C., J. Cabarrocas, et al. (2006). "Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption." *Gut* **55**(5): 630-637.
- Auer, K. L. and B. S. Jacobson (1995). "Beta 1 integrins signal lipid second messengers required during cell adhesion." *Mol Biol Cell* **6**(10): 1305-1313.
- Auricchio, A., G. Casari, et al. (1996). "Endothelin-B receptor mutations in patients with isolated Hirschsprung disease from a non-inbred population." *Hum Mol Genet* **5**(3): 351-354.

- Badner, J. A., W. K. Sieber, et al. (1990). "A genetic study of Hirschsprung disease." Am J Hum Genet **46**(3): 568-580.
- Bagnato, A., L. Rosano, et al. (2004). "Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression." Cancer Res **64**(4): 1436-1443.
- Balaban, N. Q., U. S. Schwarz, et al. (2001). "Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates." Nat Cell Biol **3**(5): 466-472.
- Barlow, A., E. de Graaff, et al. (2003). "Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET." Neuron **40**(5): 905-916.
- Barlow, A. J., A. S. Wallace, et al. (2008). "Critical numbers of neural crest cells are required in the pathways from the neural tube to the foregut to ensure complete enteric nervous system formation." Development **135**(9): 1681-1691.
- Baynash, A., K. Hosoda, et al. (1994). "Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons." Cell **79**: 1277-1285.
- Bershadsky, A. D., N. Q. Balaban, et al. (2003). "Adhesion-dependent cell mechanosensitivity." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 677-695.
- Boesmans, W., C. Cirillo, et al. (2013). "Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells." Neurogastroenterology & Motility **25**(2): e151-e160.
- Boesmans, W., R. Lasrado, et al. (2015). "Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system." Glia **63**(2): 229-241.
- Bondurand, N., D. Natarajan, et al. (2006). "Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling." Development **133**(10): 2075-2086.
- Bondurand, N., D. Natarajan, et al. (2003). "Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures." Development **130**(25): 6387-6400.
- Boudou, T., J. Ohayon, et al. (2006). "An extended relationship for the characterization of Young's modulus and Poisson's ratio of tunable polyacrylamide gels." Biorheology **43**(6): 721-728.
- Bouvard, D., C. Brakebusch, et al. (2001). "Functional Consequences of Integrin Gene Mutations in Mice." Circulation Research **89**(3): 211-223.
- Bouvard, D., J. Pouwels, et al. (2013). "Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(7): 430-442.
- Breau, M. A., A. Dahmani, et al. (2009). "Beta1 integrins are required for the invasion of the caecum and proximal hindgut by enteric neural crest cells." Development **136**(16): 2791-2801.
- Breau, M. A. and S. Dufour (2009). Biological development of the enteric nervous system. in "Hirschsprung's disease: diagnosis and treatment." New York, Nova.
- Breau, M. A., T. Pietri, et al. (2006). "Lack of beta1 integrins in enteric neural crest cells leads to a Hirschsprung-like phenotype." Development **133**(9): 1725-1734.
- Britsch, S., D. E. Goerich, et al. (2001). "The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development." Genes Dev **15**(1): 66-78.
- Broders-Bondon, F., P. Paul-Gilloteaux, et al. (2012). "N-cadherin and beta1-integrins cooperate during the development of the enteric nervous system." Dev Biol **364**(2): 178-191.

- Broders-Bondon, F., P. Paul-Gilloteaux, et al. (2016). "Control of the collective migration of enteric neural crest cells by the Complement anaphylatoxin C3a and N-cadherin." *Dev Biol* **414**(1): 85-99.
- Bronner, M. E. and N. M. LeDouarin (2012). "Development and evolution of the neural crest: an overview." *Dev Biol* **366**(1): 2-9.
- Brookes, S. J. (2001). "Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine." *Anat Rec* **262**(1): 58-70.
- Brugnera, E., L. Haney, et al. (2002). "Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex." *Nat Cell Biol* **4**(8): 574-582.
- Bulbring, E., R. C. Lin, et al. (1958). "An investigation of the peristaltic reflex in relation to anatomical observations." *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* **43**(1): 26-37.
- Burns, A. J., A. M. Goldstein, et al. (2016). "White paper on guidelines concerning enteric nervous system stem cell therapy for enteric neuropathies." *Dev Biol*.
- Burns, A. J. and N. M. Le Douarin (1998). "The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system." *Development* **125**: 4335-4347.
- Burns, R. C., T. J. Fairbanks, et al. (2004). "Requirement for fibroblast growth factor 10 or fibroblast growth factor receptor 2-IIIb signaling for cecal development in mouse." *Developmental Biology* **265**(1): 61-74.
- Burns, R. C., T. J. Fairbanks, et al. (2004). "Requirement for fibroblast growth factor 10 or fibroblast growth factor receptor 2-IIIb signaling for cecal development in mouse." *Dev Biol* **265**(1): 61-74.
- Burstyn-Cohen, T. (2004). "Canonical Wnt activity regulates trunk neural crest delamination linking BMP/noggin signaling with G1/S transition." *Development* **131**(21): 5327-5339.
- Bush, T. G., T. C. Savidge, et al. (1998). "Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice." *Cell* **93**(2): 189-201.
- Byron, A. and M. C. Frame (2016). "Adhesion protein networks reveal functions proximal and distal to cell-matrix contacts." *Curr Opin Cell Biol* **39**: 93-100.
- Cacalano, G., I. Farinas, et al. (1998). "GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney." *Neuron* **21**(1): 53-62.
- Calderwood, D. A., B. Yan, et al. (2002). "The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins." *J Biol Chem* **277**(24): 21749-21758.
- Calderwood, D. A., R. Zent, et al. (1999). "The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation." *J Biol Chem* **274**(40): 28071-28074.
- Cantrell, V. A. (2004). "Interactions between Sox10 and EdnrB modulate penetrance and severity of aganglionosis in the Sox10Dom mouse model of Hirschsprung disease." *Human Molecular Genetics* **13**(19): 2289-2301.
- Carbone, S. E., V. Jovanovska, et al. (2014). "Human enteric neurons: morphological, electrophysiological, and neurochemical identification." *Neurogastroenterol Motil* **26**(12): 1812-1816.
- Carisey, A., R. Tsang, et al. (2013). "Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner." *Current biology : CB* **23**(4): 271-281.
- Carmona-Fontaine, C., E. Theveneau, et al. (2011). "Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration." *Developmental cell* **21**(6): 1026-1037.

- Carrasquillo, M. M., A. S. McCallion, et al. (2002). "Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease." *Nature Genetics* **32**(2): 237-244.
- Case, L. B., M. A. Baird, et al. (2015). "Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions." *Nat Cell Biol* **17**(7): 880-892.
- Cervantes, S., T. P. Yamaguchi, et al. (2009). "Wnt5a is essential for intestinal elongation in mice." *Dev Biol* **326**(2): 285-294.
- Chakravarti, A. (1996). "Endothelin receptor-mediated signaling in hirschsprung disease." *Hum Mol Genet* **5**(3): 303-307.
- Chalazonitis, A. (2004). "Bone Morphogenetic Protein-2 and -4 Limit the Number of Enteric Neurons But Promote Development of a TrkC-Expressing Neurotrophin-3-Dependent Subset." *Journal of Neuroscience* **24**(17): 4266-4282.
- Chalazonitis, A., T. P. Rothman, et al. (1998). "Age-dependent differences in the effects of GDNF and NT-3 on the development of neurons and glia from neural crest-derived precursors immunoselected from the fetal rat gut: expression of GFRalpha-1 in vitro and in vivo." *Dev Biol* **204**(2): 385-406.
- Chalazonitis, A., V. M. Tennyson, et al. (1997). "The alpha1 subunit of laminin-1 promotes the development of neurons by interacting with LBP110 expressed by neural crest-derived cells immunoselected from the fetal mouse gut." *J Neurobiol* **33**(2): 118-138.
- Chalpe, A. J., M. Prasad, et al. (2010). "Regulation of cadherin expression in the chicken neural crest by the Wnt/ β -catenin signaling pathway." *Cell Adhesion & Migration* **4**(3): 431-438.
- Chang, S.-W. and M. J. Buehler (2014). "Molecular biomechanics of collagen molecules." *Materials Today* **17**(2): 70-76.
- Chen, W., J. Lou, et al. (2012). "Observing force-regulated conformational changes and ligand dissociation from a single integrin on cells." *J Cell Biol* **199**(3): 497-512.
- Chen, X., O. Nadiarynk, et al. (2012). "Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure." *Nat Protoc* **7**(4): 654-669.
- Cheung, M., M.-C. Chaboissier, et al. (2005). "The Transcriptional Control of Trunk Neural Crest Induction, Survival, and Delamination." *Developmental Cell* **8**(2): 179-192.
- Chigaev, A., T. Buranda, et al. (2003). "FRET detection of cellular alpha4-integrin conformational activation." *Biophys J* **85**(6): 3951-3962.
- Choi, C. K., M. Vicente-Manzanares, et al. (2008). "Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner." *Nat Cell Biol* **10**(9): 1039-1050.
- Choquet, D., D. P. Felsenfeld, et al. (1997). "Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages." *Cell* **88**: 39-48.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. and K. Burridge (1996). "Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions." *J Cell Biol* **133**(6): 1403-1415.
- Chu, Y. S., O. Eder, et al. (2006). "Prototypical type I E-cadherin and type II cadherin-7 mediate very distinct adhesiveness through their extracellular domains." *The Journal of biological chemistry* **281**(5): 2901-2910.
- Cirillo, C., G. Sarnelli, et al. (2011). "Proinflammatory stimuli activates human-derived enterogial cells and induces autocrine nitric oxide production." *Neurogastroenterology & Motility* **23**(9): e372-e382.
- Coelho-Aguiar, J. d. M., A. C. Bon-Frauches, et al. (2015). "The Enteric Glia: Identity and Functions." *Glia* **63**(6): 921-935.

- Conner, P. J., P. J. Focke, et al. (2003). "Appearance of neurons and glia with respect to the wavefront during colonization of the avian gut by neural crest cells." Developmental Dynamics **226**(1): 91-98.
- Corpening, J. C., V. A. Cantrell, et al. (2008). "A Histone2BCerulean BAC transgene identifies differential expression of Phox2b in migrating enteric neural crest derivatives and enteric glia." Dev Dyn **237**(4): 1119-1132.
- Corpening, J. C., K. K. Deal, et al. (2011). "Isolation and live imaging of enteric progenitors based on Sox10-Histone2BVenus transgene expression." genesis **49**(7): 599-618.
- Costa, M. (2000). "Anatomy and physiology of the enteric nervous system." Gut **47**(90004): 15iv-19.
- Costa, M., S. J. Brookes, et al. (1996). "Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum." Neuroscience **75**(3): 949-967.
- Critchley, D. R. (2009). "Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin." Annu Rev Biophys **38**: 235-254.
- Dady, A., C. Blavet, et al. (2012). "Timing and kinetics of E- to N-cadherin switch during neurulation in the avian embryo." Dev Dyn **241**(8): 1333-1349.
- Dang, I., R. Gorelik, et al. (2013). "Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration." Nature **503**(7475): 281-284.
- Danilov, Y. N. and R. L. Juliano (1989). "(Arg-Gly-Asp)n-albumin conjugates as a model substratum for integrin-mediated cell adhesion." Exp Cell Res **182**(1): 186-196.
- Davenport, A. P., K. A. Hyndman, et al. (2016). "Endothelin." Pharmacol Rev **68**(2): 357-418.
- de Graaff, E., S. Srinivas, et al. (2001). "Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis." Genes Dev **15**(18): 2433-2444.
- De Melker, A. A., D. Kramer, et al. (1997). "The two phenylalanines in the GFFKR motif of the integrin alpha6A subunit are essential for heterodimerization." Biochem J **328 (Pt 2)**: 529-537.
- De Santa Barbara, P., J. Williams, et al. (2005). "Bone morphogenetic protein signaling pathway plays multiple roles during gastrointestinal tract development." Developmental Dynamics **234**(2): 312-322.
- Deakin, N. O. and C. E. Turner (2008). "Paxillin comes of age." J Cell Sci **121**(Pt 15): 2435-2444.
- del Rio, A., R. Perez-Jimenez, et al. (2009). "Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding." Science **323**(5914): 638-641.
- DeMali, K. A., C. A. Barlow, et al. (2002). "Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion." J Cell Biol **159**(5): 881-891.
- Di Giovangiulio, M., S. Verheijden, et al. (2015). "The Neuromodulation of the Intestinal Immune System and Its Relevance in Inflammatory Bowel Disease." Front Immunol **6**: 590.
- Doyle, A. D. and K. M. Yamada (2016). "Mechanosensing via cell-matrix adhesions in 3D microenvironments." Exp Cell Res **343**(1): 60-66.
- Druckenbrod, N. R. and M. L. Epstein (2005). "The pattern of neural crest advance in the cecum and colon." Developmental Biology **287**(1): 125-133.
- Druckenbrod, N. R. and M. L. Epstein (2007). "Behavior of enteric neural crest-derived cells varies with respect to the migratory wavefront." Developmental Dynamics **236**(1): 84-92.

- Druckenbrod, N. R. and M. L. Epstein (2009). "Age-dependent changes in the gut environment restrict the invasion of the hindgut by enteric neural progenitors." Development **136**(18): 3195-3203.
- du Roure, O., A. Saez, et al. (2005). "Force mapping in epithelial cell migration." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(7): 2390-2395.
- Duband, J.-L., A. Dady, et al. (2015). "Resolving Time and Space Constraints During Neural Crest Formation and Delamination." **111**: 27-67.
- Dufour, S., F. Broders-Bondon, et al. (2015). " β 1-Integrin Function and Interplay during Enteric Nervous System Development." 153-166.
- Dumbauld, D. W., T. T. Lee, et al. (2013). "How vinculin regulates force transmission." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(24): 9788-9793.
- Dumbauld, D. W., H. Shin, et al. (2010). "Contractility modulates cell adhesion strengthening through focal adhesion kinase and assembly of vinculin-containing focal adhesions." J Cell Physiol **223**(3): 746-756.
- Dupont, S., L. Morsut, et al. (2011). "Role of YAP/TAZ in mechanotransduction." Nature **474**(7350): 179-183.
- Durbec, P. L., L. B. Larsson-Blomberg, et al. (1996). "Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts." Development **122**(1): 349-358.
- Edery, P., T. Attie, et al. (1996). "Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome)." Nat Genet **12**(4): 442-444.
- Edery, P., S. Lyonnet, et al. (1994). "Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease." Nature **367**(6461): 378-380.
- Elosegui-Artola, A., R. Oria, et al. (2016). "Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity." Nat Cell Biol **18**(5): 540-548.
- Engler, A. J., S. Sen, et al. (2006). "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." Cell **126**(4): 677-689.
- Enomoto, H., T. Araki, et al. (1998). "GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys." Neuron **21**(2): 317-324.
- Epstein, M. L., T. Mikawa, et al. (1994). "Mapping the origin of the avian enteric nervous system with a retroviral marker." Dev Dyn **201**(3): 236-244.
- Fairman, C. L., M. Clagett-Dame, et al. (1995). "Appearance of neurons in the developing chick gut." Dev Dyn **204**(2): 192-201.
- Fässler, R. and M. Meyer (1995). "Consequence of lack of β 1 integrin gene expression in mice." Genes Dev. **9**: 1896-1908.
- Fässler, R., M. Pfaff, et al. (1995). "Lack of β 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts." J. Cell Biol. **128**: 979-988.
- Faure, S., J. McKey, et al. (2015). "Enteric neural crest cells regulate vertebrate stomach patterning and differentiation." Development **142**(2): 331-342.
- Fekete, N. C., C. Ricour, et al. (1986). "Total colonic aganglionosis (with or without ileal involvement): a review of 27 cases." J Pediatr Surg **21**(3): 251-254.
- Flanagan, L. A., Y. E. Ju, et al. (2002). "Neurite branching on deformable substrates." Neuroreport **13**(18): 2411-2415.
- Friedl, P. and K. Wolf (2010). "Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model." J Cell Biol **188**(1): 11-19.

- Friedland, J. C., M. H. Lee, et al. (2009). "Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function." *Science* **323**(5914): 642-644.
- Fu, M. (2004). "Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut." *The Journal of Cell Biology* **166**(5): 673-684.
- Fu, M., Y. Sato, et al. (2010). "Vitamin A facilitates enteric nervous system precursor migration by reducing Pten accumulation." *Development* **137**(4): 631-640.
- Fu, M., P. K. Tam, et al. (2004). "Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study." *Anat Embryol (Berl)* **208**(1): 33-41.
- Fu, M., B. P. S. Vohra, et al. (2006). "BMP signaling regulates murine enteric nervous system precursor migration, neurite fasciculation, and patterning via altered Ncam1 polysialic acid addition." *Developmental Biology* **299**(1): 137-150.
- Furness, J. B. (2006). *The Enteric Nervous System*.
- Furness, J. B. (2006). "The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections." *Auton Neurosci* **130**(1-2): 1-5.
- Furness, J. B. (2012). "The enteric nervous system and neurogastroenterology." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**(5): 286-294.
- Galbraith, C. G., K. M. Yamada, et al. (2002). "The relationship between force and focal complex development." *J Cell Biol* **159**(4): 695-705.
- Gammill, L. S. and M. Bronner-Fraser (2003). "Neural crest specification: migrating into genomics." *Nature Reviews Neuroscience* **4**(10): 795-805.
- Gao, N., P. White, et al. (2009). "Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2." *Dev Cell* **16**(4): 588-599.
- Gardel, M. L., B. Sabass, et al. (2008). "Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed." *The Journal of Cell Biology* **183**(6): 999-1005.
- Geiger, B. and K. M. Yamada (2011). "Molecular architecture and function of matrix adhesions." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**(5).
- Gianino, S. (2003). "GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation." *Development* **130**(10): 2187-2198.
- Giannone, G., R.-M. Mège, et al. (2009). "Multi-level molecular clutches in motile cell processes." *Trends in Cell Biology* **19**(9): 475-486.
- Goldmann, W. H. (2016). "Role of vinculin in cellular mechanotransduction." *Cell Biol Int* **40**(3): 241-256.
- Goldstein, A. M., K. C. Brewer, et al. (2005). "BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system." *Mechanisms of Development* **122**(6): 821-833.
- Goldstein, A. M. and N. Nagy (2008). "A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo." *Pediatr Res* **64**(4): 326-333.
- Goldstein, A. M. and N. Nagy (2008). "A Bird's Eye View of Enteric Nervous System Development: Lessons From the Avian Embryo." *Pediatric Research* **64**(4): 326-333.
- Goto, A., K. Sumiyama, et al. (2013). "GDNF and endothelin 3 regulate migration of enteric neural crest-derived cells via protein kinase A and Rac1." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**(11): 4901-4912.
- Grainger, S., J. G. Savory, et al. (2010). "Cdx2 regulates patterning of the intestinal epithelium." *Dev Biol* **339**(1): 155-165.

- Gu, Z., F. Liu, et al. (2014). "Soft matrix is a natural stimulator for cellular invasiveness." *Mol Biol Cell* **25**(4): 457-469.
- Hansen, M. B. (2003). "Neurohumoral control of gastrointestinal motility." *Physiol Res* **52**(1): 1-30.
- Hao, M. M., R. B. Anderson, et al. (2009). "The migratory behavior of immature enteric neurons." *Dev Neurobiol* **69**(1): 22-35.
- Hao, M. M., J. C. Bornstein, et al. (2013). "The emergence of neural activity and its role in the development of the enteric nervous system." *Dev Biol* **382**(1): 365-374.
- Hao, M. M., R. E. Moore, et al. (2010). "The role of neural activity in the migration and differentiation of enteric neuron precursors." *Neurogastroenterol Motil* **22**(5): e127-137.
- Hao, M. M. and H. M. Young (2009). "Development of enteric neuron diversity." *Journal of cellular and molecular medicine* **13**(7): 1193-1210.
- Harburger, D. S., M. Bouaouina, et al. (2009). "Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects." *J Biol Chem* **284**(17): 11485-11497.
- Heanue, T. A. and V. Pachnis (2007). "Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies." *Nature Reviews Neuroscience* **8**(6): 466-479.
- Hearn, C. and D. Newgreen (2000). "Lumbo-sacral neural crest contributes to the avian enteric nervous system independently of vagal neural crest." *Dev Dyn* **218**(3): 525-530.
- Hearn, C. J., M. Murphy, et al. (1998). "GDNF and ET-3 differentially modulate the numbers of avian enteric neural crest cells and enteric neurons in vitro." *Dev Biol* **197**(1): 93-105.
- Heath, J. K. (2010). "Transcriptional Networks and Signaling Pathways that Govern Vertebrate Intestinal Development." **90**: 159-192.
- Herbarth, B., V. Pingault, et al. (1998). "Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5161-5165.
- Heuckeroth, R. O., H. Enomoto, et al. (1999). "Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons." *Neuron* **22**(2): 253-263.
- Heuckeroth, R. O., P. A. Lampe, et al. (1998). "Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro." *Dev Biol* **200**(1): 116-129.
- Heuckeroth, R. O. and K. H. Schafer (2016). "Gene-environment interactions and the enteric nervous system: Neural plasticity and Hirschsprung disease prevention." *Dev Biol*.
- Hoff, S., F. Zeller, et al. (2008). "Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody." *The Journal of Comparative Neurology* **509**(4): 356-371.
- Hofstra, R. M., J. Osinga, et al. (1996). "A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome)." *Nat Genet* **12**(4): 445-447.
- Hofstra, R. M., O. Valdenaire, et al. (1999). "A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) associated with Hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction." *Am J Hum Genet* **64**(1): 304-308.

- Horton, E. R., P. Astudillo, et al. (2016). "Mechanosensitivity of integrin adhesion complexes: role of the consensus adhesome." *Exp Cell Res* **343**(1): 7-13.
- Hosoda, K., R. E. Hammer, et al. (1994). "Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice." *Cell* **79**(7): 1267-1276.
- Hotta, R., R. B. Anderson, et al. (2010). "Effects of tissue age, presence of neurones and endothelin-3 on the ability of enteric neurone precursors to colonize recipient gut: implications for cell-based therapies." *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* **22**(3): 331-e386.
- Hotta, R., L. A. Stamp, et al. (2013). "Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon." *The Journal of clinical investigation* **123**(3): 1182-1191.
- Hughes, P. E., F. Diaz-Gonzalez, et al. (1996). "Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling." *J Biol Chem* **271**(12): 6571-6574.
- Hughes, P. E., T. E. O'Toole, et al. (1995). "The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity." *J Biol Chem* **270**(21): 12411-12417.
- Humphries, J. D., P. Wang, et al. (2007). "Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin." *J Cell Biol* **179**(5): 1043-1057.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* **110**(6): 673-687.
- Hynes, R. O. and A. D. Lander (1992). "Contact and adhesive specificities in the associations, migration, and targetting of cells and axons." *Cell* **68**: 303-322.
- Hytonen, V. P. and V. Vogel (2008). "How force might activate talin's vinculin binding sites: SMD reveals a structural mechanism." *PLoS Comput Biol* **4**(2): e24.
- Hytonen, V. P. and B. Wehrle-Haller (2016). "Mechanosensing in cell-matrix adhesions - Converting tension into chemical signals." *Exp Cell Res* **343**(1): 35-41.
- Inoue, A., M. Yanagisawa, et al. (1989). "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2863-2867.
- Ivaska, J. and J. Heino (2011). "Cooperation Between Integrins and Growth Factor Receptors in Signaling and Endocytosis." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **27**(1): 291-320.
- Jiang, Y. (2003). "Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas." *Developmental Biology* **258**(2): 364-384.
- Kanchanawong, P., G. Shtengel, et al. (2010). "Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions." *Nature* **468**(7323): 580-584.
- Kang, H. Y., W. H. Kang, et al. (1998). "Endothelin-B receptor-mediated Ca²⁺ signaling in human melanocytes." *Pflugers Arch* **435**(3): 350-356.
- Kapur, R. (2000). "Colonization of the Murine Hindgut by Sacral Crest-Derived Neural Precursors: Experimental Support for an Evolutionarily Conserved Model." *Developmental Biology* **227**(1): 146-155.
- Kapur, R. P. (1999). "Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10(Dom)/Sox10(Dom) mouse embryos." *Pediatr Dev Pathol* **2**(6): 559-569.

- Kapur, R. P., D. A. Sweetser, et al. (1995). "Intercellular signals downstream of endothelin receptor-B mediate colonization of the large intestine by enteric neuroblasts." Development **121**(11): 3787-3795.
- kapur, R. P., C. Yost, et al. (1992). "A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice." Development **116**: 167-175.
- Kapur, R. P., C. Yost, et al. (1992). "A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice." Development **116**(1): 167-175.
- Kim, C., F. Ye, et al. (2011). "Regulation of integrin activation." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 321-345.
- Kim, D. H. and D. Wirtz (2013). "Focal adhesion size uniquely predicts cell migration." The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **27**(4): 1351-1361.
- Kim, M., C. V. Carman, et al. (2003). "Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins." Science **301**(5640): 1720-1725.
- Kloeker, S., M. B. Major, et al. (2004). "The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion." J Biol Chem **279**(8): 6824-6833.
- Knight, C. G., L. F. Morton, et al. (2000). "The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens." J Biol Chem **275**(1): 35-40.
- Kolterud, A., A. S. Grosse, et al. (2009). "Paracrine Hedgehog signaling in stomach and intestine: new roles for hedgehog in gastrointestinal patterning." Gastroenterology **137**(2): 618-628.
- Koyama, Y., Y. Yoshioka, et al. (2000). "Endothelins increase tyrosine phosphorylation of astrocytic focal adhesion kinase and paxillin accompanied by their association with cytoskeletal components." Neuroscience **101**(1): 219-227.
- Krause, M. and A. Gautreau (2014). "Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(9): 577-590.
- Kruger, G. M., J. T. Mosher, et al. (2002). "Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness." Neuron **35**(4): 657-669.
- Kruger, G. M., J. T. Mosher, et al. (2003). "Temporally distinct requirements for endothelin receptor B in the generation and migration of gut neural crest stem cells." Neuron **40**(5): 917-929.
- Kuhlbrodt, K., B. Herbarth, et al. (1998). "Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **18**(1): 237-250.
- Lai, F. P., M. Szczodrak, et al. (2008). "Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia." Embo J **27**(7): 982-992.
- Lake, J. I. and R. O. Heuckeroth (2013). "Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease." American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology **305**(1): G1-24.
- Landman, K. A., M. J. Simpson, et al. (2007). "Mathematical and experimental insights into the development of the enteric nervous system and Hirschsprung's disease." Dev Growth Differ **49**(4): 277-286.

- Lane, P. W. (1966). "Association of megacolon with two recessive spotting genes in the mouse." *J Hered* **57**(1): 29-31.
- Lane, P. W. and H. M. Liu (1984). "Association of megacolon with a new dominant spotting gene (Dom) in the mouse." *J Hered* **75**(6): 435-439.
- Lang, D., F. Chen, et al. (2000). "Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret." *J Clin Invest* **106**(8): 963-971.
- Lange, K., M. Kammerer, et al. (2007). "Endothelin Receptor Type B Counteracts Tenascin-C-Induced Endothelin Receptor Type A-Dependent Focal Adhesion and Actin Stress Fiber Disorganization." *Cancer Research* **67**(13): 6163-6173.
- Laranjeira, C., K. Sandgren, et al. (2011). "Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury." *J Clin Invest* **121**(9): 3412-3424.
- Larson, R. S., A. L. Corbi, et al. (1989). "Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily." *J Cell Biol* **108**(2): 703-712.
- Lau, T. L., C. Kim, et al. (2009). "The structure of the integrin alphaIIb beta3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling." *EMBO J* **28**(9): 1351-1361.
- Le Douarin, N. M. (2004). "Neural crest cell plasticity and its limits." *Development* **131**(19): 4637-4650.
- Le Douarin, N. M. and M. A. Teillet (1973). "The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo." *J Embryol Exp Morphol* **30**(1): 31-48.
- Lebensohn, A. M. and M. W. Kirschner (2009). "Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly." *Mol Cell* **36**(3): 512-524.
- Lee, H. (2003). "The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors." *Developmental Biology* **259**(1): 162-175.
- Lee, J. O., P. Rieu, et al. (1995). "Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)." *Cell* **80**(4): 631-638.
- Lee, R. T. H., H. Nagai, et al. (2013). "Cell delamination in the mesencephalic neural fold and its implication for the origin of ectomesenchyme." *Development* **140**(24): 4890-4902.
- Lee, S. E., R. D. Kamm, et al. (2007). "Force-induced activation of talin and its possible role in focal adhesion mechanotransduction." *J Biomech* **40**(9): 2096-2106.
- Leibl, M. A., T. Ota, et al. (1999). "Expression of endothelin 3 by mesenchymal cells of embryonic mouse caecum." *Gut* **44**(2): 246-252.
- Liu, J. P. and T. M. Jessell (1998). "A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube." *Development* **125**(24): 5055-5067.
- Lo, C. M., H. B. Wang, et al. (2000). "Cell movement is guided by the rigidity of the substrate." *Biophysical journal* **79**(1): 144-152.
- Lomax, A. E. and J. B. Furness (2000). "Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon." *Cell Tissue Res* **302**(1): 59-72.
- Lomax, A. E., K. A. Sharkey, et al. (1999). "Correlation of morphology, electrophysiology and chemistry of neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig distal colon." *J Auton Nerv Syst* **76**(1): 45-61.
- Luo, B. H., T. A. Springer, et al. (2004). "A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand." *PLoS Biol* **2**(6): e153.

- Ma, Y. Q., J. Qin, et al. (2008). "Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins." *J Cell Biol* **181**(3): 439-446.
- Maka, M., C. Claus Stolt, et al. (2005). "Identification of Sox8 as a modifier gene in a mouse model of Hirschsprung disease reveals underlying molecular defect." *Developmental Biology* **277**(1): 155-169.
- Mao, Y. and J. E. Schwarzbauer (2005). "Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process." *Matrix Biology* **24**(6): 389-399.
- Margadant, C., H. N. Monsuur, et al. (2011). "Mechanisms of integrin activation and trafficking." *Curr Opin Cell Biol* **23**(5): 607-614.
- Marshall, K. L. and E. A. Lumpkin (2012). "The molecular basis of mechanosensory transduction." *Adv Exp Med Biol* **739**: 142-155.
- Martel, V., C. Racaud-Sultan, et al. (2001). "Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides." *J Biol Chem* **276**(24): 21217-21227.
- Maruccio, L., C. Lucini, et al. (2008). "The development of avian enteric nervous system: distribution of artemin immunoreactivity." *Acta Histochem.* **110**(2): 163-171. Epub 2007 Nov 2026.
- McCallion, A. S., E. Stames, et al. (2003). "Phenotype variation in two-locus mouse models of Hirschsprung disease: tissue-specific interaction between Ret and Ednrb." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1826-1831.
- Milet, C. and A. H. Monsoro-Burq (2012). "Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates." *Developmental Biology* **366**(1): 22-33.
- Mitchison, T. and M. Kirschner (1988). "Cytoskeletal dynamics and nerve growth." *Neuron* **1**(9): 761-772.
- Miyamoto, S., S. K. Akiyama, et al. (1995). "Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function." *Science* **267**: 883-885.
- Montanez, E., S. Ussar, et al. (2008). "Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins." *Genes Dev* **22**(10): 1325-1330.
- Moore, M. W., R. D. Klein, et al. (1996). "Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF." *Nature* **382**(6586): 76-79.
- Moore, S. W., P. Roca-Cusachs, et al. (2010). "Stretchy Proteins on Stretchy Substrates: The Important Elements of Integrin-Mediated Rigidity Sensing." *Developmental Cell* **19**(2): 194-206.
- Morishita, R., H. Ueda, et al. (2007). "Involvement of Gq/11 in both integrin signal-dependent and -independent pathways regulating endothelin-induced neural progenitor proliferation." *Neurosci Res* **59**(2): 205-214.
- Moser, M., M. Bauer, et al. (2009). "Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells." *Nat Med* **15**(3): 300-305.
- Moser, M., B. Nieswandt, et al. (2008). "Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation." *Nat Med* **14**(3): 325-330.
- Nagae, M., S. Re, et al. (2012). "Crystal structure of alpha5beta1 integrin ectodomain: atomic details of the fibronectin receptor." *J Cell Biol* **197**(1): 131-140.
- Nagy, N., C. Barad, et al. (2016). "Sonic hedgehog controls enteric nervous system development by patterning the extracellular matrix." *Development* **143**(2): 264-275.
- Nagy, N. and A. M. Goldstein (2006). "Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system." *Developmental Biology* **293**(1): 203-217.

- Nakagawa, S. and M. Takeichi (1998). "Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression." *Development* **125**(15): 2963-2971.
- Nataf, V., A. Amemiya, et al. (1998). "The expression pattern of endothelin 3 in the avian embryo." *Mech Dev* **73**(2): 217-220.
- Natarajan, D., C. Marcos-Gutierrez, et al. (2002). "Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis." *Development* **129**(22): 5151-5160.
- Neilson, I. R. and S. Yazbeck (1990). "Ultrashort Hirschsprung's disease: myth or reality." *J Pediatr Surg* **25**(11): 1135-1138.
- Neunlist, M. (2007). "Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**: G231-G241.
- Newgreen, D. F. and L. Hartley (1995). "Extracellular matrix and adhesive molecules in the early development of the gut and its innervation in normal and spotting lethal rat embryos." *Acta Anat (Basel)* **154**(4): 243-260.
- Newgreen, D. F., B. Southwell, et al. (1996). "Migration of enteric neural crest cells in relation to growth of the gut in avian embryos." *Acta Anat (Basel)* **157**(2): 105-115.
- Nishiyama, C., T. Uesaka, et al. (2012). "Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system." *Nature neuroscience* **15**(9): 1211-1218.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." *Cell* **81**(1): 53-62.
- O'Toole, T. E., Y. Katagiri, et al. (1994). "Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction." *J Cell Biol* **124**(6): 1047-1059.
- Obermayr, F., R. Hotta, et al. (2013). "Development and developmental disorders of the enteric nervous system." *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **10**(1): 43-57.
- Owens, S. E., K. W. Broman, et al. (2005). "Genome-wide linkage identifies novel modifier loci of aganglionosis in the Sox10Dom model of Hirschsprung disease." *Hum Mol Genet* **14**(11): 1549-1558.
- Pachnis, V., B. Mankoo, et al. (1993). "Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis." *Development* **119**(4): 1005-1017.
- Padrick, S. B., H. C. Cheng, et al. (2008). "Hierarchical regulation of WASP/WAVE proteins." *Mol Cell* **32**(3): 426-438.
- Pankov, R., E. Cukierman, et al. (2000). "Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis." *J Cell Biol* **148**(5): 1075-1090.
- Paratore, C., C. Eichenberger, et al. (2002). "Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease." *Hum Mol Genet* **11**(24): 3075-3085.
- Parsons, J. T., A. R. Horwitz, et al. (2010). "Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 633-643.
- Pattyn, A., X. Morin, et al. (1999). "The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives." *Nature* **399**(6734): 366-370.

- Payette, R. F., V. M. Tennyson, et al. (1988). "Accumulation of components of basal laminae: association with the failure of neural crest cells to colonize the presumptive aganglionic bowel of ls/l^s mutant mice." *Dev Biol* **125**(2): 341-360.
- Pelham, R. J., Jr. and Y. Wang (1997). "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13661-13665.
- Peters-van der Sanden, M. J., M. L. Kirby, et al. (1993). "Ablation of various regions within the avian vagal neural crest has differential effects on ganglion formation in the fore-, mid- and hindgut." *Dev Dyn* **196**(3): 183-194.
- Pietri, T., O. Eder, et al. (2003). "The human tissue plasminogen activator-Cre mouse: a new tool for targeting specifically neural crest cells and their derivatives in vivo." *Dev Biol* **259**(1): 176-187.
- Pietri, T., O. Eder, et al. (2004). "Conditional beta1-integrin gene deletion in neural crest cells causes severe developmental alterations of the peripheral nervous system." *Development* **131**(16): 3871-3883.
- Pingault, V., N. Bondurand, et al. (1998). "SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease." *Nat Genet* **18**(2): 171-173.
- Pomeranz, H. D., T. P. Rothman, et al. (1991). "Colonization of post-umbilical bowel by cells derived from sacral neural crest: direct tracing of cell migration using an intercalating probe and a replication-deficient retrovirus." *Development* **111**: 647-655.
- Pouwels, J., J. Nevo, et al. (2012). "Negative regulators of integrin activity." *J Cell Sci* **125**(Pt 14): 3271-3280.
- Prasad, M. S., T. Sauka-Spengler, et al. (2012). "Induction of the neural crest state: Control of stem cell attributes by gene regulatory, post-transcriptional and epigenetic interactions." *Developmental Biology* **366**(1): 10-21.
- Puffenberger, E. G., K. Hosoda, et al. (1994). "A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease." *Cell* **79**(7): 1257-1266.
- Ramalho-Santos, M., D. A. Melton, et al. (2000). "Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development." *Development* **127**(12): 2763-2772.
- Régent, M., E. Planus, et al. (2011). "Specificities of β 1 integrin signaling in the control of cell adhesion and adhesive strength." *European Journal of Cell Biology* **90**(2-3): 261-269.
- Reinhard, M., K. Jouvenal, et al. (1995). "Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7956-7960.
- Riveline, D., E. Zamir, et al. (2001). "Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism." *J Cell Biol* **153**(6): 1175-1186.
- Roberts, D. J. (2000). "Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract." *Dev Dyn* **219**(2): 109-120.
- Roberts, D. J., R. L. Johnson, et al. (1995). "Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut." *Development* **121**(10): 3163-3174.
- Roberts, D. J., D. M. Smith, et al. (1998). "Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut." *Development* **125**(15): 2791-2801.
- Romeo, G., P. Ronchetto, et al. (1994). "Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease." *Nature* **367**(6461): 377-378.

- Rothman, T. P., J. Chen, et al. (1996). "Increased expression of laminin-1 and collagen (IV) subunits in the aganglionic bowel of ls/ls, but not c-ret $-/-$ mice." *Dev Biol* **178**(2): 498-513.
- Rottner, K., A. Hall, et al. (1999). "Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics." *Curr Biol* **9**(12): 640-648.
- Rubanyi, G. M. and M. A. Polokoff (1994). "Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology." *Pharmacol Rev* **46**(3): 325-415.
- Salomon, R., T. Attie, et al. (1996). "Germline mutations of the RET ligand GDNF are not sufficient to cause Hirschsprung disease." *Nat Genet* **14**(3): 345-347.
- Sanchez, M. P., I. Silos-Santiago, et al. (1996). "Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF." *Nature* **382**(6586): 70-73.
- Sariola, H. (2003). "Novel functions and signalling pathways for GDNF." *Journal of Cell Science* **116**(19): 3855-3862.
- Sasselli, V., V. Pachnis, et al. (2012). "The enteric nervous system." *Dev Biol* **366**(1): 64-73.
- Savin, T., N. A. Kurpios, et al. (2011). "On the growth and form of the gut." *Nature* **476**(7358): 57-62.
- Sawada, Y., M. Tamada, et al. (2006). "Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas." *Cell* **127**(5): 1015-1026.
- Scales, T. M. and M. Parsons (2011). "Spatial and temporal regulation of integrin signalling during cell migration." *Curr Opin Cell Biol* **23**(5): 562-568.
- Schaller, M. D. and J. T. Parsons (1995). "pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2635-2645.
- Schill, E. M., J. I. Lake, et al. (2016). "Ibuprofen slows migration and inhibits bowel colonization by enteric nervous system precursors in zebrafish, chick and mouse." *Dev Biol* **409**(2): 473-488.
- Schiller, H. B. and R. Fassler (2013). "Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions." *EMBO reports* **14**(6): 509-519.
- Schiller, H. B., C. C. Friedel, et al. (2011). "Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins." *EMBO Rep* **12**(3): 259-266.
- Schiltz, C. A., J. Benjamin, et al. (1999). "Expression of the GDNF receptors ret and GFRalpha1 in the developing avian enteric nervous system." *J Comp Neurol* **414**(2): 193-211.
- Schuchardt, A., V. D'Agati, et al. (1994). "Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret." *Nature* **367**(6461): 380-383.
- Sekimoto, T., K. Yoshinobu, et al. (1998). "Region-specific expression of murine Hox genes implies the Hox code-mediated patterning of the digestive tract." *Genes Cells* **3**(1): 51-64.
- Sen, S., W. P. Ng, et al. (2012). "Contributions of talin-1 to glioma cell-matrix tensional homeostasis." *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* **9**(71): 1311-1317.
- Serbedzija, G. N., S. Burgan, et al. (1991). "Vital dye labeling demonstrates a sacral neural crest contribution to the enteric nervous system of chick and mouse embryos." *Development* **111**: 857-866.

- Serreels, B., A. Serreels, et al. (2007). "Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex." *Nat Cell Biol* **9**(9): 1046-1056.
- Shen, L., J. G. Pichel, et al. (2002). "Gdnf haploinsufficiency causes Hirschsprung-like intestinal obstruction and early-onset lethality in mice." *Am J Hum Genet* **70**(2): 435-447.
- Shin, M. K., J. M. LeVorse, et al. (1999). "The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development." *Nature* **402**(6761): 496-501.
- Shoval, I., A. Ludwig, et al. (2007). "Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination." *Development* **134**(3): 491-501.
- Silberg, D. G., G. P. Swain, et al. (2000). "Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development." *Gastroenterology* **119**(4): 961-971.
- Simoes-Costa, M. and M. E. Bronner (2013). "Insights into neural crest development and evolution from genomic analysis." *Genome Research* **23**(7): 1069-1080.
- Simoes-Costa, M. and M. E. Bronner (2015). "Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe." *Development* **142**(2): 242-257.
- Simpson, M. J., K. A. Landman, et al. (2006). "Looking inside an invasion wave of cells using continuum models: Proliferation is the key." *Journal of Theoretical Biology* **243**(3): 343-360.
- Simpson, M. J., D. C. Zhang, et al. (2007). "Cell proliferation drives neural crest cell invasion of the intestine." *Developmental Biology* **302**(2): 553-568.
- Sims, P. J., M. H. Ginsberg, et al. (1991). "Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex." *J Biol Chem* **266**(12): 7345-7352.
- Smith, M. A., L. M. Hoffman, et al. (2014). "LIM proteins in actin cytoskeleton mechanoresponse." *Trends Cell Biol* **24**(10): 575-583.
- Soret, R., M. Mennetrey, et al. (2015). "A collagen VI-dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease." *J Clin Invest* **125**(12): 4483-4496.
- Southard-Smith, E. M., L. Kos, et al. (1998). "Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model." *Nat Genet* **18**(1): 60-64.
- Southard-Smith, E. M., L. Kos, et al. (1998). "Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model." *Nat Genet* **18**(1): 60-64.
- Spencer, N. J., P. G. Dinning, et al. (2016). "Insights into the mechanisms underlying colonic motor patterns." *The Journal of physiology*: n/a-n/a.
- Stanchina, L., V. Baral, et al. (2006). "Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development." *Developmental Biology* **295**(1): 232-249.
- Stanchina, L., T. Van de Putte, et al. (2010). "Genetic interaction between Sox10 and Zfhx1b during enteric nervous system development." *Developmental Biology* **341**(2): 416-428.
- Stephens, L. E., A. E. Sutherland, et al. (1995). "Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality." *Genes Dev* **9**(15): 1883-1895.
- Stuhlmiller, T. J. and M. I. García-Castro (2012). "Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction." *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**(22): 3715-3737.

- Sukegawa, A., T. Narita, et al. (2000). "The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium." *Development* **127**(9): 1971-1980.
- Swaminathan, V. and C. M. Waterman (2016). "The molecular clutch model for mechanotransduction evolves." *Nat Cell Biol* **18**(5): 459-461.
- Tadokoro, S., S. J. Shattil, et al. (2003). "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation." *Science* **302**(5642): 103-106.
- Takagi, J., B. M. Petre, et al. (2002). "Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling." *Cell* **110**(5): 599-511.
- Takagi, J., K. Strokovich, et al. (2003). "Structure of integrin alpha5beta1 in complex with fibronectin." *EMBO J* **22**(18): 4607-4615.
- Tamkun, J. W., D. W. Simone, et al. (1986). "Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin." *Cell* **42**: 271-282.
- Taneyhill, L. A., E. G. Coles, et al. (2007). "Snail2 directly represses cadherin6B during epithelial-to-mesenchymal transitions of the neural crest." *Development* **134**(8): 1481-1490.
- Taraviras, S., C. V. Marcos-Gutierrez, et al. (1999). "Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system." *Development* **126**(12): 2785-2797.
- Thomason, R. T., D. M. Bader, et al. (2012). "Comprehensive timeline of mesodermal development in the quail small intestine." *Dev Dyn* **241**(11): 1678-1694.
- Ti, S. C., C. T. Jurgenson, et al. (2011). "Structural and biochemical characterization of two binding sites for nucleation-promoting factor WASp-VCA on Arp2/3 complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(33): E463-471.
- Tolias, K. F., L. C. Cantley, et al. (1995). "Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases." *J Biol Chem* **270**(30): 17656-17659.
- Torfs, C. P. and R. E. Christianson (1999). "Maternal risk factors and major associated defects in infants with Down syndrome." *Epidemiology* **10**(3): 264-270.
- Trochet, D., L. M. O'Brien, et al. (2005). "PHOX2B genotype allows for prediction of tumor risk in congenital central hypoventilation syndrome." *Am J Hum Genet* **76**(3): 421-426.
- Tse, J. R. and A. J. Engler (2010). "Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties." *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 10**: Unit 10 16.
- Tucker, G. C., H. Aoyama, et al. (1984). "Identical reactivity of monoclonal antibodies HNK-1 and NC-1: conservation in vertebrates on cells derived from the neural primordium and on some leukocytes." *Cell Differ* **14**(3): 223-230.
- Uesaka, T., M. Nagashimada, et al. (2013). "GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**(41): 16372-16382.
- Uesaka, T., H. M. Young, et al. (2016). "Development of the intrinsic and extrinsic innervation of the gut." *Dev Biol*.
- Ulrich, T. A., E. M. de Juan Pardo, et al. (2009). "The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells." *Cancer Res* **69**(10): 4167-4174.
- Ulrich, T. A., A. Jain, et al. (2010). "Probing cellular mechanobiology in three-dimensional culture with collagen-agarose matrices." *Biomaterials* **31**(7): 1875-1884.

- Valles, A. M., M. Beuvin, et al. (2004). "Activation of Rac1 by paxillin-Crk-DOCK180 signaling complex is antagonized by Rap1 in migrating NBT-II cells." *J Biol Chem* **279**(43): 44490-44496.
- Vicente-Manzanares, M., C. K. Choi, et al. (2009). "Integrins in cell migration - the actin connection." *Journal of Cell Science* **122**(9): 1473-1473.
- Vincent, M. and J. Thiery (1984). "A cell surface marker for neural crest and placodal cells: further evolution in peripheral and central nervous system." *Dev Biol* **103**(2): 468-481.
- Wallace, A. S., C. Schmidt, et al. (2010). "L1cam acts as a modifier gene during enteric nervous system development." *Neurobiology of Disease* **40**(3): 622-633.
- Wallace, A. S., M. X. Tan, et al. (2011). "L1cam acts as a modifier gene for members of the endothelin signalling pathway during enteric nervous system development." *Neurogastroenterol Motil* **23**(11): e510-522.
- Walters, L. C., V. A. Cantrell, et al. (2010). "Genetic background impacts developmental potential of enteric neural crest-derived progenitors in the Sox10Dom model of Hirschsprung disease." *Hum Mol Genet* **19**(22): 4353-4372.
- Wang, H. B., M. Dembo, et al. (2001). "Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11295-11300.
- Wang, N., J. P. Butler, et al. (1993). "Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton." *Science* **260**(5111): 1124-1127.
- Wang, X., A. K. Chan, et al. (2011). "Analysis of the sacral neural crest cell contribution to the hindgut enteric nervous system in the mouse embryo." *Gastroenterology* **141**(3): 992-1002 e1001-1006.
- Watanabe, N., T. Kato, et al. (1999). "Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization." *Nat Cell Biol* **1**(3): 136-143.
- Watanabe, Y. (2014). "Variabilité phénotypique liée aux mutations de Sox10 et Interactions génétiques gouvernant le développement du système nerveux entérique." *Thèse de Doctorat, Université Paris EST-UFR de Sciences.*
- Watanabe, Y., F. Broders-Bondon, et al. (2013). "Sox10 and Itgb1 interaction in enteric neural crest cell migration." *Developmental biology* **379**(1): 92-106.
- Webb, D. J., K. Donais, et al. (2004). "FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly." *Nature Cell Biology* **6**(2): 154-161.
- Webb, D. J., J. T. Parsons, et al. (2002). "Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again." *Nat Cell Biol* **4**(4): E97-100.
- Wegener, K. L., A. W. Partridge, et al. (2007). "Structural basis of integrin activation by talin." *Cell* **128**(1): 171-182.
- Winograd-Katz, S. E., R. Fassler, et al. (2014). "The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(4): 273-288.
- Worthylake, R. A., S. Lemoine, et al. (2001). "RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration." *J Cell Biol* **154**(1): 147-160.
- Wu, J. J., J. X. Chen, et al. (1999). "Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors." *Development* **126**(6): 1161-1173.
- Xiong, J. P., T. Stehle, et al. (2001). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3." *Science* **294**(5541): 339-345.
- Xiong, J. P., T. Stehle, et al. (2002). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand." *Science* **296**(5565): 151-155.

- Xu, Q., T. Heanue, et al. (2014). "Travelling within the fetal gut: simple rules for an arduous journey." *BMC biology* **12**: 50.
- Xu, X. P., E. Kim, et al. (2016). "Three-Dimensional Structures of Full-Length, Membrane-Embedded Human alphaIIb beta3 Integrin Complexes." *Biophys J* **110**(4): 798-809.
- Yanagisawa, H., M. Yanagisawa, et al. (1998). "Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene." *Development* **125**(5): 825-836.
- Yang, Q., X. F. Zhang, et al. (2012). "Arp2/3 complex-dependent actin networks constrain myosin II function in driving retrograde actin flow." *J Cell Biol* **197**(7): 939-956.
- Ye, F., G. Hu, et al. (2010). "Recreation of the terminal events in physiological integrin activation." *The Journal of Cell Biology* **188**(1): 157-173.
- Yeung, T., P. C. Georges, et al. (2005). "Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion." *Cell Motil Cytoskeleton* **60**(1): 24-34.
- Yntema, C. L. and W. S. Hammond (1954). "The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo." *J Comp Neurol* **101**(2): 515-541.
- Young, H. M. (2008). "Functional development of the enteric nervous system--from migration to motility." *Neurogastroenterol Motil* **20 Suppl 1**: 20-31.
- Young, H. M., A. J. Bergner, et al. (2004). "Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut." *Developmental Biology* **270**(2): 455-473.
- Young, H. M., A. J. Bergner, et al. (2003). "Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine." *The Journal of Comparative Neurology* **456**(1): 1-11.
- Young, H. M., A. J. Bergner, et al. (2014). "Colonizing while migrating: How do individual enteric neural crest cells behave?" *BMC Biology* **12**(1): 23.
- Young, H. M., A. J. Bergner, et al. (2014). "Colonizing while migrating: how do individual enteric neural crest cells behave?" *BMC biology* **12**: 23.
- Young, H. M., D. Ciampoli, et al. (1999). "Expression of Ret-, p75(NTR)-, Phox2a-, Phox2b-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut." *Dev Dyn* **216**(2): 137-152.
- Young, H. M., C. J. Hearn, et al. (1998). "A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture." *Dev Biol* **202**(1): 67-84.
- Young, H. M., C. J. Hearn, et al. (2001). "GDNF Is a Chemoattractant for Enteric Neural Cells." *Developmental Biology* **229**(2): 503-516.
- Young, H. M., B. R. Jones, et al. (2002). "The projections of early enteric neurons are influenced by the direction of neural crest cell migration." *J Neurosci* **22**(14): 6005-6018.
- Young, H. M. and D. Newgreen (2001). "Enteric neural-crest derived cells: origin, identification, migration, and differentiation." *Anat. Rec.* **262**: 1-15.
- Young, H. M., K. N. Turner, et al. (2005). "The location and phenotype of proliferating neural-crest-derived cells in the developing mouse gut." *Cell and Tissue Research* **320**(1): 1-9.
- Zacchetti, G., D. Duboule, et al. (2007). "Hox gene function in vertebrate gut morphogenesis: the case of the cæcum ." *Development* **134**(22): 3967-3973.
- Zaidel-Bar, R. (2003). "Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells." *Journal of Cell Science* **116**(22): 4605-4613.

- Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, et al. (2007). "Functional atlas of the integrin adhesome." Nat Cell Biol **9**(8): 858-867.
- Zamir, E., B. Z. Katz, et al. (1999). "Molecular diversity of cell-matrix adhesions." J Cell Sci **112 (Pt 11)**: 1655-1669.
- Zamir, E., M. Katz, et al. (2000). "Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts." Nat Cell Biol **2**(4): 191-196.
- Zhang, X., G. Jiang, et al. (2008). "Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction." Nat Cell Biol **10**(9): 1062-1068.
- Zhang, Y., T. H. Kim, et al. (2012). "Phactr4 regulates directional migration of enteric neural crest through PP1, integrin signaling, and cofilin activity." Genes Dev **26**(1): 69-81.
- Zhang, Y., T. H. Kim, et al. (2012). "Phactr4 regulates directional migration of enteric neural crest through PP1, integrin signaling, and cofilin activity." Genes & Development **26**(1): 69-81.
- Zhu, J., C. V. Carman, et al. (2007). "Requirement of alpha and beta subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling." Blood **110**(7): 2475-2483.
- Zhu, J., B. H. Luo, et al. (2009). "The structure of a receptor with two associating transmembrane domains on the cell surface: integrin alphaIIb beta3." Mol Cell **34**(2): 234-249.
- Zhu, J., B. H. Luo, et al. (2008). "Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces." Mol Cell **32**(6): 849-861.
- Zhu, L., H.-O. Lee, et al. (2004). "Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX10 in neural crest-derived enteric neuron precursors." Nature Genetics **36**(7): 732-737.
- Zwijsen, A., K. Verschuere, et al. (2003). "New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades." FEBS Lett **546**(1): 133-139.

Le système nerveux entérique (SNE) provient des cellules de crête neurale entériques (CCNEs) qui migrent au sein de l'intestin embryonnaire, prolifèrent et se différencient en cellules gliales et neurones formant des ganglions interconnectés. Mon projet de thèse vise à comprendre comment les propriétés biochimiques et mécaniques de l'intestin embryonnaire influencent la colonisation et la différenciation des CCNEs. L'absence d'endothéline-3 (EDN3), un facteur biochimique exprimé dans la paroi intestinale, est une des causes de la maladie de hirschsprung, caractérisée par une aganglionose du côlon distal. Nous montrons pour la première fois que l'EDN3 stimule l'adhésivité des CCNEs en augmentant leurs adhérences focales dépendantes des intégrines- β 1 ainsi que la dynamique de leurs protrusions membranaires. De plus, nous avons mis en évidence l'existence d'une interaction génétique entre *Edn3* et *Itgb1* gouvernant le développement du sne. Par ailleurs, les propriétés mécaniques du microenvironnement influençant la migration et la différenciation cellulaire, nous avons analysé par des approches biophysiques les propriétés élastiques de l'intestin embryonnaire et leurs impacts sur les comportements des ccnes. Nous avons montré que l'intestin embryonnaire se rigidifie au cours de son développement et que la migration en 3D des CCNEs est inhibée lorsque la rigidité de l'environnement dépasse un certain seuil. Enfin, nous avons démarré l'analyse de l'effet de l'élasticité sur la différenciation des progéniteurs entériques. L'ensemble de nos résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes contrôlant le développement du SNE.

The enteric nervous system (ENS) is derived from enteric neural crest cells (ENCC) that migrate along the length of the intestine through the gut mesenchyme. During this process, ENCC proliferate and differentiate into glial cells and neurons, which aggregate into ganglia. The aim of my thesis is to study how biochemical and mechanical properties of the gut tissue influence ENCC colonization and fate during embryogenesis. The absence of endothelin-3 (EDN3), a small peptide trapped in the embryonic gut mesenchyme, is one of the causes leading to hirschsprung disease, characterized by an aganglionosis of the distal colon. We highlighted for the first time that EDN3 increases ENCC adhesion properties through β 1-integrins focal adhesions and modulates their protrusion dynamics. Moreover, we evidenced a genetic interaction between *Edn3* and *Itgb1* during ENS development. Also, it is now well established that mechanical properties of the microenvironment influence fundamental mechanisms such as cell migration and cell fate determination. Thus, we analysed whether the mechanical properties of the ENCC's environment influence their behaviours. Using biophysical approaches, we evidenced a physiological stiffening of the embryonic gut during its development and showed that ENCC migration in 3D is inhibited above a certain rigidity threshold. Finally, we begun to analyse the influence of the elastic properties of the environment onto enteric progenitor cells differentiation, taking advantage of the neurosphere culture system. All together, our results contribute to the understanding of the molecular and cellular mechanisms driving physiological and pathological ENS ontogenesis.