



**HAL**  
open science

# Caractérisation et généralisation de l'implication de la voie NOTCH cytoplasmique au cours des processus de transition épithélio-mésenchymateuse chez l'embryon de poulet

Diane Lebrun

## ► To cite this version:

Diane Lebrun. Caractérisation et généralisation de l'implication de la voie NOTCH cytoplasmique au cours des processus de transition épithélio-mésenchymateuse chez l'embryon de poulet. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1092 . tel-01986211

**HAL Id: tel-01986211**

**<https://theses.hal.science/tel-01986211>**

Submitted on 18 Jan 2019

**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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1092

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale 340**  
**Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)**

**Spécialité de doctorat :**  
**Discipline : Biologie**

Soutenue publiquement le 08/06/2018, par :  
**Diane Caroline Madeleine LEBRUN**

---

# **Caractérisation et généralisation de l'implication de la voie NOTCH cytoplasmique au cours des processus de transition épithélio-mésenchymateuse chez l'embryon de poulet**

---

Devant le jury composé de :

FRE, Silvia	Chargée de Recherche INSERM	UMR 3215	Président.e
MORIN, Xavier	Directeur de Recherche CNRS	UMR 8197	Rapporteuse
CASTELLANI, Valérie	Directrice de Recherche CNRS	UMR 5310	Rapporteur
MONSORO BURQ, Anne-Hélène	Professeure des Universités	UMR 3347	Examinatrice
MARCELLE, Christophe	Professeur des Universités	UMR 5310	Examinatrice
RAY, Cédric	Maître de Conférences	UMR 5306	Directeur de thèse
			Invité





# Remerciements

*“One, remember to look up at the stars and not at your feet. Two, never give up work. Work gives you meaning and purpose and life is empty without it. Three, if you are lucky enough to find love, remember it is there and don’t throw it away.”*

*Stephen Hawking*

Merci à tous ceux qui m’ont permis de traverser ces trois années de thèse, et toutes les précédentes. Quelques mots ne suffisent pas à vous exprimer ce que je voudrais.

# I Présentation

*“Les opportunités ne sont pas offertes. Elles doivent être arrachées.*

*Et cela demande de la persévérance... et du courage. ”*

*Indira Gandhi*

## I.A Présentation en français

### I.A.1 Résumé

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus incontournable dans de nombreux contextes normaux et pathologiques, tels que gastrulation, organogenèse, fibroses et cancers. Cette transformation de cellule épithéliale en cellule mésenchymateuse est indissociable de l'acquisition de propriétés migratoires et est généralement associée à un changement de destin cellulaire. Différentes voies moléculaires sont impliquées selon le contexte de l'EMT concernée. Récemment, notre laboratoire a mis en évidence que la voie Notch cytoplasmique contrôle l'EMT des cellules de la lèvre dorso-médiale du somite (DML). Les crêtes neurales exprimant DLL1 activent « en passant » le récepteur NOTCH, libérant ainsi le domaine intra-cytoplasmique de NOTCH (NICD). Dans le cytoplasme, NICD inhibe la kinase GSK3 $\beta$ , conduisant à la stabilisation de SNAIL, un gène maître de la transition épithélio-mésenchymateuse. Il en résulte une libération de la  $\beta$ caténine des jonctions adhérentes qui, après translocation dans le noyau, active la transcription des gènes de la myogénèse (*Myf5*). Ainsi, l'activation de la voie Notch cytoplasmique permet une induction concomitante de l'EMT et de la myogénèse. La fonction cytoplasmique de Notch reste controversée et le mécanisme par lequel NICD inhibe GSK3 $\beta$  reste obscur.

Au cours de ma thèse j'ai cherché à élucider le mécanisme par lequel NICD inhibe l'activité kinase de GSK3 $\beta$ . J'ai confirmé l'interaction de GSK3 $\beta$  et de NICD en démontrant leur interaction *via* CoIP. Après avoir démontré l'implication de la sérine-thréonine kinase AKT dans la myogénèse des cellules de la DML, j'ai mis en évidence, *via* CoIP et électroporation, que l'inhibition GSK3 $\beta$  par NICD est très certainement médiée par AKT, connue pour être impliquée dans l'EMT et inhiber GSK3 $\beta$  par phosphorylation. En comparant le NICD1 de poulet et les 4 NICD de souris, j'ai montré que l'expression exogène de ces 5 molécules induit l'EMT et la différenciation myogénique de manière similaire. J'ai aussi montré que parmi des différents domaines de NICD, le domaine RAM, connu pour se lier à l'ADN (*via* RBPJ), est nécessaire et suffisant à l'inhibition de GSK3 $\beta$ .

Un second axe de ma thèse a été de tester l'implication de la voie Notch cytoplasmique dans d'autres contextes d'EMT. Pour ce faire, j'ai mis en évidence que cette voie est impliquée dans les autres lèvres du dermomyotome mais aussi dans les crêtes neurales qui délaminent du toit du tube neural. J'ai en particulier mis en évidence une co-activation des voies Wnt et Notch, une inhibition de la kinase GSK3 $\beta$  par NICD cytoplasmique ainsi qu'une inhibition de

la différenciation en présence d'une  $\beta$ -caténine mutée, retenue à la membrane, ou en présence d'une molécule SNAIL2 dominant-négative.

Le dernier axe de ma thèse a consisté à élucider le mécanisme de régulation de l'induction de l'EMT et de la myogenèse via l'activation de NICD. Il a été mis en évidence que toutes les cellules de la DML peuvent être activées via DLL1 et que la surexpression massive de NICD dans la DML provoque une différenciation massive et une déplétion du groupe de cellules progénitrices. Afin de déterminer si la régulation de cette initiation se fait avant ou après induction de NICD, j'ai créé un plasmide permettant de répondre à cette question et afin de visualiser son expression *in vivo*, j'ai initié une collaboration avec une équipe de l'ILM afin de créer un microscope vertical SPIM biphoton permettant l'observation d'embryon de poulets vivants. Ce projet est encore en cours.

Ainsi, mon travail de thèse a permis de i) préciser le mécanisme par lequel NOTCH et GSK3 $\beta$  interagissent physiquement au niveau cytoplasmique lors de l'induction de l'EMT et de la myogenèse des cellules de la DML et j'ai ajouté un nouvel acteur à ce complexe, AKT qui permettrait de médier l'inhibition de GSK3 $\beta$  par NICD *via* phosphorylation, de ii) démontrer que cette voie Notch cytoplasmique est présente dans au moins deux autres EMT embryonnaires, celles de la lèvre ventro-latérale du somite et celle des crêtes neurales, et iii) de mettre en place de nouveaux outils d'imagerie *in vivo* pour explorer les aspects dynamiques de ces mécanismes.

## **I.A.2 Mots clés**

Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)

Electroporation/ immunomarquage/ cryosection

Co-immunoprécipitation

Imagerie *in vivo*

Embryon de poulet

Développement embryonnaire

Induction

Somite/ lèvre dorso-médiale (DML)

Tube neural/crêtes neurales

Notch/ NICD/ RAM

AKT/ GSK3 $\beta$

Snail/ Slug

$\beta$ -caténine

### **I.A.3 Intitulé du laboratoire**

Institut neuromyogène, INMG

CNRS UMR 5310 - INSERM U1217

Université de Lyon - Université Claude Bernard Lyon 1

Faculté de Médecine et de Pharmacie, 3ème étage

8 avenue Rockefeller

69008 LYON

## **I.B English presentation**

### **I.B.1 Title**

**Enforcement of cytoplasmic Notch pathway  
implication in epithelio-mesenchymal transition and  
cell differentiation in chicken embryos.**

### **I.B.2 Summary**

The epithelio-mesenchymal transition (EMT) is a well-known mechanism by which epithelial cells lose their adherent connections and gain migratory properties, associated with a gain of a mesenchymal phenotype. This EMT is required in numerous processes as gastrulation, organogenesis, fibrosis and cancers. Various molecular pathways orchestrate the EMT depending on the EMT biological context. Recently, our laboratory highlighted the implication of the cytoplasmic Notch pathway in the dorso-medial lip (DML) EMT. In the DML tissue, the EMT is synchronized with differentiation pathways, to generate cells forming the primary myotome. Our laboratory showed that neural crests cells expressing DLL1 activate NOTCH receptor of the DML cells, via a “kiss and run” model. This leads to NOTCH cleavage, releasing an activated intra-cytoplasmic NOTCH domain (NICD). In the cytoplasm, NICD inhibits the GSK3 $\beta$  kinase, leading to the stabilization of SNAIL and the free cytoplasmic  $\beta$ -catenin. These molecules translocate into the nucleus and lead to the activation of MRF as

*Myf5* ( $\beta$ -catenin) and to the repression of adherent genes (SNAIL). Therefore, Notch cytoplasmic pathway allows a synergized induction of both, the EMT and myogenic programs. This pathway remains controversial and the precise mechanism how NICD inhibits GSK3 $\beta$  needs to be elucidated.

Therefore, the aim of my thesis project was to clarify how NICD inhibits GSK3 $\beta$  activity.

First, I confirmed that NICD and GSK3 $\beta$  physically interact by CoIP. Moreover, I demonstrated that the serin-threonin kinase AKT, known to inhibit GSK3 $\beta$  by phosphorylation and also to mediate EMT in cancer, can physically interact with NICD in the cytoplasm. I have also shown that AKT mediates the induction of the myogenic program through the inhibitory phosphorylation of GSK3 $\beta$  and that SNAIL is downstream of AKT. Together, these experiments indicate that AKT mediates, through phosphorylation, the cytoplasmic NICD inhibition of GSK3 $\beta$  leading to myogenesis. A comparison of the chicken NICD1 and the 4 isoforms of mouse NICD highlighted that these 5 proteins induce EMT and myogenesis similarly. The dissection of the different conserved domains in the 5 different NICD proteins demonstrated that the RAM domain, known to activate transcription by binding to RBPJ, is necessary and sufficient for GSK3 $\beta$  inhibition.

A second axis of the thesis has been to test the involvement of the cytoplasmic Notch pathway in other EMT contexts. First, I highlighted that this pathway induces myogenesis, showing that NICD inhibits GSK3 $\beta$  activity in the ventro-lateral lip. I further demonstrated that the cytoplasmic Notch pathway is implicated in the EMT and differentiation of the neural crests cells delaminating from the dorsal neural tube. Particularly, I have shown a co-activation of the Wnt and Notch pathway in premigratory and migratory neural crests. Moreover, I demonstrated a cytoplasmic inhibition of the kinase activity of GSK3 $\beta$  by NICD, as well as the induction of the differentiation by cytoplasmic  $\beta$ -catenin or SNAIL2.

In a third axis of my thesis, I tried to clarify the regulatory mechanism involved in Notch activation. Previously it has been demonstrated that in all the DML cells Notch can be activated by an overexpression of DLL1 and that an ectopic expression of NICD in the DML cells induce a massive differentiation and depletion of the progenitor pool. To determine if the regulation of this initiation of the myogenic program occurs before or after Notch activation, I designed a plasmid to visualize Notch activation *in vivo*. In order to be able to follow the DLM cells and Notch activation *in vivo*, I initiated a collaboration with an ILM team to create a vertical SPIM biphoton microscope. In the future, this microscope will allow us to follow cells in living chicken embryos.

Taken together, my results i) show the involvement of AKT kinase as a new partner in the NICD/ GSK3 $\beta$  pathway, controlling EMT and myogenic differentiation in DML cells; ii) demonstrate the involvement of this cytoplasmic Notch pathway in two other embryological EMTs, in the ventro-lateral lip of the somite and in the neural crests; iii) allowed the development of new tools for *ex ovo in vivo* imaging in order to further explore the dynamics of these mechanisms in a nearby future.

### **I.B.3 Key words**

Epithelio-mesenchymal transition (EMT)

Electroporation/ immunostaining/ cryosection

Co-immunoprecipitation

Live imaging

Chicken embryo/ embryological development

Induction

Somite/ dorso-medial lip/ ventro-lateral lip

Neural tube/ neural crest

Notch/ NICD/ RAM

GSK3 $\beta$

AKT

Snail/ Slug

$\beta$ -catenin



## II Tables et index

*“ Le monde n’a pas besoin qu’on y mette de l’ordre ; le monde est ordre, incarné.  
C’est à nous de nous harmoniser avec cet ordre. ”*

*Henry Miller*

## II.A Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>3</b>
<b>I Présentation</b>	<b>4</b>
<b>I.A Présentation en français</b>	<b>5</b>
I.A.1 Résumé	5
I.A.2 Mots clés	6
I.A.3 Intitulé du laboratoire	7
<b>I.B English presentation</b>	<b>7</b>
I.B.1 Title	7
I.B.2 Summary	7
I.B.3 Key words	9
<b>II Tables et index</b>	<b>10</b>
<b>II.A Table des matières</b>	<b>11</b>
<b>II.B Index des figures</b>	<b>15</b>
<b>II.C Table des vidéos</b>	<b>17</b>
<b>II.D Table des abréviations</b>	<b>17</b>
<b>III Introduction</b>	<b>21</b>
<b>III.A Importance de processus morphogénétiques dynamiques lors de l'embryogenèse</b>	<b>23</b>
III.A.1 Étapes de l'embryogenèse	24
III.A.1.1 Segmentation	24
III.A.1.2 Gastrulation	26
III.A.1.1 Organogenèse	27
III.A.1.1.1 Devenir de l'ectoderme	27
III.A.1.1.2 Devenir du mésoderme	31
III.A.1.1.3 Devenir de l'endoderme	31
III.A.2 Comparaison des Vertébrés	32
III.A.3 Les crêtes neurales : une structure transitoire nécessaire à l'organogenèse	34
III.A.3.1 Mise en place des crêtes neurales	34

III.A.3.2	Devenir des crêtes neurales	34
III.A.4	Les somites : structure transitoire à l'origine des muscles et du derme	37
III.A.4.1	Formation du somite et allongement antéropostérieur de l'embryon	37
III.A.4.1.1	Une mise en place séquentielle et finement régulée	37
III.A.4.1.2	Modèle de l'horloge moléculaire et de la vague	39
III.A.4.2	Étapes morphologiques	40
III.A.4.3	Devenir des cellules somitiques dépendant de la localisation au sein du somite	41
III.A.4.3.1	Sclérotome	42
III.A.4.3.2	Dermomyotome	43
<b>III.B</b>	<b>Importance et description de la transition épithélio-mésenchymateuse dans les contextes normaux et pathologiques</b>	<b>45</b>
III.B.1	Mécanisme morphologique de la transition épithélio-mésenchymateuse	46
III.B.1.1	Définition	46
III.B.1.2	Plasticité de l'EMT	46
III.B.2	Différentes vagues d'EMT durant le développement embryonnaire	48
III.B.2.1	Premier cycle d'EMT : gastrulation et crêtes neurales	48
III.B.2.2	Deuxième cycle d'EMT : somites, pancréas et tractus génital	49
III.B.2.3	Troisième cycle d'EMT : développement du cœur	51
III.B.3	Variété et unicité des EMT	52
III.B.3.1	EMT comme réponse physiologique aux blessures	52
III.B.3.2	EMT et pathologies	53
III.B.3.2.1	EMT et fibroses	53
III.B.3.2.2	EMT et cancers	54
III.B.4	Voies moléculaires impliquées	56
III.B.4.1	Voie Wnt	56
III.B.4.1.1	Ligands de la voie Wnt	57
III.B.4.1.2	Récepteurs de la voie Wnt	58
III.B.4.1.3	Agonistes et antagonistes extracellulaires de <i>WNT</i>	58
III.B.4.1.4	La voie canonique : voie Wnt/ $\beta$ -caténine	59
III.B.4.1.5	Première voie Wnt non canonique : voie Wnt/PCP	61

III.B.4.1.6	Deuxième voie Wnt non canonique : voie Wnt/Ca <sup>2+</sup>	61
III.B.4.2	Voie Notch	62
III.B.4.2.1	Ligands de la voie Notch	63
III.B.4.2.2	Récepteurs de la voie Notch	63
III.B.4.2.3	Activation de Notch	66
III.B.4.2.4	Voie Notch classique liée aux CSL	66
III.B.4.2.5	Voies Notch non classiques	67
III.B.4.3	Les facteurs de transcription <i>Snail</i>	68
III.B.4.4	La sérine-thrénine kinase AKT	70
<b>III.C</b>	<b>Deux exemples d'EMT embryonnaires caractéristiques</b>	<b>74</b>
III.C.1	Les crêtes neurales, de la mise en place à la migration dans différents tissus : un modèle de différenciation classique	75
III.C.1.1	Historique	75
III.C.1.2	Induction des crêtes neurales	76
III.C.1.3	Une EMT indispensable aux crêtes neurales	78
III.C.2	Les somites, de la mise en place à la formation du muscle : une EMT particulière	80
III.C.2.1	Induction de la différenciation <i>via</i> les crêtes, Wnt et Notch	81
III.C.2.2	Les MRF et leurs fonctions	83
III.C.2.3	Formation du myotome	85
III.C.2.3.1	Formation du myotome primaire	85
III.C.2.3.2	Seconde étape de la myogenèse	85
<b>IV</b>	<b>Résultats</b>	<b>88</b>
<b>IV.A</b>	<b>Généralisation de la voie Notch cytoplasmiques aux cellules de la VLL et aux crêtes neurales</b>	<b>89</b>
IV.A.1	Introduction	90
IV.A.2	Mise en évidence de la voie NOTCH cytoplasmique au niveau de la myogenèse primaire initiée dans la lèvre ventro-latérale du somite	90
IV.A.3	Co-activation des voies Wnt and NOTCH dans le toit du tube neural et les crêtes neurales	93
IV.A.4	Inhibition de GSK3 $\beta$ par NOTCH activé dans les cellules des crêtes neurales	96

IV.A.5	NOTCH contrôle l'activité de GSK3 de manière indépendante à ses fonctions transcriptionnelles dans le noyau	96
IV.A.6	<i>Snail2</i> inhibe la différenciation des cellules des crêtes neurales mais n'influe pas sur la migration cellulaire.	98
IV.A.7	La relocalisation de la $\beta$ caténine des jonctions est nécessaire à la différenciation cellulaire des crêtes neurales.	101
IV.A.8	Conclusion	104
<b>IV.B</b>	<b>Akt, NOTCH and GSK3<math>\beta</math> interact to trigger early myogenesis in vertebrate embryos.</b>	<b>105</b>
<b>V</b>	<b>Discussion</b>	<b>128</b>
<b>V.A</b>	<b>Généralisation de la voie Notch cyto-plasmiques aux cellules des crêtes neurales</b>	<b>129</b>
V.A.1	CD4-NICD inhibe GSK3 $\beta$ plus rapidement que NICD	129
V.A.2	Effet de SLUG sur l'EMT et la différenciation des crêtes neurales	129
V.A.3	Implication de <i>Slug</i> dans la voie Notch cytoplasmique	131
V.A.4	Effet de la $\beta$ -caténine Y489C à long terme	131
<b>V.B</b>	<b>AKT et la voie Notch cytoplasmique lors de la différenciation myogénique</b>	<b>132</b>
V.B.1	CoIP du complexe NICD/ GSK3 $\beta$ /AKT	132
V.B.2	Optimisation du AKT-K179M	133
V.B.3	Effet de AKT sur SNAIL	133
V.B.4	Effet du CD4-RAM sur la myogenèse	134
V.B.5	Inhibition de l'activité transcriptionnelle de NICD par AKT	136
V.B.6	Relocalisation de NICD par AKT	139
V.B.7	Implication de NICD et AKT dans l'inhibition de GSK3 $\beta$	139
<b>V.C</b>	<b>Caractérisation de l'activation de NOTCH au niveau de la DML via DELTA provenant des crêtes neurales</b>	<b>141</b>
V.C.1	Expérience	141
V.C.2	Culture de tissu	143
V.C.3	Culture ex-vivo : le blop	147
V.C.3.1	Mise au point de la technique	147
V.C.3.2	Méthode d'observation	150
<b>VI</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>157</b>

VI.A	Modèle animal	158
VI.B	Méthode d'électroporation <i>in ovo</i>	158
VI.C	Fixation et marquage sur embryons	160
VI.D	Whole-mount In Situ Hybridisation (ISH)	161
VI.E	Marquage EdU	162
VI.F	Imagerie et analyse	162
VI.G	Fixation et marquages sur sections	162
VI.H	Biologie moléculaire- plasmide utilisés	163
VI.I	Solutions	165
VI.J	Anticorps utilisés	167
VII	Bibliographie	169

## II.B Index des figures

<i>Figure 1: Les différentes modalités ontogéniques du règne animal.</i>	24
<i>Figure 2: Du stade 1 cellule à la blastula dans 4 classes.</i>	25
<i>Figure 3: Comparaison des segmentations holoblastique (embryon humain) et méroblastique (embryon de poisson zèbre) au stade 16 blastomères.</i>	26
<i>Figure 4: Axes et mouvements morphogénétiques de la gastrulation chez les Urolèdes.</i>	28
<i>Figure 5: Gastrulation chez le Xénope, vues sagittales.</i>	29
<i>Figure 6 : Carte des territoires présomptifs et devenir chez le Xénope.</i>	30
<i>Figure 7: Comparaison d'embryons de différentes espèces.</i>	33
<i>Figure 8: Morphogenèse des crêtes neurales, de la gastrulation à la neurulation chez l'embryon de poulet.</i>	35
<i>Figure 9: Schéma de la formation du tube neurale et origine des crêtes neurales.</i>	36
<i>Figure 10: Localisation des crêtes neurales en coupe transversale d'embryon de poulet.</i>	36
<i>Figure 11: Maturation des somites le long de l'axe antéro-postérieur chez l'embryon de poulet.</i>	38
<i>Figure 12: Modèle de l'horloge moléculaire et de la vague.</i>	39
<i>Figure 13: Différenciation du somite dans l'embryon de poulet.</i>	41
<i>Figure 14: Les différents états entre une cellule épithéliale et une cellule mésenchymateuse.</i>	47
<i>Figure 15: Voies moléculaires impliquées lors de la gastrulation</i>	50
<i>Figure 16: Mécanisme d'induction de l'EMT lors de la tumorigenèse.</i>	55
<i>Figure 17: "Wingless a new mutant in drosophila melanogaster," (Sharma, 1973)</i>	57
<i>Figure 18: Les trois voies Wnt</i>	60
<i>Figure 19: Voie de signalisation Notch classique</i>	65
<i>Figure 20: La famille Snail est un point central de l'EMT</i>	69

<i>Figure 21: Exemple des interactions possibles entre AKT, GSK3<math>\beta</math> et NICD.....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 22 : Voies moléculaires de l'induction des crêtes neurales à leur différenciation.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 23: Activation de l'EMT et de la voie myogénique dans les cellules de la DML, suite à l'activation de NOTCH par les crêtes neurales.....</i>	<i>82</i>
<i>Figure 24: Modèle de l'induction de la myogenèse à la différenciation cellulaire lors de la formation des muscles squelettiques.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 25: Modèles de mise en place du myotome primaire chez l'embryon de poulet.....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 26: NICD induit l'inactivation de GSK3<math>\beta</math> dans les cellules de la VLL.....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 27: les rapporteurs de la voie NOTCH et Wnt sont co-exprimés dans les cellules des crêtes neurales ...</i>	<i>94</i>
<i>Figure 28 : Les rapporteurs de la voie NOTCH et Wnt sont co-exprimés dans les cellules des crêtes neurales..</i>	<i>95</i>
<i>Figure 29: NICD induit l'inactivation de GSK3<math>\beta</math> dans les cellules des crêtes neurales et du tube neural dorsal</i>	<i>97</i>
<i>Figure 30 : NICD induit l'inactivation de GSK3<math>\beta</math> dans les cellules des crêtes neurales et du tube neural dorsal</i>	<i>98</i>
<i>Figure 31: Slug permet l'activation de la différenciation cellulaire au niveau des crêtes neurales mais n'influe pas sur la migration.....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 32: La <math>\beta</math>caténine permet l'activation de la différenciation cellulaire au niveau des crêtes neurales mais n'influe pas sur la migration.....</i>	<i>103</i>
<i>Figure 33 : Le domaine RAM de NOTCH est nécessaire et suffisant à l'induction de la myogenèse primaire dans les cellules de la DML.....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 34 : Inhibition de l'activité transcriptionnelle de NICD par AKT de manière dose dépendante.....</i>	<i>137</i>
<i>Figure 35: L'activité transcriptionnelle de NICD est inhibée dans le cytoplasme via une activité non phosphorylante de AKT.....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 36 : Relocalisation de NICD dans le cytoplasme par AKT.....</i>	<i>140</i>
<i>Figure 37 : Schéma d'une mise en évidence du niveau point de contrôle de l'activation de NOTCH lors de l'activation par DELTA au niveau des cellules de la DML.....</i>	<i>142</i>
<i>Figure 38 : tableau de comparaison des différents plasmides pHes5 doubles construits.....</i>	<i>143</i>
<i>Figure 39: Time lapse d'un héli-tube neural dorsal électroporé.....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 40: time-lapse d'une DML électroporé (12h).....</i>	<i>146</i>
<i>Figure 41: montages réalisés pour la culture de tissus ou embryons.....</i>	<i>148</i>
<i>Figure 42: Comparaison d'embryons développés in ovo et ex ovo.....</i>	<i>149</i>
<i>Figure 43: Captures d'écran de d'un embryon imagé en plein champs pendant 18h.....</i>	<i>151</i>
<i>Figure 44 : Microscope réalisé à l'ILM.....</i>	<i>154</i>
<i>Figure 45: Résultats préliminaires obtenus en collaboration avec l'ILM.....</i>	<i>155</i>

## II.C Table des vidéos

<i>Vidéo 1: Film de 15h de développement d'un héli-tube neural dorsal électroporé avec de la GFP.....</i>	<i>144</i>
<i>Vidéo 2: Film de 12h d'une DML électroporée.....</i>	<i>144</i>
<i>Vidéo 3: Mise en évidence de la survie d'un embryon après 12h sur blop .....</i>	<i>149</i>
<i>Vidéo 4: Embryon sur blop en plein champs durant 18h.....</i>	<i>152</i>
<i>Vidéo 5: Agrandissement sur la région caudale d'embryon sur blop en plein champs durant 18h.....</i>	<i>152</i>
<i>Vidéo 6 : Résumé de la technique électroporation in ovo.....</i>	<i>158</i>

## II.D Table des abréviations

ADAM	a disintegrin and metalloproteinase domain
AJ	adherens junction
IGF	insulin growth factor
ADN	acide desoxyribonucléique
AGC	PKA/ PKG/PKC family of serine-threonine kinases
AKT	serine/threonine-specific protein kinase, PKB
AL	anterior lip / lèvres antérieure
ANK	ankyrin
APC	adenomatosis polyposis coli
BFP	blue fluorescent protein
BMP	bone morphogenic protein
CA	constitutively active
casein kinase 1a	casein kinase 1a
CBP	CREB binding protein
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CDK	cyclin-dependent kinase
CIP	cyclin-dependent kinase inhibitor
CPM	cephalic paraxial mesoderme
CSL	CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1
CXCR4	chemokine (CKXKC motif) receptor
d2eGFP	destabilised enhanced GFP
DAAM1	Disheveled-associated activator of morphogenesis 1
DAG	diacylglycerol
DALLY	division abnormally delayed
DEP domain	Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin domain
DGO	Diego
DKK	Dickkopf
DLL1	Delta-like 1 Notch ligand
DML	dorso medial lip / lèvres dorso-médiale
DN	dominant negative



DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DOCK	dedicator of cytokinesis
DOS	daughter of sevenless
DSH	Dishevelled
DSL	delta/serrate/lag2
DsREDexp	red fluorescent protein
DsREDexpDR	destabilised red fluorescent protein
EGF	epithelial growth factor
EGF r	epidermal growth factor receptor
EGFP	enhanced GFP
EMT	epithelio mesenchymal transition / transition épithélio-mésenchymateuse
EMT-TF	EMT activating transcription factors
EndMT	endothelio-mesenchymal transition / transition endothéliomésenchymateuse
ErbB3	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3, HER3
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FDZ	Frizzled
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FMI	Flamingo
FOXO1a	forkhead box protein O1
FZD	frizzled
GFP	green fluorescent protein
GSK-3	glycogen synthase kinase 3
HA	haemagglutinin
HD	heterodimerization domain
HES	hairy and enhancer of split
HGF	hepatocyte growth factor
IGF	insulin growth factor
IGF-R	insulin growth factor receptor
ILK	Integrin-linked kinase
ILK4	interleukin 4
ILM	Institut lumière matière
IRES	Internal ribosome entry site
IRS	insulin receptor substrate
ISH	In situ hybridisation
LNR	lin12-Notch repeats
LPC	lysophosphatidylcholine
LRP	low density lipoprotein
MAML	mastermind-like
MEC	extra cellular matrix
MET	mesenchymo-épithélial transition / transition mésenchymato-épithéliale
miARN	micro ARN
MRF	Myogenic Regulatory Factors

mTORC2	Rictor-mTOR complex
MYF5	myogenic factor 5
MYOD	myogenic differentiation 1
NCAM	neural cell adhesion molecule
NCC	neural crest cell
NECD	notch extracellular domain
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
NICD	notch intracellular domain
NLS	nuclear localisation sequence
NRR	negative regulatory region
PAK1	p21-activated kinase
PAX	paired box
PCP	planar cell polarity
PEST	proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)
PH	Pleckstrin Homology
PI3	Inositol-1,4,5-triphosphate
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinases
PK	Prickle
PKB	Protein kinase B
PKC	protein kinase C
PL	posterior lip
PMC	primary mesenchyme cells
PP2A	phosphatase protein 2a
PRB	retinoblastoma protein
PSM	presomitic mesoderm / mésoderme présomitique
PtdIns	phosphatidyl-inositol
PTH(rP)R	parathyroid hormone related peptide receptor
RA	retinoic acid
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAM	RBPJ associated module
RBPJ	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa
RFP	ed fluorescent protein
rho protein	small signaling G proteins
Rictor	rapamycin insensitive-companion of mTOR
ROCK	rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
SCF	stem cell factor
Ser	serine
SPIM	single plane illumination microscopy
STBM	Strabismus
TCF	transcription factor
TGF $\beta$	transforming growth factor $\beta$
Thr	thréonine
TLE	transducin-like enhancer of split

TMD	transmembrane domain
TMEM	transmembrane protein
TWEAK	TNF-like weak inducer of apoptosis
VANG	van gogh
VLL	ventro lateral lip : lèvres ventro-latérale
WG	wingless
Wnt	wingless-type MMTV integration site family
ZT	Zone de transition

# III Introduction

*“Vois quel orgueil, quelle ruine et comme  
Celle qui mit le monde sous ses lois,  
Pour dompter tout, se dompta quelquefois,  
Et devint proie au temps, qui tout consomme.”*

*Joachim du Bellay*

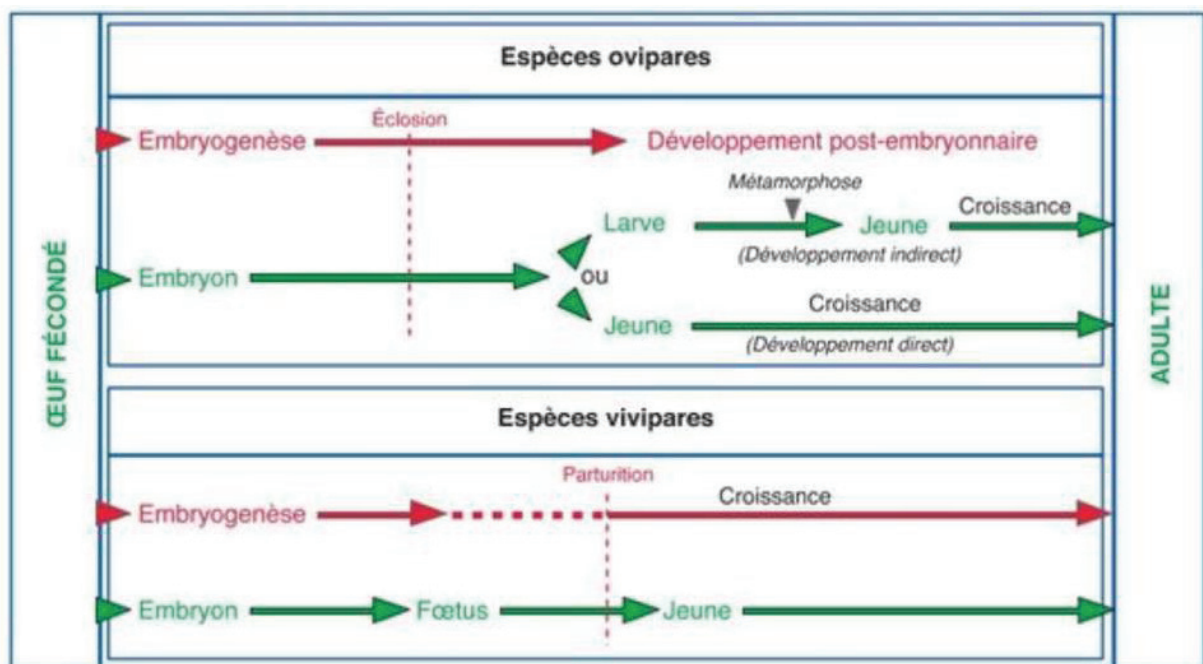
Mon laboratoire d'accueil s'intéresse aux mécanismes régissant la formation et la réparation des muscles chez les vertébrés, et notamment comprendre pourquoi les cellules souches pluripotentes de l'embryon suivent la voie de différenciation myogénique plutôt qu'une autre. L'initiation de la voie myogénique est interdépendante d'une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) couplée à une migration cellulaire. Les mouvements morphogénétiques associés à l'EMT sont indispensables à de très nombreux processus, tant normaux que pathologiques et sont souvent indissociables d'un processus de différenciation cellulaire. L'EMT se caractérise – outre le passage d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux – par la perte des propriétés d'adhésion et l'acquisition de propriétés migratoires.

Dans une première partie, nous étudierons l'importance de l'EMT lors des différents processus embryonnaires, et notamment la gastrulation et la différenciation des crêtes neurales et des somites. Nous verrons ensuite de manière plus exhaustive les processus cellulaires et moléculaires liés à l'EMT ainsi que certaines des principales voies moléculaires impliquées (Wnt, Notch, Snail et AKT). Dans la dernière partie, nous reviendrons en détail sur les voies moléculaires impliquées dans l'EMT et la différenciation de deux structures que j'ai étudié durant ma thèse : les crêtes neurales et les somites.

**III.A**    Importance de processus  
morphogénétiques dynamiques lors de  
l'embryogenèse

## III.A.1 Étapes de l'embryogenèse

Suite à la rencontre de deux gamètes parentaux, un nouvel organisme va se développer jusqu'au stade adulte. Ce développement, appelé ontogenèse, est constitué de l'embryogenèse, développement durant lequel le nouvel individu se développe dans un environnement protégé, puis d'une phase de développement direct ou indirect après l'éclosion ou la parturition (**Figure 1**). Lors de l'embryogenèse, de nombreux événements ont lieu dans un ordre précis permettant la mise en place de structures, tissus et organes nécessaires à la survie de l'organisme (Hirst and Marcelle, 2015) ; ces événements sont indissociables de nombreux mouvements morphogénétiques dont la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) que nous détaillerons en **III.B**. L'embryogenèse peut être subdivisée en trois grandes phases que sont la segmentation, la gastrulation et l'organogenèse.



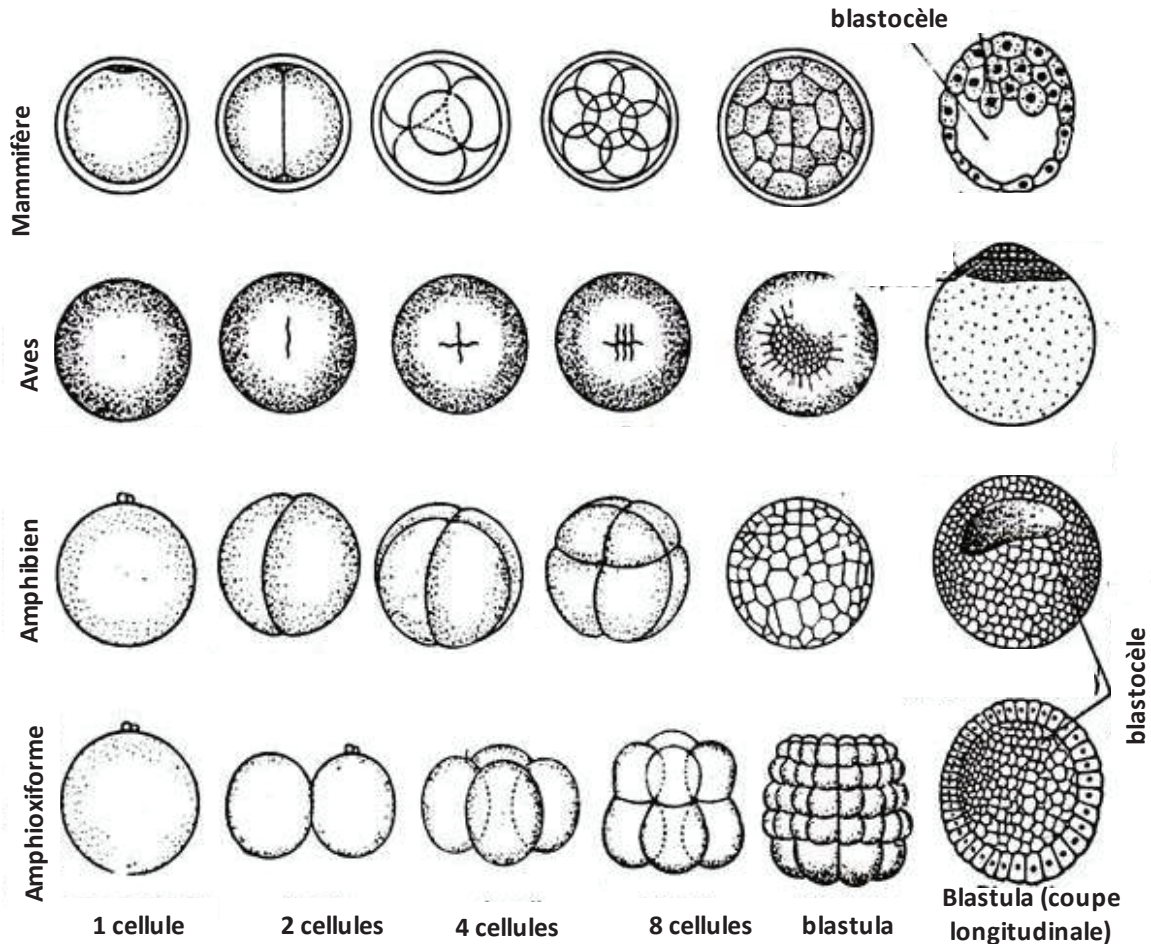
**Figure 1: Les différentes modalités ontogéniques du règne animal.**

*D'après (vervoort, 2013).*

### III.A.1.1 Segmentation

La segmentation, première phase de tout développement embryonnaire, s'initie au moment de la première division de la cellule œuf embryonnaire. Cette étape développementale correspond aux divisions cellulaires qui vont se produire au sein du futur organisme sans qu'il n'y ait augmentation de volume de l'œuf. Les rapides mitoses (et la plupart de temps divisions)

successives donnent d'abord naissance à des cellules, les blastomères, non différenciées et peu organisées (**Figure 2**) qui vont, au cours des divisions, s'organiser. Cette étape est le premier grand remaniement cellulaire au sein de l'embryon.



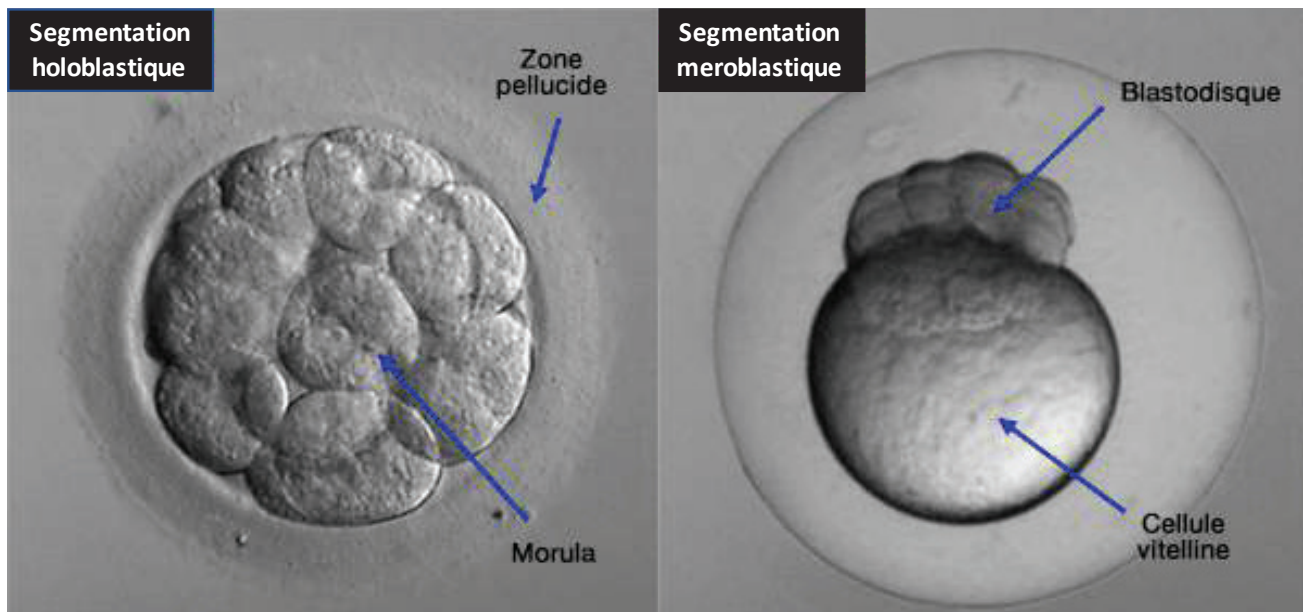
**Figure 2: Du stade 1 cellule à la blastula dans 4 classes.**

Adapté de <http://www.notesonzoology.com> (ZoologyNotes, 2017) (figure 40.5).

Le zygote devient ensuite morula puis une blastula (formation d'une cavité, le blastocèle) (**Figure 2**).

La segmentation peut être holoblastique (diviser tout le germe embryonnaire, comme chez les mammifères et les amphibiens) ou méroblastique (diviser seulement une partie du germe, comme chez les oiseaux) (**Figure 3**).





**Figure 3: Comparaison des segmentations holoblastique (embryon humain) et méroblastique (embryon de poisson zèbre) au stade 16 blastomères.**  
Adapté de (vetopsy, 2017).

### III.A.1.2 Gastrulation

La segmentation est suivie de la gastrulation, entre le 15<sup>ème</sup> et le 25<sup>ème</sup> cycle cellulaire. Conventionnellement, cette phase débute par la formation de l'encoche blastoporale dans la région dorso-végétative. Les divisions deviennent moins fréquentes et se désynchronisent. Les blastomères se répartissent en deux ou trois feuillet embryonnaires lors des premiers mouvements morphogénétiques (involution, convergence, épibolie et divergence) (**Figure 4**). Ces feuillet se répartissent de la manière suivante : un feuillet externe, l'ectoderme, et un feuillet interne, l'endoderme, un feuillet moyen, le mésoderme, uniquement chez les triblastiques. (**Figure 5** et **Figure 6**).

Ces mouvements morphogénétiques, indissociables du processus d'EMT, indispensables à la formation de tissus et organes, sont liés à des mouvements et divisions cellulaires de plusieurs types (Gilbert, 2007; vervoort, 2013):

- Délamination : multiplication cellulaires perpendiculaires à la couche cellulaire qui mène à la libération de cellules filles (souvent dans une cavité) ;
- Invagination : mouvement d'un ensemble de cellules qui s'internalisent, sans rupture de la couche cellulaire concernée ;

- Ingression : désolidarisation et migration des cellules épithéliales de la couche cellulaire dont elles sont issues, suite à une transition épithélio-mesenchymateuse ;
- Intercalation : Interpénétration de cellules issues ou non d'une même couche cellulaire, menant à une augmentation de surface du territoire tissulaire concerné ;
- Épibolie : prolifération d'une population cellulaire et recouvrement progressif d'autres populations cellulaires ;
- Prolifération polaire : multiplication de cellules au niveau de l'un des pôles de la blastula, à l'origine de nouvelles structures internes.

À l'initiation de la phase de gastrulation, l'embryon a une symétrie quasiment sphérique. Il va, lors de cette phase, acquérir une symétrie qui sera conservée tout au long de l'existence de l'individu (radiale, bilatérale, ect...). Ainsi, la gastrulation représente une phase incontournable du développement embryonnaire, avec des conséquences morphologiques indéniables. La plupart des anomalies survenant lors de cette phase sont létales à court terme pour l'embryon qui ne parvient pas à la fin de son développement.

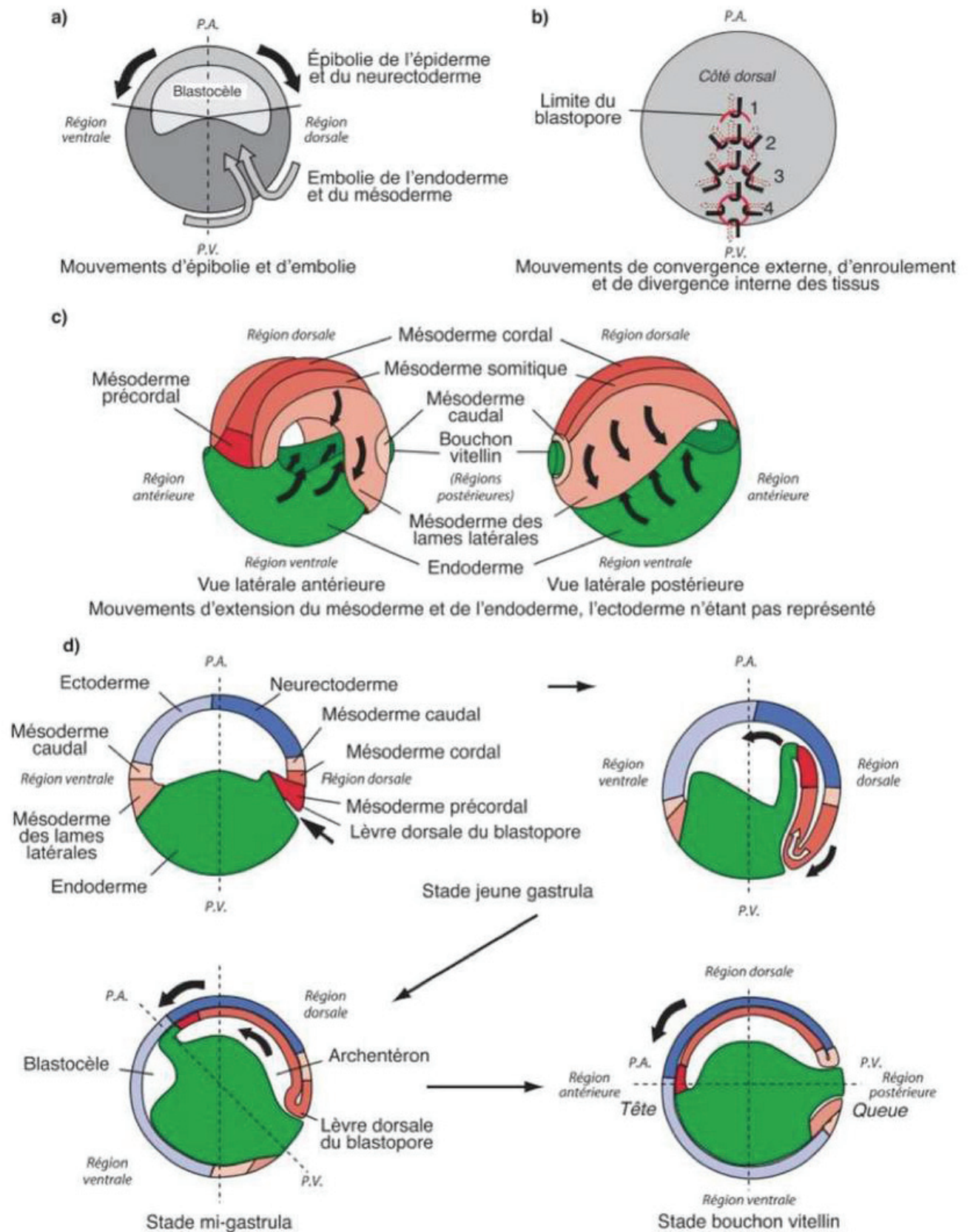
### **III.A.1.1 Organogenèse**

Suite à l'apparition de feuillets embryonnaires distincts capables d'interagir entre eux *via* des mouvements morphogénétiques, des tissus différenciés de plus en plus spécialisés vont se mettre en place selon une chronologie rigoureuse. Cette étape, aboutissant à la formation d'organes fonctionnels, constitue l'organogenèse (**Figure 5**).

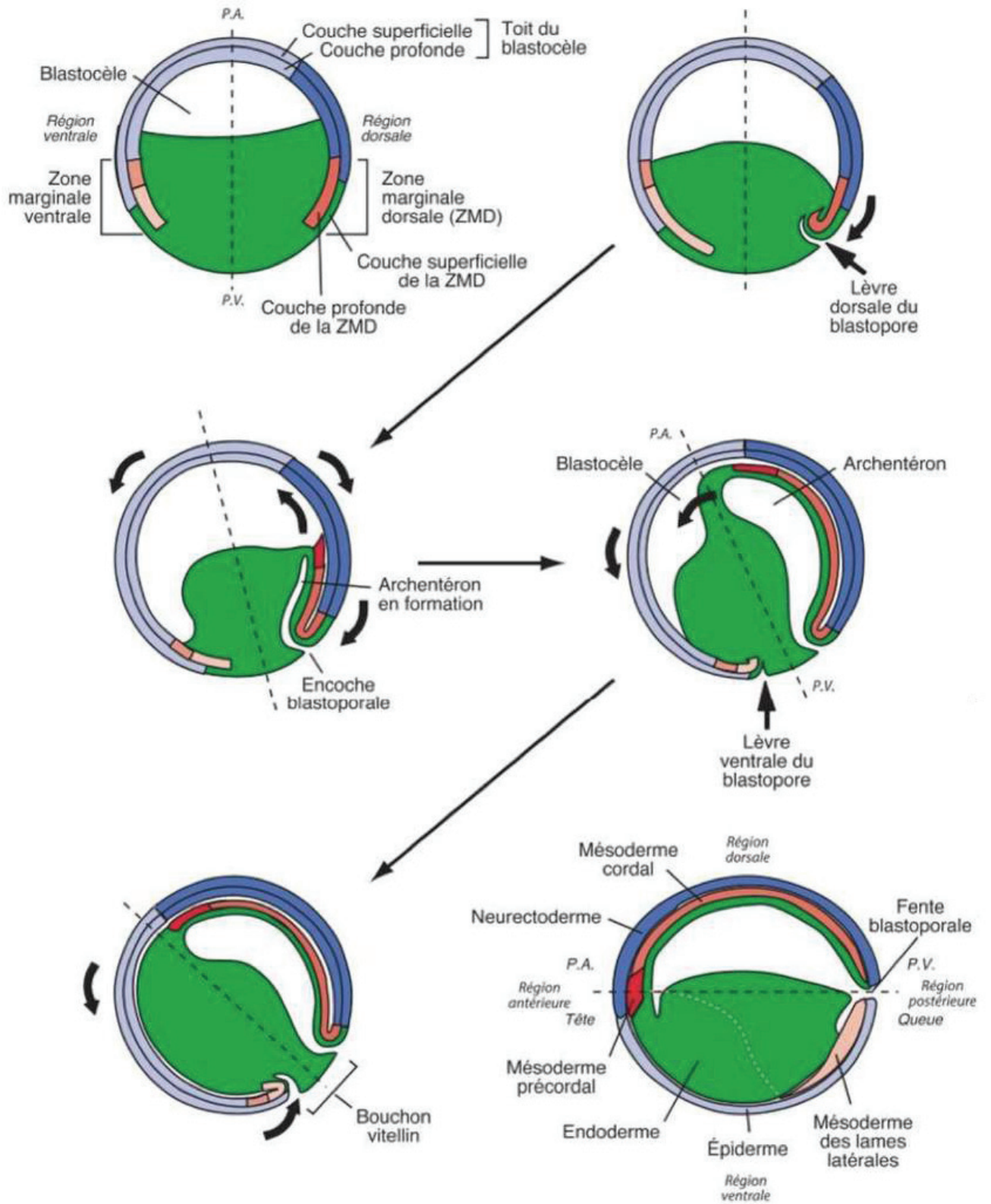
#### **III.A.1.1.1 Devenir de l'ectoderme**

Suite à la mise en place des trois feuillets embryonnaires lors de la gastrulation, les étapes d'organogenèse et de morphogenèse peuvent avoir lieu. Chez les Vertébrés, la première individualisation tissulaire est celle du tissu nerveux qui permet de passer du stade blastula au stade neurula. La première étape est la formation d'une structure transitoire dorsale, le tube neural (Colas and Schoenwolf, 2001; Harrington et al., 2009) . Cette structure est le précurseur embryonnaire du système nerveux central (cerveau et moelle épinière).

Le feuillet ectodermique donnera naissance à l'épiderme mais aussi au système nerveux ainsi qu'aux organes sensoriels (Gilbert, 2007; vervoort, 2013).



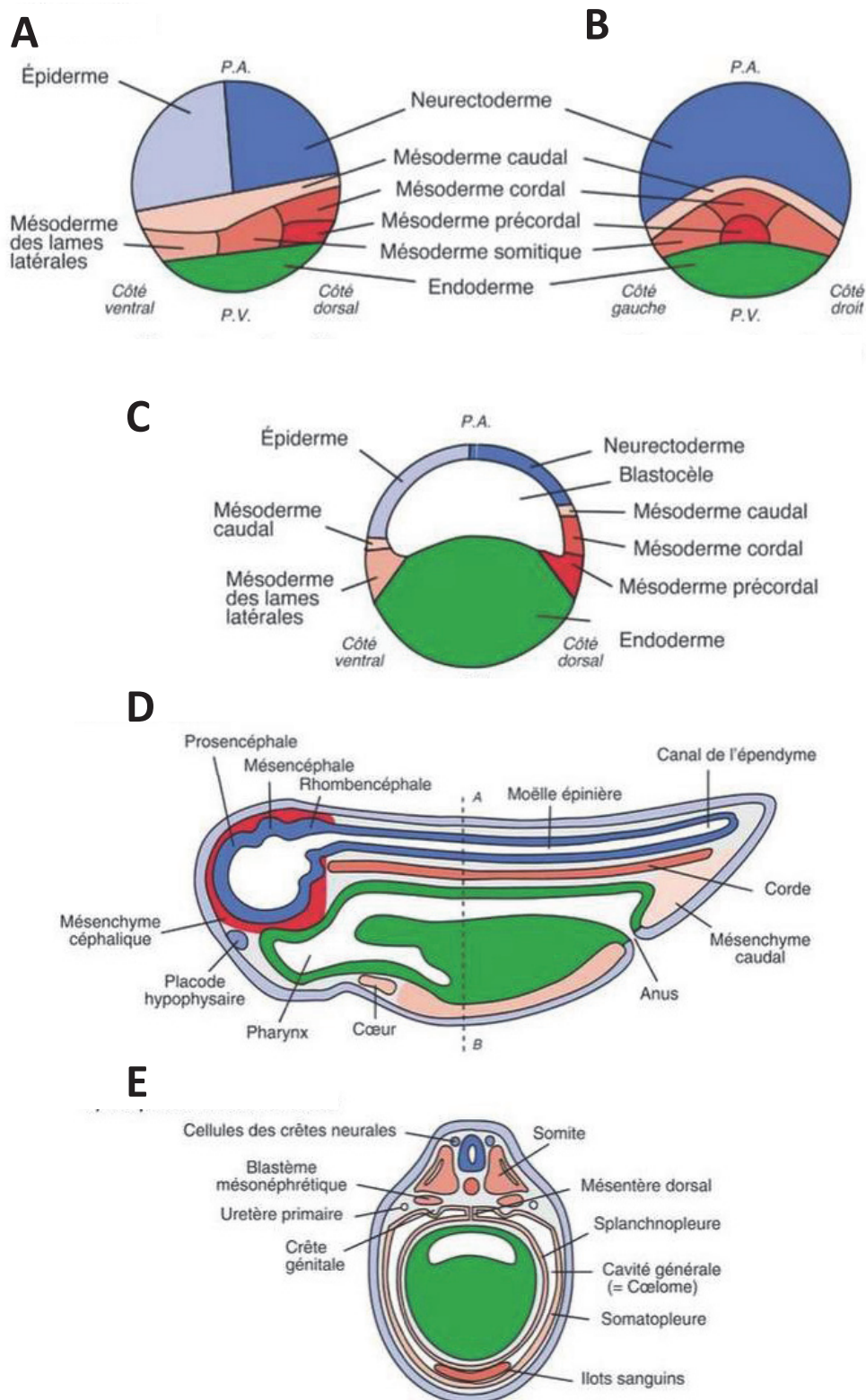
**Figure 4: Axes et mouvements morphogénétiques de la gastrulation chez les Urolèles.**  
 D'après (vervoort, 2013).



**Figure 5: Gastrulation chez le Xénope, vues sagittales.**

*D'après (vervoort, 2013).*





**Figure 6 : Carte des territoires présomptifs et devenirs chez le Xénope.**

**A-C.** Carte des territoires présomptifs. Ectoderme en bleu, mésoderme en rouge et endoderme en vert. PA : pole animal, VP : pole végétatif. **A.** Vue externe (profil). **B.** vue externe (face). **C.** Coupe sagittale. **D-E.** Schéma du devenir des territoires présomptifs. **D.** Coupe sagittale. **E.** Coupe transversale selon AB. D'après (vervoort, 2013)

### **III.A.1.1.2 Devenir du mésoderme**

De manière simultanée à la formation et fermeture du tube neural, le mésoderme primitif se subdivise en trois régions distinctes le long de l'axe médio-latéral *via* un gradient de protéines BMP (Pourquié et al., 1996; Tonegawa et al., 1997). Le mésoderme intermédiaire forme le futur système urogénital tandis que le mésoderme latéral se subdivise entre le mésoderme pariétal (somatopleure) et le mésoderme viscéral (splanchnopleure), à l'origine des cavités internes (intestin, péricarde, plèvre) de l'embryon. Le mésoderme paraxial, quant à lui, est à l'origine de la notochorde et des somites (Catala et al., 1996).

Lors de la gastrulation, de manière concomitante à la formation du tube neural, le mésoderme paraxial se subdivise entre le CPM (cephalic paraxial mesoderm) en région antérieure) et le PSM (pre-somitic mesoderm, en région postérieure). À partir du PSM, des structures transitoires, les somites, sont progressivement formés de la région antérieure à la région postérieure à intervalles réguliers (Meier, 1979, 1981). Ce processus directionnel, périodique et synchronisé est couplé à une transition menseschymato-épithéliale (MET).

Le feuillet mésodermique est à l'origine des organes internes, (à part le système nerveux et les organes des systèmes digestif et respiratoire), des muscles et des os. (Gilbert, 2007; vervoort, 2013).

### **III.A.1.1.3 Devenir de l'endoderme**

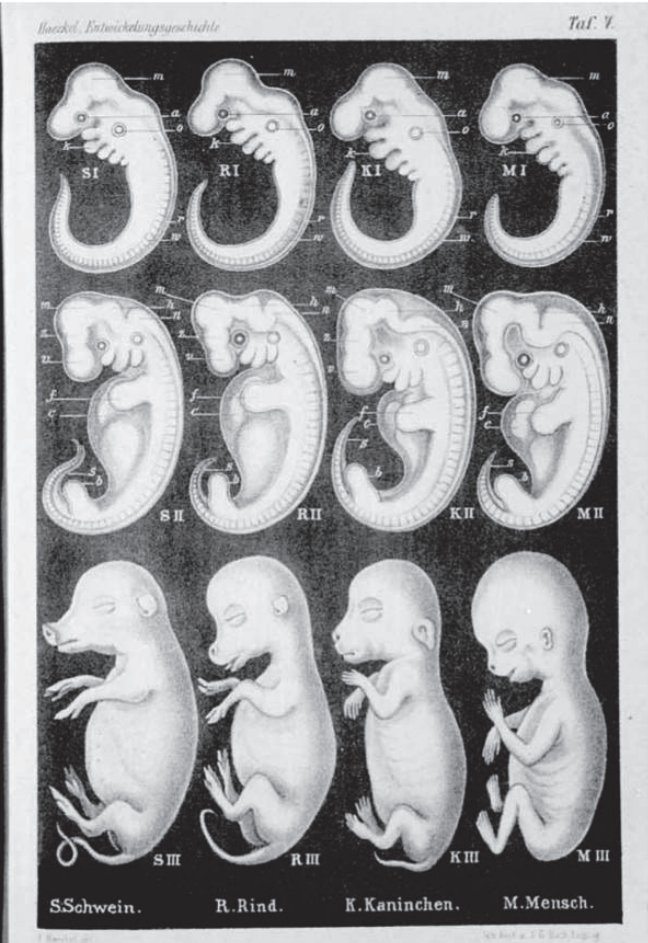
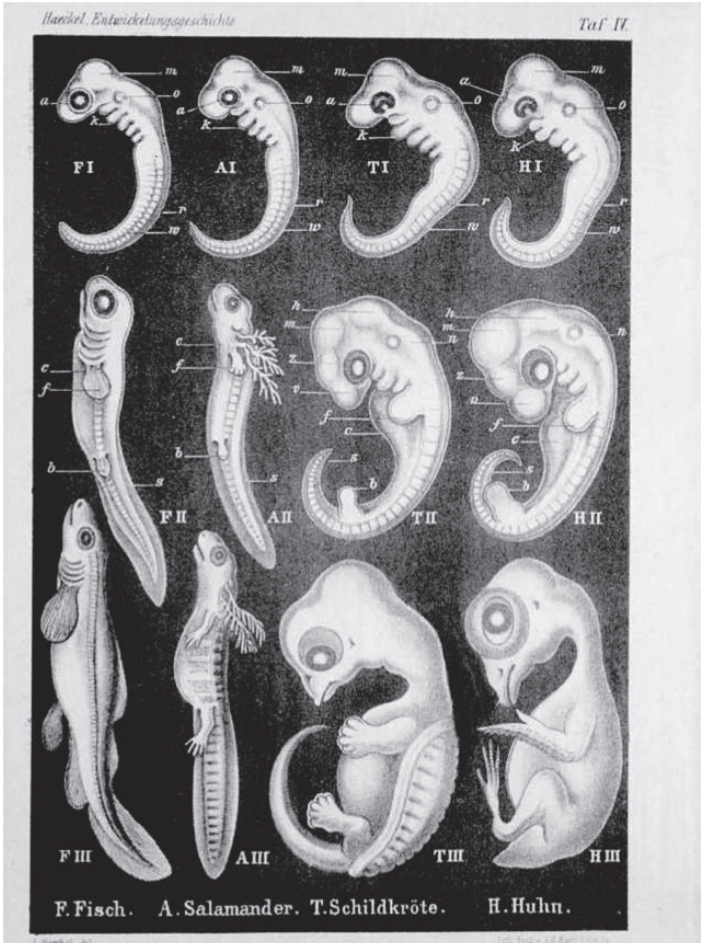
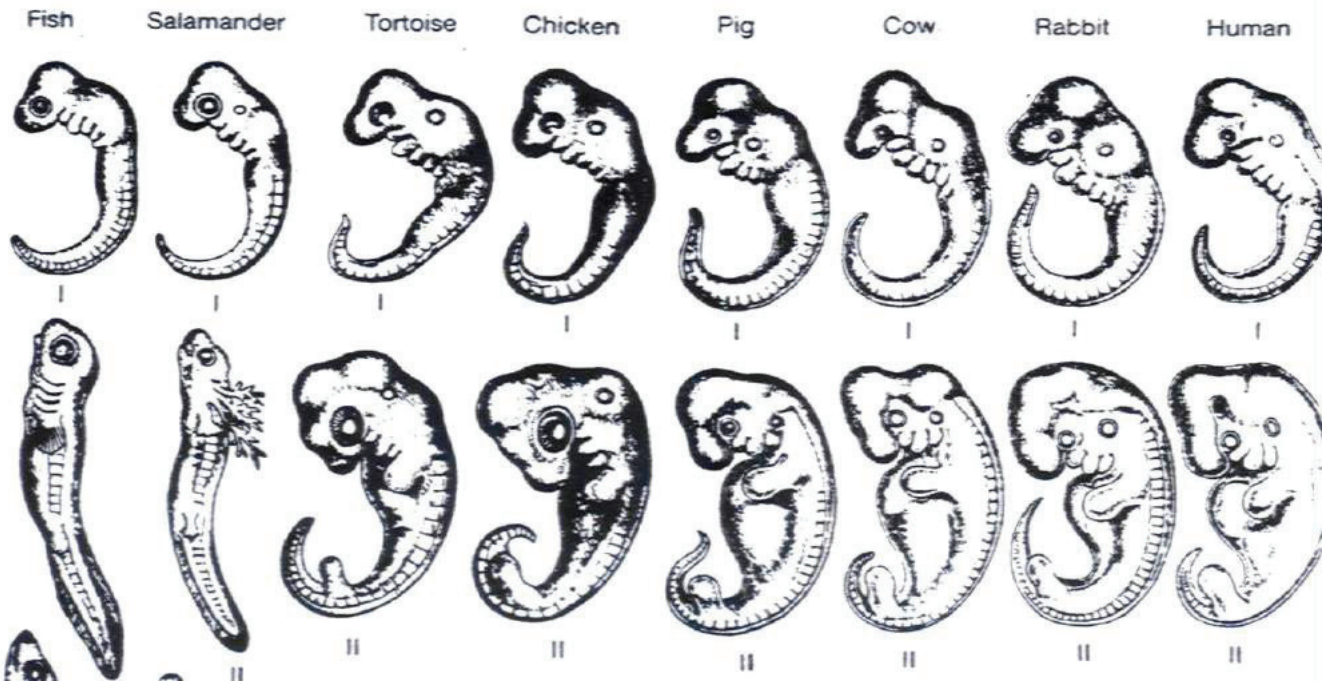
Le feuillet endodermique est à l'origine des organes des systèmes digestif et respiratoire. Il donnera naissance aux glandes digestives ainsi qu'aux épithéliums des voies pulmonaires et digestives (Gilbert, 2007; vervoort, 2013).

## III.A.2 Comparaison des Vertébrés

Chez tous les Vertébrés, les premières étapes embryonnaires sont proches, voir identiques. Ainsi, il se révèle relativement compliqué de distinguer un embryon de poulet d'un embryon de souris ou d'un embryon humain à des stades de développement identiques (**Figure 7**). Les modifications morphologiques, tant macroscopiques que microscopiques, ainsi que les aspects moléculaires mis en évidence sur un modèle peuvent être généralisables à d'autres embryons de vertébrés après quelques vérifications. Contrairement aux embryons de Mammifères, l'embryon de poulet (tout comme les embryons d'amphibiens) est relativement facile d'accès et de manipulation. Cela a permis de faire du modèle aviaire un modèle de référence pour l'embryologie.

Ainsi, l'embryogenèse peut se subdiviser en trois grandes phases distinctes que sont la segmentation, la gastrulation et l'organogénèse. De nombreux mouvements, réarrangements, spécification et différenciations cellulaires ont lieu pendant ces trois phases. Afin d'étudier plus précisément certains des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués, nous allons durant le reste de cette première partie, nous focaliser sur deux structures particulières nécessaires, entre autres, à l'organogénèse du système nerveux périphérique et de la musculature squelettique : les crêtes neurales pour le système nerveux et les somites pour les muscles.





**Figure 7: Comparaison d'embryons de différentes espèces.**

En haut, de gauche à droite : poisson, salamandre, tortue, poulet, cochon, vache, lapin et humain. D'après (Mayr, 2003). En bas : poisson, salamandre, tortue, poulet, cochon, cerf et humain. D'après Embryological Illustrations, 1874, Ernst Haecke, copié de Wikipedia.



### **III.A.3 Les crêtes neurales : une structure transitoire nécessaire à l'organogenèse**

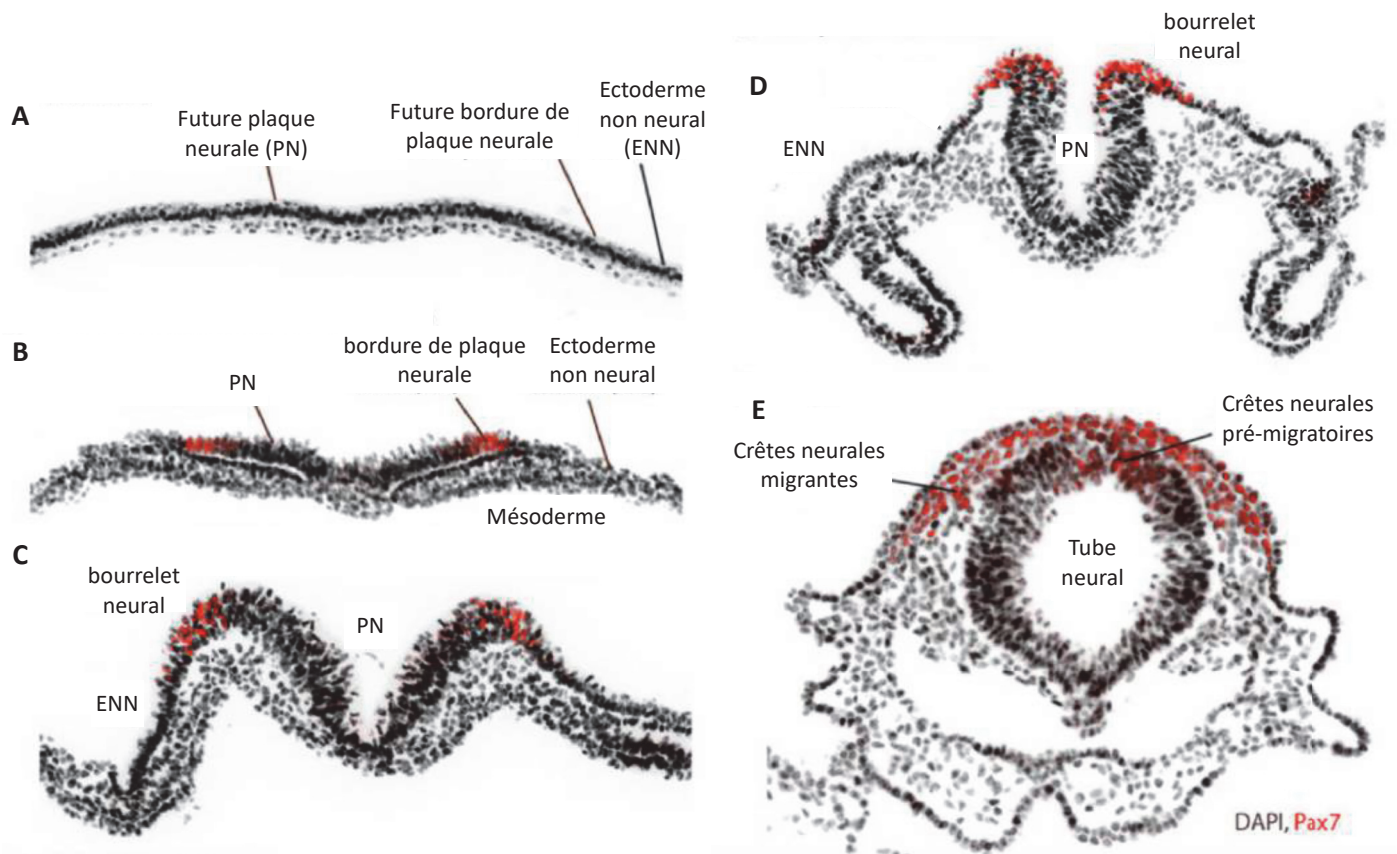
#### **III.A.3.1 Mise en place des crêtes neurales**

En région dorsale de l'embryon, une partie de l'ectoderme se différencie en neuro-ectoderme. Deux bourrelets symétriques vont se former de part et d'autre de l'axe antéropostérieur de l'embryon (**Figure 8.A-B ;Figure 9.1**) et se rapprocher en formant une invagination (stade gouttière neurale) (**Figure 8. C-D ;Figure 9.2**), avant de fusionner (**Figure 8.E ;Figure 9.3**) pour former le tube neural. Celui-ci se désolidarise alors de l'ectoderme plus externe (**Figure 9.4**) (Stuhlmiller and García-Castro, 2012; vervoort, 2013). En 1868, William His a observé une bande de cellules située entre le tube neural et l'ectoderme : les cellules des crêtes neurales (His, 1868). De nombreuses années plus tard, il a été mis en évidence que ces crêtes neurales étaient issues de la région dorsale du tube neural (**Figure 8**) (Archives of Neurology, 1951).

#### **III.A.3.2 Devenir des crêtes neurales**

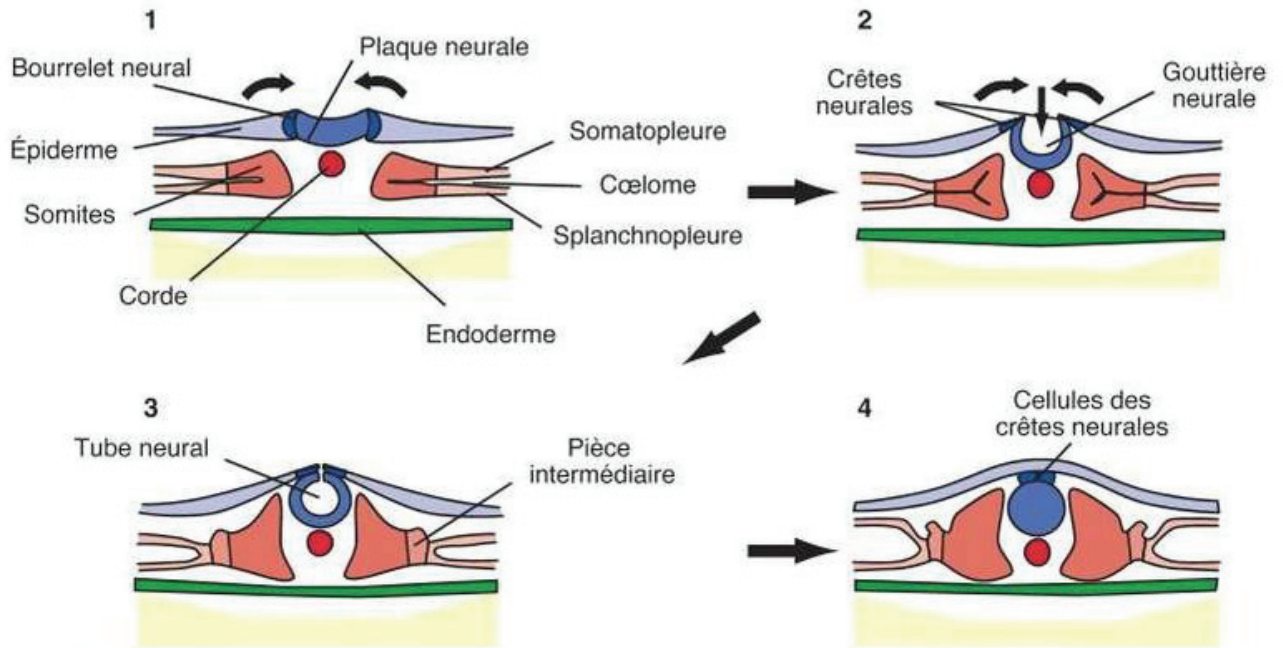
Lors de leur migration, les cellules des crêtes neurales vont pouvoir induire la différenciation de différents types cellulaires, tels que les cellules des somites qui peuvent subir une EMT (transition épithélio-mésenchymateuse) après activation de la voie NOTCH *via* DELTA exprimé par les crêtes neurales (Rios et al., 2011). D'autres types cellulaires dérivent - partiellement ou totalement- des cellules provenant des crêtes neurales tels que les neurones (sensoriels, adrénrgiques ou cholinergiques), les cellules satellites, mélanocytes, adipocytes, ostéoblastes, ostéocytes, systèmes nerveux sympathique et parasympatique. Les crêtes neurales sont aussi à l'origine de tissus ou organes tels que glande thyroïde, os craniofaciaux, dents, cornée, vaisseaux sanguins....(Stuhlmiller and García-Castro, 2012)

L'importante quantité et diversité des cellules induites/déterminées par les crêtes neurales a permis de mettre en place une théorie selon laquelle il y aurait 4 couches cellulaires : ectoderme, endoderme, mésoderme et crêtes neurales (Hall, 2000; Hall and Gillis, 2013).

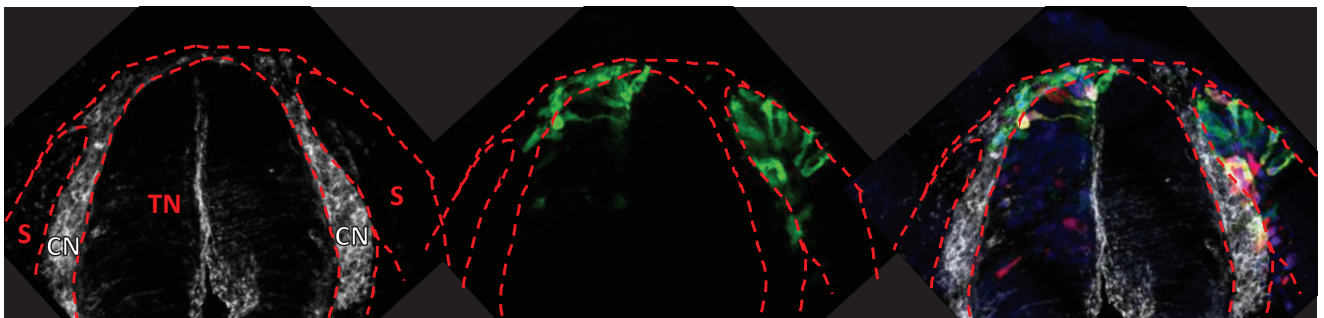


**Figure 8: Morphogenèse des crêtes neurales, de la gastrulation à la neurulation chez l'embryon de poulet.**

Les bordures de la plaque neurales, les progéniteurs de crêtes neurales et les crêtes neurales sont marquées par APX7 (en rouge) A. stade blasutla, induction des crêtes neurales. B-C. Les progéniteurs de crêtes neurales sont identifiables et expriment *Msx1/2*, *Pax3/7*, *Zic1*, *Dlx3/5*, *Hairy2*, *Id3*, et *Ap2*. D. Neurulation. Les bordures de la plaque neurale s'épaississent et se rapprochent et des spécificateurs de crêtes neurales s'expriment *Snail2*, *FoxD3*, *Sox9/10*, *Twist*, *cMyc*, et *Ap2*. E. Rapidement après la fermeture du tube neural (chez le poulet), les cellules des crêtes neurales réalisent une EMT et migrent. Adapté de (Stuhlmiller and García-Castro, 2012).



**Figure 9: Schéma de la formation du tube neural et origine des crêtes neurales.**  
Modèle de poulet, entre 20 et 33h post fécondation. D'après (vervoort, 2013).



**Figure 10: Localisation des crêtes neurales en coupe transversale d'embryon de poulet**  
Reconstruction d'empilement de coupes optiques en vue transversale d'un embryon de poulet électroporé au niveau de la DML et des cellules du tube neural (en bleu). Les cellules électroporées au niveau du toit du tube neural (TN) migrent (crêtes neurales-CN) (HNK1 en blanc) entre le tube neural (TN), les somites (S) et l'ectoderme (non représenté). Hes1 en rouge, TopFlash en vert. Échelle : 100µm.

De ce fait, l'EMT subie par les cellules épithéliales du toit du tube neural, se révèle indispensable à l'embryogénèse. Elle permet aux crêtes neurales en cours de différenciation d'acquies des propriétés mésenchymateuses, et donc migratoires, indispensables à l'organogénèse de nombreux organes, soit en se différenciant directement, soit en permettant l'induction de la différenciation, comme par exemple au niveau de certaines cellules des somites (Stuhlmiller and García-Castro, 2012).

## III.A.4 Les somites : structure transitoire à l'origine des muscles et du derme

Lors de la gastrulation, de manière concomitante à la formation du tube neural, les cellules du mésoderme paraxial forment des somites à partir de PSM *via* un processus directionnel, périodique et synchronisé (Brand-Saberi et al., 1996; Cooke, 1975).

Chez les vertébrés, les somites, structures mésodermiques métamérisées, sont à l'origine de la majorité des muscles (Aoyama and Asamoto, 1988; Goldstein and Kalcheim, 1992). Certaines cellules des somites vont acquérir des capacités migratoires, réaliser une transition épithélio-mésenchymateuse et se différencier en myoblastes qui fusionneront ensuite pour former des fibres musculaires (Boyd, 1960; Gros et al., 2005; Musumeci et al., 2015).

### III.A.4.1 Formation du somite et allongement antéropostérieur de l'embryon

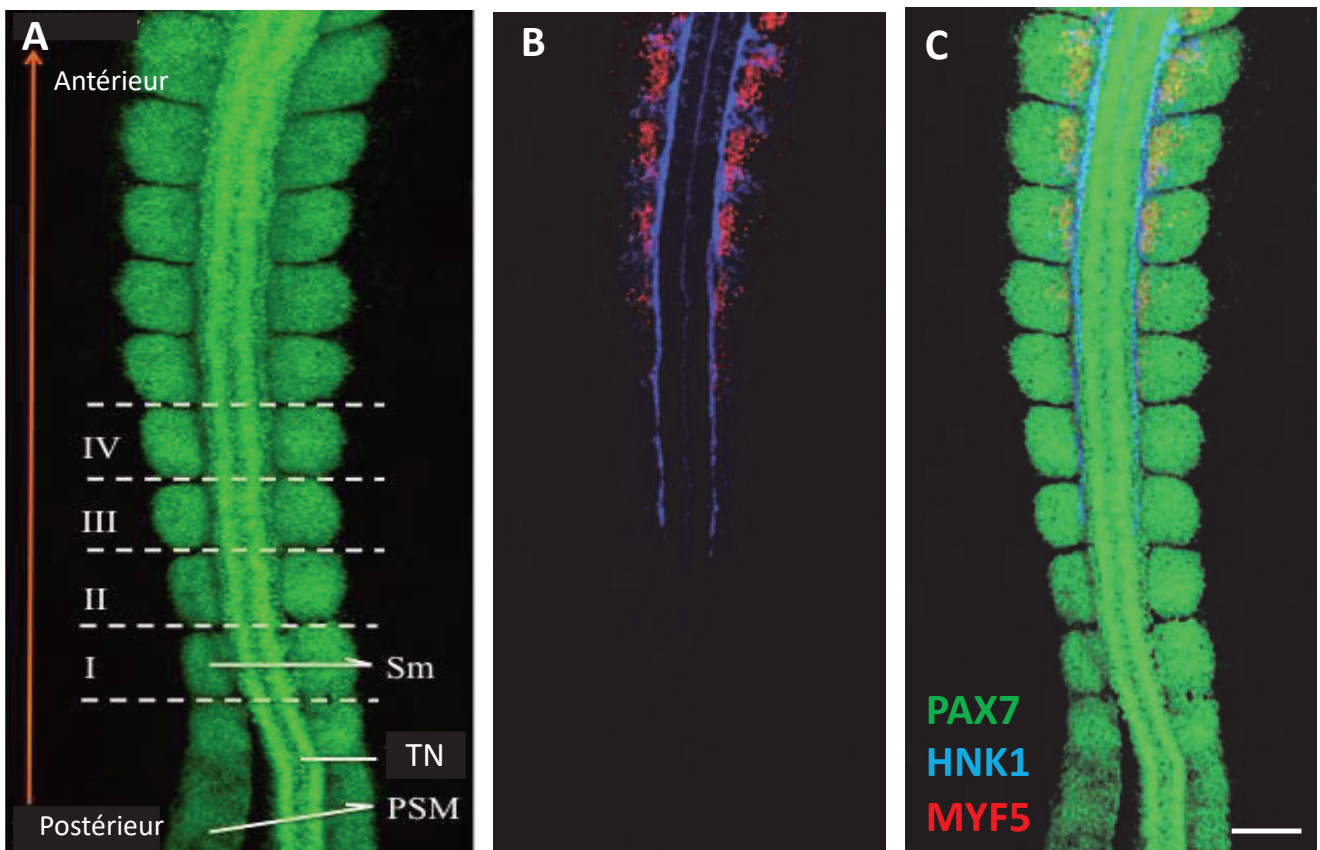
#### III.A.4.1.1 Une mise en place séquentielle et finement régulée

Les somites, issus du mésoderme, sont des structures embryonnaires métamériques transitoires situées de part et d'autre du tube neural et de la chorde (Boyd, 1960).

Le mésoderme axial et le mésoderme paraxial sont induits lors de la gastrulation sous l'effet inducteur de Noggin (qui neutralise l'effet ventralisant de BMP4). Dans la région troncale du mésoderme paraxial, les somites se différencient de part et d'autre de l'axe de symétrie antéro-postérieure de l'embryon. Les somites les plus jeunes sont donc situés en région postérieure et les plus différenciées en région antérieure (*Myf 5* est un marqueur de différenciation myogénique) (**Figure 11**). Les cellules, jusqu'alors mésenchymateuses, s'agencent en cordons spiralés appelés somitomères. Ils se condensent et les cellules les plus externes subissent une MET (transition mesenchymato-épithéliale) et, sous le contrôle de la voie NOTCH, deviennent épithéliales. Cela permet la séparation des somitomères du mésoderme présomitique initial. Une fragmentation progressive du mésoderme en bloc réguliers s'effectue d'avant en arrière, donnant naissance à une nouvelle paire de somite à chaque fois. La somitogenèse, ou mise en place des somites, a donc lieu de manière séquentielle ; les premiers somites mis en place sont situés dans la région antérieure de l'embryon et les derniers dans la région postérieure (Brand-Saberi et al., 1996). Il est à noter



que seuls les sept premiers somitomères en région rostrale n'évoluent pas en somites (Meier, 1981).



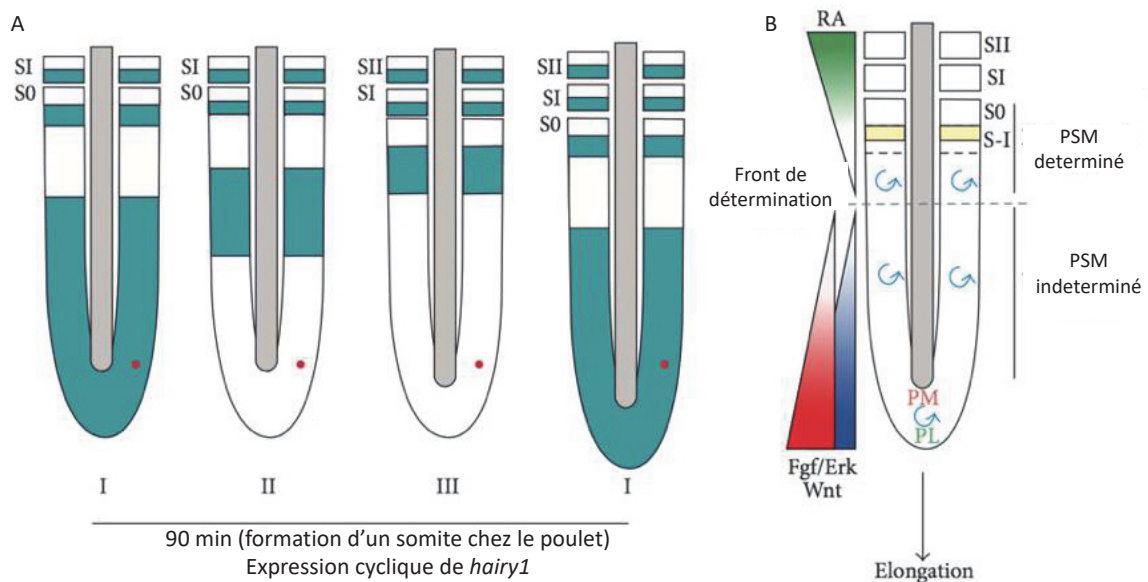
**Figure 11: Maturation des somites le long de l'axe antéro-postérieur chez l'embryon de poulet.**

**A-C.** Reconstruction 3D d'un stack confocal (20X) d'un embryon de poulet de 2,5 jours immunomarqué contre PAX7 (marque la partie dorsale du tube neural et des somites(A,C), HNK1 (marque les crêtes neurales) (B-C) et MYF5 (myogenèse primaires) (B-C). Le somite le plus jeune se situe au niveau postérieur (I) et mature le long de l'axe antéro-postérieur (flèche orange), en exprimant MYF5 lors de sa différenciation (en rouge), médiée par les crêtes neurales (en bleu). Sm :somite, TN : tube neural, PSM mésoderme présomitique. Échelle : 100µm. Adapté de (Rios et al., 2011).

Chez une espèce donnée, le nombre de somites est constant (65 chez la souris et 50 chez le poulet) ainsi que la vitesse de mise en place (environ 1 toutes les 6h chez l'humain, toutes les 2h chez la souris et toutes les 90min chez le poulet). Des études menées dans les années 70 ont permis de mettre en évidence que le nombre de somite est constant au sein d'une même espèce et est déterminé au moment de la formation de PSM (Cooke, 1975). Cependant, le mécanisme de régulation du nombre de somite n'est toujours pas élucidé à ce jour.

### III.A.4.1.2 Modèle de l'horloge moléculaire et de la vague

La vitesse de mise en place constante des somites au sein d'un organisme peut être expliquée grâce au modèle de l'horloge moléculaire et de la vague (Cooke and Zeeman, 1976): au sein du PSM qui est non segmenté, des boucles de régulation positives et négatives impliquant NOTCH, WNT, FGF et l'acide rétinoïque (RA) créent des vagues d'expression de protéines (**Figure 12**) (Bénazéraf et al., 2010; Resende et al., 2014). Cela a pour conséquence la formation d'un nouveau somite à chaque fois que « l'horloge » repasse par un point précis. (Dubrulle et al., 2001; Goldbeter and Pourquié, 2008; Palmeirim et al., 1997). Pendant une oscillation de l'horloge, le front de détermination se déplace vers le pôle caudal d'une distance égale à la taille d'un somite. Il a été proposé que lorsque les cellules du PSM sont dépassées par le front de détermination, elles deviennent compétentes aux signaux de l'horloge (Dequéant and Pourquié, 2008).



**Figure 12: Modèle de l'horloge moléculaire et de la vague**

**A.** Représentation de l'horloge de segmentation à différentes phases de l'oscillation de l'expression de hairy1 pendant un cycle de formation d'un nouveau somite. Le point rouge représente une cellule et met en évidence l'oscillation de l'expression de hairy dans le PSM indéterminé. **B.** Représentation des différents signaux interagissant lors de la formation des somites. Les oscillations moléculaires (flèches bleues) ont lieu au niveau du PSM indéterminé. Adapté d'après (Resende et al., 2014).

Ces vagues protéiques cycliques, en plus de définir la temporalité de génération de somites, permettent de spécifier leur localisation. Ce modèle d'horloge moléculaire explique donc la spécificité spatio-temporelle de la formation de nouveaux somites.

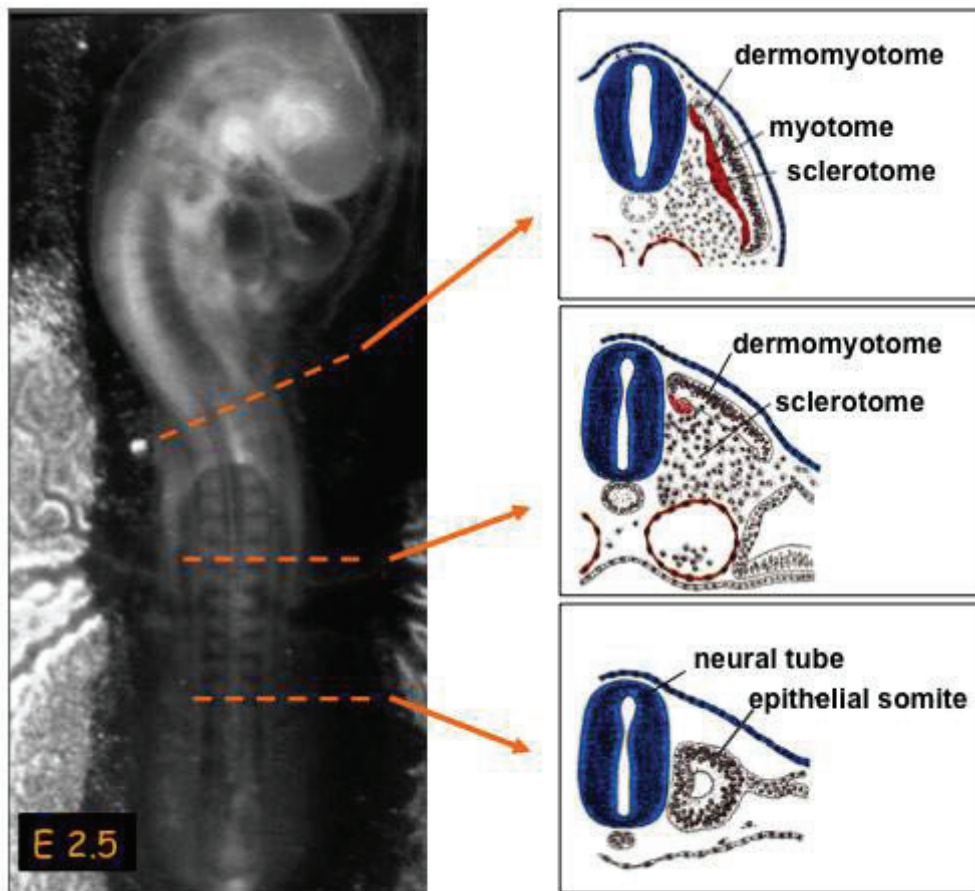
### III.A.4.2 Étapes morphologiques

Les somites néoformés sont composés de cellules mésenchymateuses. Juste après la formation du somite, les cellules externes deviennent épithéliales, contrairement aux cellules internes qui restent mésenchymateuses (Williams, 1910, Solursh et al., 1979). La surface externe de cet épithélium est formé par le pôle basal des cellules épithéliales et recouvert d'une lame basale (Hay, 1968), qui permet la stabilisation de la structure ainsi que les interactions avec les tissus adjacents *via* la MEC (matrice extra-cellulaire). L'inhibition des contacts cellules-MEC a pour conséquence une morphologie abhérente (Jacob et al., 1991). Les changements morphologiques liés à l'épithélialisation de chaque somite sont interdépendants de changements moléculaires. Ainsi, à l'acquisition de propriétés de jonctions cellulaire et de polarité est liée l'augmentation de molécules d'adhésion telles que la N-cadhérine, la N-CAM et la  $\beta$ -caténine (Duband et al., 1987; Marcelle et al., 2002). Ces molécules permettent aux cellules de devenir solidaires et ainsi former un épithélium orienté baso-apicalement (les jonctions se faisant dans la partie apicale)(Linask et al., 1998; Saga et al., 1997).

Lors de la formation du somite, les cellules épithéliales ne sont pas encore engagées dans une voie de différenciation ou spécification : placées dans un nouvel environnement, elles peuvent se différencier en d'autres types cellulaires. Des expériences de rotation des somites ont permis de mettre en évidence que la localisation initiale n'a pas d'importance, et ainsi que les cellules somitiques ne sont pas spécifiées au moment de l'épithélialisation mais que des signaux de l'environnement permettent la spécification et compartimentation (Aoyama and Asamoto, 1988; Dockter and Ordahl, 2000). Les principales familles de facteurs impliquées, provenant des tissus adjacents, sont Sonic Hedgehog, Noggin, Wnt et BMP (Borycki and Emerson, 1997; Münsterberg and Lassar, 1995; Münsterberg et al., 1995; Palmeirim et al., 1998; Pourquoié et al., 1996; Pownall et al., 1996; Šošić et al., 1997) .

Ces différents signaux permettent la mise en place de trois compartiments : le sclérotome, le dermomyotome et le myotome.

La majorité des études portant sur les aspects morphologiques et moléculaire de la mise en place et de l'évolution des somites ont été réalisées chez l'embryon de poulet car, en plus de la facilité d'accès et de manipulation, la technique de greffe caille/poulet a permis de réaliser des cartes de lignages cellulaire et ainsi d'identifier les précurseurs des différentes régions somitiques (Le Douarin, 1969).



**Figure 13: Différenciation du somite dans l'embryon de poulet.**

La photo de gauche représente un embryon de poulet à 2,5 jours post fécondation. Les somites se forment en région caudale et à partir du mésoderme paraxial et se différencient selon l'axe antéro-postérieur. Les somites les plus jeunes sont donc situés en région caudale. Les somites néoformés sont des sphères de cellules épithéliales qui vont rapidement se compartimenter. La partie ventrale se différencie en sclérotome alors que la partie dorsale reste épithéliale et est appelé dermomyotome. Un troisième compartiment, le myotome (en rouge), émerge alors à partir d'une bordure du dermomyotome (la DML).

### **III.A.4.3 Devenir des cellules somitiques dépendant de la localisation au sein du somite**

Les cellules épithéliales du somite néoformé sont pluripotentes. Elles auront des destins et des différenciations différents en fonction de leur localisation mais aussi des signaux des tissus adjacents (tube neural, chorde, mésoderme intermédiaire ou ectoderme). Cela a été mis en évidence par des études réalisées par Murray and Selby en 1933 (cité par (Monsoro-Burq, 2005)) qui ont mis en évidence que des somites cultivés *ex-vivo* seuls ne survivent pas



alors qu'ils se développent si ils sont cultivés en présence de notochorde. De plus, dès les années 1960, des études détaillées *via* des fusions caille/poulet ont permis d'identifier le devenir des différentes régions du somite à l'aide de marquages nucléaires espèces - spécifiques (Le Douarin, 1969).

Les cellules épithéliales des somites sont à l'origine de trois structures essentielles :

- Le sclérotome, à l'origine des vertèbres, côtes et cartilages axiaux. Cette structure est induite (via Pax1, Pax9, et Nkx3.1) par une forte concentration de la protéine Sonic Hedgehog sécrétée par la chorde. (Chiang et al., 1996; Monsoro-Burq, 2005; Müller et al., 1996) ;
- Le myotome, à l'origine des muscles striés squelettiques (Gros et al., 2004).
- Le dermomyotome, à l'origine des tissus conjonctif sous-jacent de la peau (derme et hypoderme) (Olivera-Martinez et al., 2004).

Ces trois structures se mettent en place sous l'influence des tissus adjacents. Ainsi, la mise en place du sclérotome est dépendante de la notochorde alors que les signaux en provenance du tube neural dorsal et de l'ectoderme permettent la formation du dermomyotome.

Nous allons ici détailler sommairement le devenir des différents progéniteurs présents au sein des somites en fonction de leur localisation.

### III.A.4.3.1 Sclérotome

Très rapidement après la formation du somite, les cellules épithéliales la partie ventrale de celui-ci subissent une EMT et deviennent mésenchymateuses. Elles perdent leur polarité apico-basale et acquièrent une polarité antéro-postérieure, formant le sclérotome (**Figure 13**). Ces cellules sont hautement prolifératives et mobiles. (Christ and Scaal, 2008; Christ et al., 2004).

Les cellules de la région ventro-médiane du sclérotome qui migrent vers la notochorde donnent naissance au tissu périnotochordal qui par la suite se différenciera en les corps vertébraux et les disques intermédiaires (Brand-Saberi et al., 1996; Goldstein and Kalcheim, 1992). Au niveau thoracique, les cellules du sclérotome migrent ventralement pour former les côtes (Huang et al., 1996).

La région dorso-latérale du sclérotome (entre le sclérotome et le myotome) est à l'origine des futurs tendons du squelette axial. Les progéniteurs sont induits à partir des cellules du sclérotome par PAX1 et FGF des cellules du myotome adjacent (Brent and Tabin, 2004; Brent et al., 2003; Dubrulle and Pourquie, 2003).

La région du sclérotome proche du tube neural donne naissance aux méninges de la moelle épinière ainsi qu'aux vaisseaux sanguins qui irriguent la moelle épinière (Halata et al., 1990; Nimmagadda et al., 2007).

### III.A.4.3.2 Dermomyotome

Très rapidement après l'initiation de la formation sclérotome, le dermomyotome se met en place (**Figure 13**) (Ordahl and Le Douarin, 1992). Il est constitué d'un feuillet central épithélial et de quatre bordures appelées lèvres qui sont nécessaires à la formation du troisième composant du somite, le myotome. Les quatre lèvres sont la DML (dorso-médiale, proche du tube neural), la VLL (ventrolatérale, proche du mésoderme intermédiaire), l'AL (lèvre antérieure) et la PL (lèvre) postérieure, proches des espaces intersomitiques. Pax3 et Pax7 sont habituellement utilisés afin de marquer spécifiquement les cellules du dermomyotome (Denetclaw et al., 2001; Gros et al., 2004; Kaehn et al., 1988; Kahane et al., 1998).

Les différentes régions du dermomyotome sont morphologiquement et moléculairement différentes. Les cellules de la DML expriment Wnt-11 (Christiansen et al., 1995; Marcelle et al., 1997; Tanda et al., 1995) alors que celles de la VLL expriment Sim-1 (Pourquie et al., 1996). Les lèvres antérieure et postérieure sont caractérisées par la présence de *Dll3* et *Dll1* (Dunwoodie et al., 1997). La partie centrale est un épithélium pseudo-stratifié exprimant Engrailed-1 (En-1) (Olivera-Martinez et al., 2002).

L'expression de Wnt11 au niveau de la DML est un exemple l'influence de l'environnement sur la spécification moléculaire des différentes régions du dermomyotome (Fan et al., 1997; Marcelle et al., 1997). En effet, son expression dérive du contact du tube neural proche (*via* les crêtes neurales). Il a été mis en évidence, qu'en plus de la communication paracrine, les cellules somitiques peuvent interagir physiquement avec des cellules adjacentes. La première mise en évidence de ces interactions physiques a été réalisée *via* stéréomicroscopie, montrant que les cellules épithéliales dorsales du somite présentent des projections en contact avec l'ectoderme adjacent (Jacob et al., 1979).

Ainsi, les somites vont donner naissance à de plusieurs types cellulaires distincts, tout comme les crêtes neurales. Ces spécialisations et spécifications ont lieu après une étape importante durant laquelle les cellules vont passer le l'état épithélial à l'état mésenchymateux, l'EMT. Cette étape indispensable à la mise en place de ces structures est aussi indispensable dans de nombreux autres contextes, tant embryonnaires (gastrulation, tractus uro-génital...) que post-embryonnaires.

Dans cette seconde partie, nous allons voir plus en détail dans quels contextes cette EMT a lieu avant de nous intéresser aux différentes voies moléculaires impliquées.

### **III.B Importance et description de la transition épithélio-mésenchymateuse dans les contextes normaux et pathologiques**

Lors du développement embryonnaire, les cellules sont dans un état de haute plasticité et de grand dynamisme, elles peuvent notamment passer de l'état épithélial à mésenchymateux et inversement. Ce passage de l'état épithélial à mésenchymateux est appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Au cours de cette transition, les cellules épithéliales vont perdre leur polarité apico-basale, subir une modification de l'expression des gènes d'adhésion cellulaires et ainsi acquérir des propriétés migratoires et/ou invasives.

## **III.B.1 Mécanisme morphologique de la transition épithélio-mésenchymateuse**

### **III.B.1.1 Définition**

Les cellules épithéliales sont très jointives les unes aux autres grâce à un réseau très dense et complexe de molécules d'adhésion. Ces cellules possèdent une forte polarité apico-basale (les deux pôles ayant des fonctions différentes) et reposent, du côté basal sur une membrane basale.

*Stricto sensu*, la transition épithélio-mésenchymateuse, EMT, est définie par deux modifications phénotypiques majeurs : la perte des molécules caractéristiques des cellules épithéliales telles que les molécules d'adhésion et l'acquisition de caractéristiques de type mésenchymateux. La difficulté inhérente à cette définition est que le mésenchyme ne se définit pas par ses caractéristiques intrinsèques mais par défaut, c'est à dire comme n'appartenant ni au tissu nerveux, ni épithélial, ni musculaire, etc...Sa fonction première est de fabriquer de la matrice extracellulaire (hertig, 2013). De plus, les cellules mésenchymateuses ont généralement d'importantes propriétés migratoires.

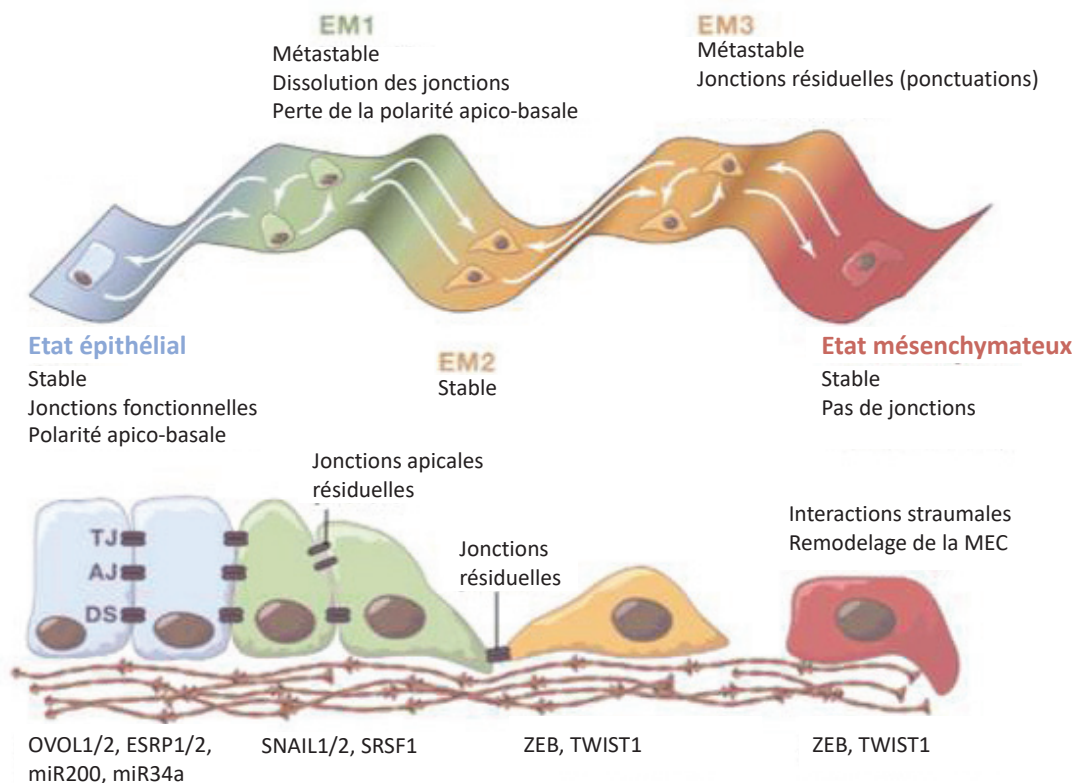
Du point de vue moléculaire, l'EMT se définit par la perte des marqueurs épithéliaux conventionnels- tels que les occludines et les cytokératines (Thiery and Sleeman, 2006) - et par l'apparition de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine (Thiery et al., 2009).

### **III.B.1.2 Plasticité de l'EMT**

L'EMT joue un rôle incontournable lors du développement embryonnaire. C'est à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle que des évidences histologiques claires ont mis en évidence l'EMT : au cours de la gastrulation, des cellules mésenchymateuses dérivent de l'épiblaste (épithélial) adjacent (Nieto et al., 2016). Les premières expériences ayant permis de reproduire l'EMT ont montré que des cellules épithéliales embryonnaires et adultes incluses dans des matrices 3D enduites de collagène acquièrent des propriétés migratoires, invasives et ressemblent à des fibroblastes (Greenburg and Hay, 1982).

La première définition de l'EMT a été la transformation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses (Hay, 1995). Cette définition insistait sur le changement d'un état fixe à un autre état fixe. Le terme de transformation a été remplacé par transition, afin de rendre compte de l'état de plasticité de ce système liant les états épithéliaux et mésenchymateux.

D'autres études, sur cellules puis sur des tumeurs circulantes et des organes fibrotiques, ont permis de renforcer cette idée de plasticité et de mettre en évidence qu'il existe un large spectre d'états entre les états initiaux et finaux, et que l'EMT peut être totale ou partielle (**Figure 14**) (Arnoux et al., 2008; Futterman et al., 2011; Grande et al., 2015; Leroy and Mostov, 2007; Nieto et al., 2016). Il existe donc des états intermédiaires entre l'état épithélial et l'état mésenchymateux (Huang et al., 2013; Jordan et al., 2011; Yu et al., 2013). Les cellules présentant ces phénotypes hybrides sont dites métastables, reflétant ainsi leur capacité à pouvoir rester dans cet état ou bien finir ou inverser leur processus d'EMT (Lee et al., 2006; Rosanò et al., 2006).



**Figure 14: Les différents états entre une cellule épithéliale et une cellule mésenchymateuse**

Le schéma du haut représente les différents états stables ou métastables dans lesquels la cellule peut se trouver. Le schéma du bas récapitule les changements morphologiques et moléculaires lors de la transition épithélio-mésenchymateuse, adapté de (Nieto et al., 2016).

## **III.B.2 Différentes vagues d'EMT durant le développement embryonnaire**

La transition de cellule épithéliale à cellule mésenchymateuse, en plus de pouvoir n'être que partielle, n'est pas irréversible. Ainsi, plusieurs cycles d'EMT et MET se succèdent au cours du développement embryonnaire afin de parvenir à la différenciation des cellules spécialisées et à l'acquisition de la structure tridimensionnelle des organes. Conventionnellement, trois cycles de d'EMT sont reconnus (Futtermann et al., 2011; Nieto et al., 2016).

### **III.B.2.1 Premier cycle d'EMT : gastrulation et crêtes neurales**

Comme décrit précédemment, de nombreux mouvements morphogénétiques ont lieu au cours de l'embryogénèse, notamment au moment de la gastrulation. Des changements au niveau de la morphologie cellulaire mais aussi la convergence au niveau de la ligne médiane et l'internalisation du mésoderme et l'extension antéro-postérieure sont des étapes incontournables. Les premières cellules à subir une EMT lors de l'embryogénèse sont les cellules mésodermiques qui vont s'internaliser.

Chez les invertébrés tels que l'oursin (**Figure 15 A**), la voie Wnt permet l'activation de Snail et Twist, qui sont des répresseurs de la E-cadhérine très bien conservés. Cela conduit à l'inhibition de la transcription de la E-cadhérine ainsi qu'à l'endocytose des protéines déjà présentes, permettant ainsi la délamination des cellules du mésenchyme primaire (PMC) par EMT (Wu et al., 2007, 2008)

Comme chez l'oursin, Snail et Twist sont indispensables à la gastrulation chez la drosophile (**Figure 15 B**). La constriction apicale et l'invagination sont dues à Twist *via* recrutement au niveau des jonctions adhérentes de T48 et de RhoGEF2, une protéine Rho permettant l'échange de GTP- (Kölsch et al., 2007). Snail, *via* un homologue de cdc25, bloque l'entrée en mitose, nécessaire à la gastrulation (Grosshans and Wieschaus, 2000). De manière simultanée, les voies Snail et Twist coopèrent afin de réprimer la transcription de la E-cadhérine (Oda et al., 1998) et de réaliser les cycles de contraction de la ceinture de myosine II, générateurs de la constriction apicale (Martin et al., 2009).

Chez les Vertébrés, plusieurs molécules de la voie Twist (telles que T48) ne sont pas conservées, suggérant que cette voie, indispensable chez l'oursin et la Drosophile, ne l'est pas chez les Vertébrés et que la voie Snail est prédominante (**Figure 15 C**).

Chez le Xénope, Wnt est à l'origine de l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans la région dorsale de l'embryon, permettant l'induction du centre organisateur de Nieukoop (*via* la présence de Vg1 en région ventrale de l'embryon) puis du centre organisateur de Spemann (*via* gradient de BMP et Nodal, membre de la famille TGF $\beta$ ) (Gilbert, 2007; vervoort, 2013). De manière similaire, chez les Amniotes, la signalisation Wnt est à l'origine de la spécification de la ligne primitive, et les membres de la famille TGF $\beta$ , incluant Nodal et Vg1, induisent la gastrulation. Nodal et FGF (fibroblast growth factor) permettent la spécification du mésoderme. Ainsi, l'EMT concomitante à la gastrulation chez les amniotes est sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation, incluant Wnt, FGF, TGF $\beta$ , BMP et EGF (**Figure 15 C**) (Ciruna and Rossant, 2001; Heisenberg and Solnica-Krezel, 2008).

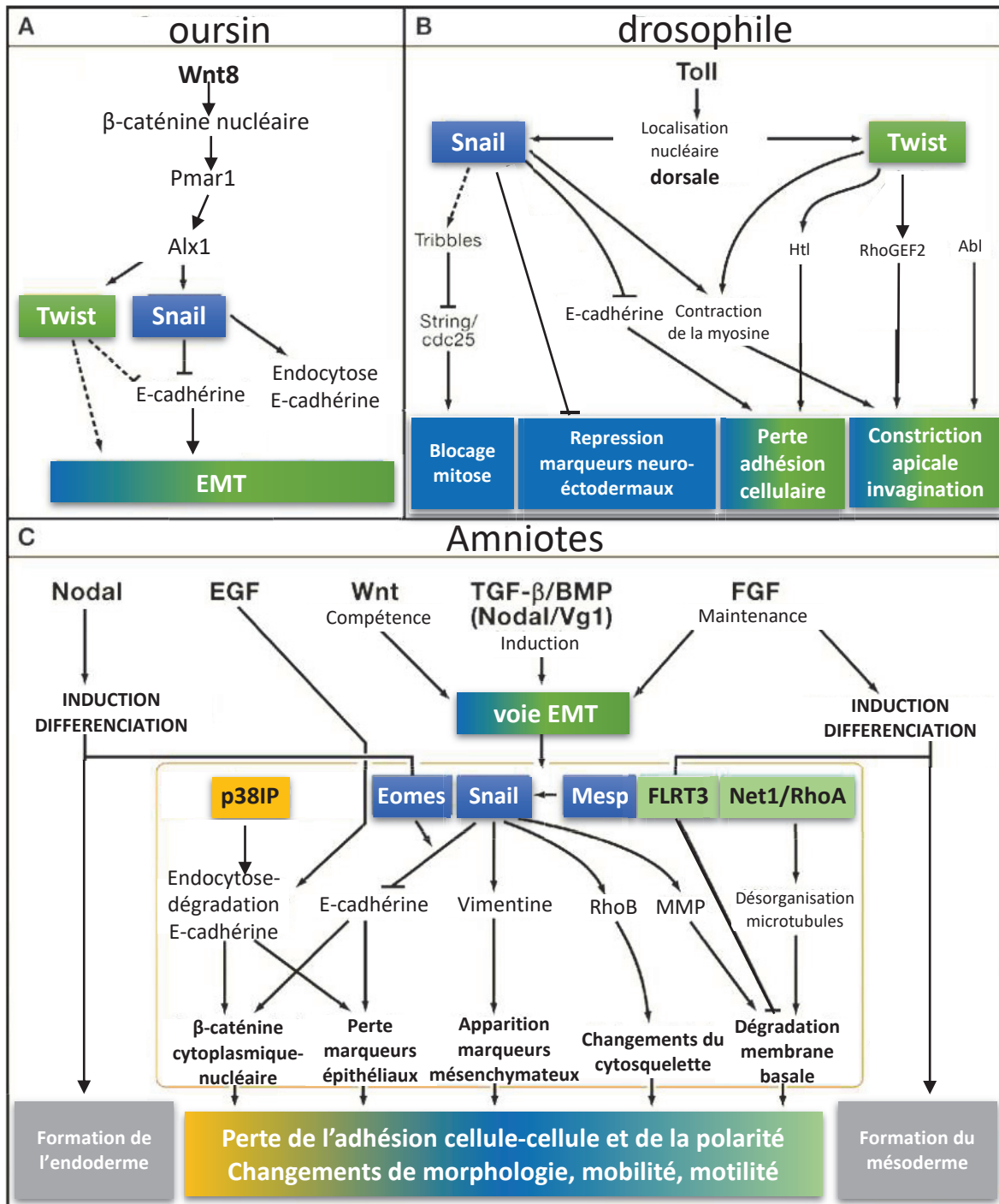
Peu après la gastrulation, chez les Vertébrés, les territoires épidermiques et neuraux se déterminent progressivement le long de l'axe rostro-caudal. A partir de l'épithélium neural, des cellules vont subir une EMT et se différencier en cellules de crête neurale. Bien qu'ayant fortement progressé ces 10 dernières années, la compréhension du réseau régulateur de cette EMT est bien moins limitée que celui de la gastrulation. Ce réseau sera détaillé en **III.C.1**.

### **III.B.2.2 Deuxième cycle d'EMT : somites, pancréas et tractus génital**

Le premier cycle d'EMT est suivi de la différenciation de nombreux types cellulaires. Par exemple, les cellules des crêtes vont se différencier en neurones, cartilages, os ou encore mésoderme (Bhatt et al., 2013). Les cellules mésodermiques vont, *via* MET, pouvoir former la notochorde, les somites, les précurseurs du système urogénital, etc... Ces épithéliums secondaires vont subir une seconde EMT à l'origine de cellules mésenchymateuses à potentiel de différenciation plus restreint (Nieto et al., 2016).

La répression des facteurs de la famille Snail contrôle la MET à l'origine du mésoderme axial présomitique (Morales et al., 2007). Ces oscillations de protéines SNAIL nécessitent les voies Wnt et TGF mais sont indépendantes de la voie NOTCH (Dale et al., 2006). Cette épithélialisation est contrôlée par Rac1 et Cdc42 (Duquette and Lamarche-Vane, 2014). Il a ainsi été mis en évidence *via* électroporation du mésoderme présomitique chez l'embryon de poulet que l'inhibition de Cdc42 provoque une hyperépithélialisation alors que la surexpression de cette protéine provoque une absence d'épithélialisation, et les cellules restent mésenchymateuses (Nakaya et al., 2004). Ainsi, il existe un équilibre des niveaux de





**Figure 15: Voies moléculaires impliquées lors de la gastrulation**

**A.** Voie moléculaire induisant la gastrulation chez l'embryon d'oursin. La spécification implique la signalisation Wnt8 via Snail et Twist, permettant l'EMT et l'ingression des cellules mésenchymateuses via inhibition et séquestration de la E-cadhérine. **B.** Voie moléculaire induisant la gastrulation chez l'embryon de drosophile. Les voies Snail et Twist coopèrent afin de moduler l'adhésion cellule-cellule et le cytosquelette pour permettre l'EMT. Abl : Abelson kinase ; Htl : Heartless (récepteur FGF chez la drosophile). **C.** Voie moléculaire induisant la gastrulation chez les amniotes. La convergence des voies de signalisation dans la région postérieure de l'embryon permet la mise en place de la ligne primitive et l'initiation de l'EMT. Snail est un élément clef de la régulation de l'EMT chez les amniotes, contrôlant la relocalisation de la  $\beta$ -caténine, l'adhésion cellule-cellule, la forme des cellules ainsi que la motilité cellulaire. Adapté de (Thiery et al., 2009).

Cdc42 permettant aux cellules du mésoderme de rester mésenchymateuses en présence de hauts niveaux de Cdc42 ou bien de devenir épithéliales lorsque les concentrations sont plus faibles (Nakaya et al., 2004). De la même manière, il a été mis en évidence que la surexpression ou l'inhibition de Rac1 provoque un défaut d'épithélialisation (Nakaya et al., 2004). Un niveau intermédiaire de Rac1 est donc nécessaire à une MET au niveau du mésoderme présomitique. Les somites subiront ensuite une seconde EMT à l'origine des types cellulaires décrits en [III.A.4.3](#). Depuis plusieurs années, notre laboratoire étudie l'EMT des cellules de la lèvre dorso-médiale du somite. Les cellules de la partie dorso médiale du somite deviennent des myoblastes qui forment les cellules musculaires et cellules satellites (Gros et al., 2005). Je décrirai cette EMT plus précisément en [III.C.2](#). D'autres types cellulaires, tels que le foie (Tanimizu and Miyajima, 2007), ou les cellules pancréatiques (Johansson and Grapin-Botton, 2002) sont formé après une étape d'EMT.

### [III.B.2.3 Troisième cycle d'EMT : développement du cœur](#)

Le cœur est formé *via* trois cycles successifs d'EMT et MET (Mercado-Pimentel and Runyan, 2007; Nakajima et al., 2000). Les cellules cardiaques mésodermiques sont spécifiées durant le premier cycle d'EMT (myocarde), puis l'épithélium double est organisé *via* MET à partir des cellules de la splanchnopleure. Un second cycle d'EMT permet la délamination de cellules endothéliales qui forment ensuite le tissu endocardique, après MET. Suite à ces deux cycles d'EMT, les deux tubes formant le cœur se développent en quatre compartiments et les valves sont mises en place *via* le troisième cycle d'EMT (Nakajima et al., 2000).

Chez l'embryon de poulet, la formation des valves est contrôlée par trois voies de signalisation distinctes : TGF $\beta$ , Notch et EGF. TGF $\beta$ 2 active TGF $\beta$ RIII afin de permettre l'initiation de l'EMT (Mercado-Pimentel and Runyan, 2007). Grâce à une induction latérale, Notch permet la régulation de la production de TGF $\beta$ 2 *via* translocation dans le noyau et activation de RBPJ (Nakajima et al., 2000). La transcription de *Snail1* est activée par le complexe NICD/RBPJ (Timmerman et al., 2004). *Snail1* réprime la transcription de la *E-cadherin* et permet l'EMT. Ainsi, les embryons ayant une voie Notch altérée présentent un défaut de transcription de *snail* au niveau cardiaque ainsi qu'un maintien anormal des complexes d'adhésion intercellulaire endocardiques et un défaut d'EMT, *in vitro* et *in vivo* (Timmerman et al., 2004).

Gata4, codant un facteur de transcription à doigts de zinc, est exprimé dans l'endothélium et le mésenchyme des valves auriculoventriculaires (Rivera-Feliciano et al., 2006). Son inactivation inhibe l'EMT et montre une diminution de la concentration de Erbb3, un récepteur de la famille des EGF ainsi que de la concentration de Erk, ces deux molécules étant essentielles à l'EMT au niveau des valves cardiaques (Rivera-Feliciano et al., 2006).

### **III.B.3 Variété et unicité des EMT**

Depuis quelques années l'EMT et les états intermédiaires qui y sont liés ont été identifiés comme impliqués dans des processus autres que le développement embryonnaire tels que la réponse aux blessures, les fibroses ou encore la progression tumorale. Les processus morphologiques et moléculaires impliqués sont similaires à ceux des EMT embryonnaires.

#### **III.B.3.1 EMT comme réponse physiologique aux blessures**

Lors de la cicatrisation, les kératinocytes du bord de la blessure acquièrent un phénotype intermédiaire, dit « métastable » qui leur permet de migrer en maintenant des jonctions avec les cellules voisines, mais ne migrent pas comme cellules individuelles (Nieto et al., 2016). L'expression de Snail2 dans les kératinocytes participe au contrôle de la vitesse de cicatrisation : sa surexpression mène à une cicatrisation accélérée (Arnoux et al., 2008).

Lors de chaque cycle menstruel, l'épithélium ovarien subit un processus « EMT like » lors de la cicatrisation post ovulatoire (Ahmed et al., 2006). Cette EMT est induite par les EGF (epithelial growth factor) et implique l'activation de métallo-protéases et kinases telles que ERK et ILK.

Chez le poisson zèbre, lors de la régénération cardiaque, des voies de signalisations impliquées lors du développement embryonnaire sont réactivées, telles que la voie impliquant fgfr4 et fgfr2 et menant à une EMT des cellules épicaudales qui vont alors migrer et faciliter la néovascularisation dans le myocarde en cours de régénération/cicatrisation (Lepilina et al., 2006).

### **III.B.3.2 EMT et pathologies**

L'EMT n'est toutefois pas un processus cellulaire restreint au développement embryonnaire ou à une réponse physiologique à une blessure. En effet, depuis une quinzaine d'années, de nombreuses études ont démontré son importance dans deux grandes familles de pathologies : les fibroses et les cancers.

Au niveau cellulaire, les EMT physiologiques et pathologiques sont très proches, tant au niveau morphologique que moléculaire. (Thiery et al., 2009)

#### **III.B.3.2.1 EMT et fibroses**

La fibrose désigne la transformation de certains tissus en un tissu fibreux, proche du tissu conjonctif. Elle intervient souvent à la suite d'une lésion tissulaire ou d'une inflammation d'un tissu où ceux-ci ne se régénèrent pas correctement. Cela est dû à une activation pathologique des fibroblastes interstitiels qui se transforment en myofibroblastes. Ceux-ci sécrètent du collagène qui s'accumule et forme un réseau de collagène fibrotique. Cela compromet le fonctionnement normal des organes dans lesquels a lieu cette accumulation de collagène et provoque leur défaillance à long terme (Falke et al., 2015; Rockey et al., 2015; Rogler, 2014; Tzou et al., 2014).

Une étude de lignage cellulaire a permis de mettre en évidence qu'une partie importante de ces myofibroblastes proviennent de cellules épithéliales qui ont subi une EMT (Iwano et al., 2002). Cela a été initialement démontré sur des cellules des tubules rénaux, puis cela a été généralisé aux endothéliums (Flier et al., 2010), hépatocytes (Zeisberg et al., 2007b), cardiomyocytes (Zeisberg et al., 2007a) et épithéliums pulmonaires (Kim et al., 2006; Yang et al., 2013), ect... Lors des fibroses rénales et cardiaques, des EMT particulières, impliquant la transition de cellules endothéliales en cellules mésenchymateuses ont lieu (EndMT : EMT endothéliale) (Zeisberg et al., 2007a, 2008).

De plus, l'implication de la voie TGF $\beta$  est démontrée dans plusieurs modèles de fibrose. De hauts niveaux de TGF $\beta$  ont été trouvés dans des tissus fibrotiques rénaux (Saika et al., 2004). Smad7 (un inhibiteur de la voie TGF $\beta$ ) prévient la cataracte dans le modèle murin en inhibant l'EMT impliquée (Sato et al., 2003). D'autres modèles murins ont permis de mettre en évidence que l'absence de Smad3 (effecteur de la voie TGF $\beta$ ) empêche la fibrose rénale (souris Smad3<sup>ex8/ex8</sup>) (Sato et al., 2003).

De même, Snail, qui peut être induit par TGF $\beta$  dans différents contextes, est suffisant pour induire une fibrose rénale (Boutet et al., 2006).

Ainsi, les voies moléculaires impliquées dans les EMT et EndMT à l'origine des fibroses sont similaires à celles des EMT physiologiques.

### III.B.3.2.2 EMT et cancers

Bien que l'EMT ait été identifiée dans de nombreux modèles cancéreux *in-vitro*, son importance *in-vivo* a été débattu pendant longtemps (jusqu'à 2010), principalement à cause du manque d'évidence d'EMT dans les prélèvements de tissu des patients (Thiery et al., 2009). En effet, il est très compliqué de différencier une cellule mésenchymateuse (provenant d'un tissu épithélial tumoral ayant subi une EMT) de cellules stromales ou d'autres fibroblastes. Une étude morphologique de tissu colorectal de 2007, met en évidence, au niveau des fronts de progression des tumeurs humaines, que des agrégats de cellules se développant ou se détachant dans le stroma adjacent réalisent une EMT (Prall, 2007). De même, des études ont montré, toujours dans le cas des cancers intestinaux, que des EMT ont lieu au niveau des marges tumorales et que les cellules ayant subi une EMT présentent un déficit d'expression de l'E-cadhérine, associé à la dérégulation de la voie WNT ( $\beta$ -caténine) (Brabletz et al., 2001). Les mêmes observations ont été faites dans des cas de cancers du sein, de la thyroïde et du poumon (Glackin, 2014; Jin et al., 2016; Mariz et al., 2015; Rezk et al., 2004; Van Scoyk et al., 2008). Chez la souris, la pression mécanique exercée par l'hyperprolifération des cellules tumorales du colon provoque la sur activation de la voie  $\beta$ -caténine (Fernández-Sánchez et al., 2015).

Cependant, dans plusieurs cancers humains et murins, les mouvements collectifs des cellules tumorales au niveau de la marge tumorale sont induits par des processus EMT-indépendants liés au remodelage de l'actine *via* la voie podoplanine. (Wicki et al., 2006). Ainsi, bien que l'EMT apparaisse comme une voie de régulation de l'équilibre entre croissance tumorale et diffusion de cellules tumorales, une voie EMT-dépendante et EMT-indépendante semblent agir simultanément au niveau des marges tumorales *in vivo* (Wyckoff et al., 2007).

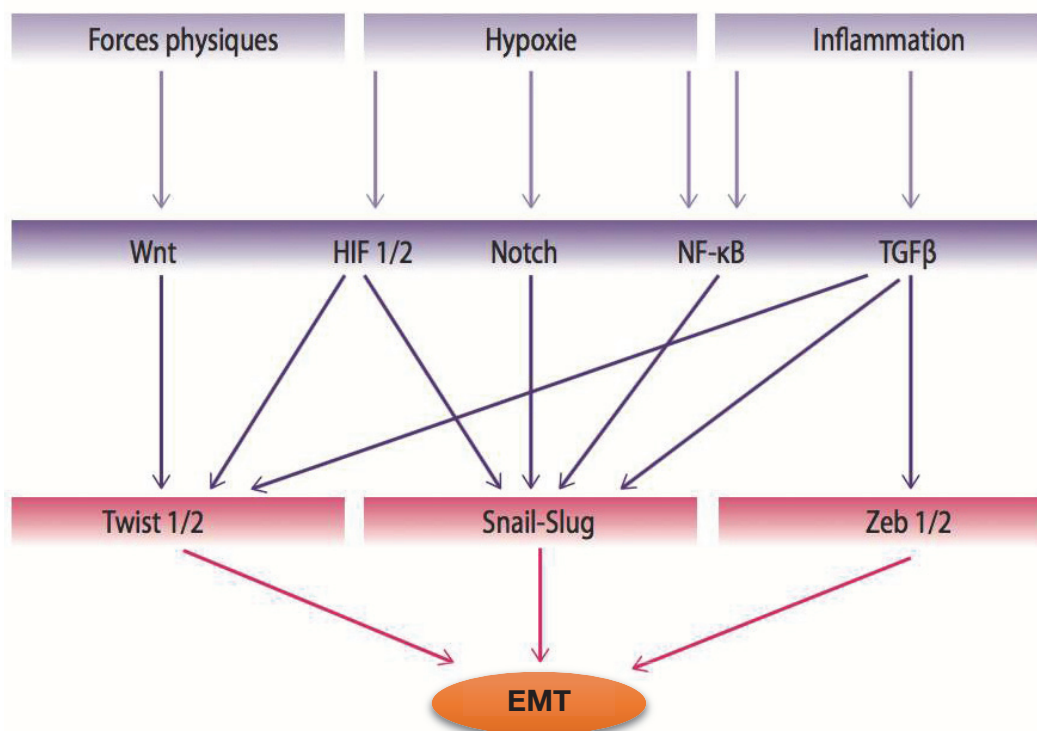
Les voies moléculaires impliquées sont des EMT-TF (EMT activating transcription factors), et particulièrement les voies SNAIL, WNT, NOTCH, TWIST et ZEB et TGF- $\beta$  (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Boutet et al., 2006; Carver et al., 2001; Chanrion et al., 2014; Illman et al., 2006; Jung et al., 2008; Radisky et al., 2005) (**Figure 16**). Ces EMT-TF sont impliquées dans tous les stades de progression tumorales, de la phase d'initiation à la phase de migration, en passant par les phases de croissance tumorale, invasion, dissémination et formation de métastases. (Brabletz et al., 2018). Ces voies peuvent agir de manière indépendante mais

sont le plus souvent liées, comme par exemple Notch et Wnt (Fre et al., 2009). Cela est généralisable à la plupart des espèces (Fre et al., 2009).

SNAIL, ZEB, E47 et KLF8 répriment directement la transcription de l'E-cadhérine, ce qui conduit à l'apparition d'un phénotype mésenchymateux (Peinado et al., 2004, 2007). Twist, TCF4 et Gooscoïd répriment indirectement la transcription de l'E-cadhérine *via* des voies cytoplasmiques (Sobrado et al., 2009; Yang and Weinberg, 2008). De récentes études ont mis en évidence l'implication de l'ARN antisens de ZEB2 (NAT) et de miARN dans la régulation de l'EMT par ZEB.

SNAIL et ZEB induisent l'expression de métallo-protéases qui participent à la dégradation de la membrane basale et ainsi favorisent la dissémination cellulaire (Radisky et al., 2005). Certaines de ces protéases sont capables à elles seules d'induire l'EMT, certainement *via* une boucle de régulation positive.

De plus, en lien avec le remodelage des jonctions cellulaires et l'ancrage à la membrane basale, la périostine, une protéine de la matrice extracellulaire sécrétée par les ostéoblastes, peut induire l'EMT *via* interaction avec les intégrines et la voie PI3-K/AKT. Cette protéine peut aussi induire l'invasion et les métastases (Ruan et al., 2009)



**Figure 16: Mécanisme d'induction de l'EMT lors de la tumorigénèse**

Les principaux EMT-TF sont activés en réponse à des contraintes physiques, hypoxie ou inflammation. Adapté de (Puisieux et al., 2014).

Ces voies EMT-TF sont aussi impliquées dans les pronostics et la résistance aux thérapies : une corrélation importante entre les concentrations de SNAIL et le taux de survie a été établie dans les cancers du sein, de l'ovaire et colorectal. *In vitro*, la suppression de l'EMT augmente la sensibilité aux traitements basés sur le ciblage des récepteurs EGF (carcinomes hépatiques et pancréatiques).

Ainsi, l'EMT apparaît comme un processus indispensable au développement embryonnaire mais aussi impliqué dans de nombreux processus, tant normaux que pathologiques. Nous allons maintenant détailler deux voies moléculaires, Wnt et Notch, impliquées dans la régulation de l'EMT ainsi qu'une molécule clef de cette transition, Snail.

### **III.B.4 Voies moléculaires impliquées**

#### **III.B.4.1 Voie Wnt**

La voie Wnt a été historiquement découverte grâce à des expériences de mutagenèse chez *Drosophila melanogaster*. Des expériences menées en 1973 ont révélé que des mouches wingless présentaient des altérations au niveau des ailes mais aussi des haltères, qui se forment de manière indépendante (Sharma, 1973). Ainsi, la formation de ces deux structures « est contrôlée par des étapes similaires » (Sharma, 1973) (**Figure 17**). D'autres expériences ont mis en évidence que *wingless* (*wg*) – et plus tard son homologue chez les mammifères *Wnt*, (Rijsewijk et al., 1987) est impliqué dans la formation des tumeurs mammaires (Cabrera et al., 1987; Rijsewijk et al., 1987). Depuis, la voie Wnt a été démontée comme essentielle à de nombreux processus développementaux, tels que la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la spécification cellulaire ou encore la polarité cellulaire dans de nombreux contextes pathologiques ou non (Bielen and Houart, 2014; Clevers et al., 2014; Niehrs and Acebron, 2012; Van Camp et al., 2014).

Nous allons d'abord détailler les différents acteurs de la voie Wnt avant de nous intéresser aux différents mécanismes moléculaires mis en œuvre.



Sharma, R.P. Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India. wingless - a new mutant in *D. melanogaster*.

some and were subjected to genetic analysis. The results obtained showed that the wingless condition (see Figure) was governed by a single recessive gene, designated wingless (*wg*),



and mapped on the left arm of the second chromosome at approximately 30 map units distance. Further, the wingless phenotype was not completely stable. The progeny of wingless parents were comprised of flies with no wings, one wing and two wings in approximately 2:2:1 ratio. The segregation pattern was consistent. Progeny raised by crossing one-winged x one-winged and two-winged x two-winged (isolated from the progeny of wingless flies) also segregated into the three phenotypes. The ratio of the three classes, too, was similar to that obtained in the cross of wingless flies. This segregation pattern suggests that individuals with the three phenotypes are genotypically similar and that changed phenotypic expression is the result of incomplete penetrance.

Besides affecting the wing, the *wg* mutation has an associated effect on haltere development. In the wingless stock, flies with none, one or both of the halteres occurred. The suppression of wing and haltere development was, however, independent since flies with all combination of wing and haltere number were produced in the progeny of wingless parents. This points to the fact that there is complete autonomy in wing and haltere development but suggests that the critical stages during wing and haltere differentiation are controlled by similar steps.

Among the Ethyl methanesulphonate induced sex linked recessive lethals, maintained for the analysis of temperature sensitive mutants, wingless flies were recovered in one stock. These flies were freed from lethal bearing X-chromosome and were subjected to genetic analysis. The results obtained showed that the wingless condition (see Figure) was governed by a single recessive gene, designated wingless (*wg*), and mapped on the left arm of the second chromosome at approximately 30 map units distance. Further, the wingless phenotype was not completely stable. The progeny of wingless parents were comprised of flies with no wings, one wing and two wings in approximately 2:2:1 ratio. The segregation pattern was consistent. Progeny raised by crossing one-winged x one-winged and two-winged x two-winged (isolated from the progeny of wingless flies) also segregated into the three phenotypes. The ratio of the three classes, too, was similar to that obtained in the cross of wingless flies. This segregation pattern suggests that individuals with the three phenotypes are genotypically similar and that changed phenotypic expression is the result of incomplete penetrance.

Besides affecting the wing, the *wg* mutation has an associated effect on

**Figure 17: "Wingless a new mutant in *Drosophila melanogaster*," (Sharma, 1973)**

### III.B.4.1.1 Ligands de la voie Wnt

Les molécules WNT sont une famille de glycoprotéines sécrétées présentes chez tous les métazoaires chez lesquels elles ont été cherchées (Willert and Nusse, 2012; Willert et al., 2003). Ces molécules sont caractérisées par la présence d'un domaine N-terminal riche en cystéine lié à la sécrétion qui est très bien conservé (Hoppler et al., 1996). Après la sécrétion, les ligands WNT s'associent à des glycosaminoglycanes situés au niveau de la matrice extracellulaire et peuvent agir comme des morphogènes capables de signalisation à courte et longue distance. Leur interaction avec les lipides de la matrice extracellulaire est cruciale, car ils peuvent réguler la dégradation et la diffusion des molécules WNT, ou bien agir comme des co-récepteurs à faible affinité (Yan and Lin, 2009). Les protéoglycanes tels que DALLY et DALLY-like sont capables de transporter les ligands WNT en les déplaçant d'une cellule à l'autre, créant ainsi un gradient de signalisation Wnt (Lin and Perrimon, 1999).



Les protéines WNT se lient à leur récepteur au niveau de la membrane plasmique, tout en restant dans l'espace intercellulaire.

### **III.B.4.1.2 Récepteurs de la voie Wnt**

Deux familles de protéines réceptrices sont impliquées dans la voie Wnt : les récepteurs à sept segments transmembranaires Frizzled (FZD) et les protéines apparentées aux récepteurs lipoprotéiniques de basse densité (LRP), (Logan and Nusse, 2004).

Chez les mammifères, la famille FZD est composée de 10 homologues, possédant chacun une capacité variable d'activation de la signalisation Wnt (Schulte, 2015; Schulte and Bryja, 2007). La famille LRP est plus restreinte, avec seulement deux membres, LRP 5 et LRP6 (Joiner et al., 2013; Logan and Nusse, 2004; Williams and Insogna, 2009). Ce dernier est essentiel au cours du développement, alors que LRP5 est nécessaire au maintien d'une homéostasie correcte chez l'adulte (He et al., 2004).

Bien qu'aucune preuve *in vivo* n'ait été présentée, des tests *in vitro* de liaison et l'utilisation de protéines de fusion ont démontré que la liaison des ligands WNT induit la formation d'un complexe FZD-LRP (He et al., 2004), ce qui est probablement une étape nécessaire pour induire la signalisation en aval.

### **III.B.4.1.3 Agonistes et antagonistes extracellulaires de WNT**

La modulation du signal WNT extracellulaire est réalisée *via* des molécules sécrétées telles que NORRIS et R-spondin (RSPO) qui peuvent agir comme agonistes de la voie Wnt. Norris se lie à FZD4 (Xu et al., 2004) alors que RSPO peut se lier à WNT, FZD et LRP6 ((Carmon et al., 2011; Kazanskaya et al., 2004). Leurs mécanismes d'action n'ont pas encore été élucidés mais il existe une forte probabilité que leur liaison au ligand et/ou au récepteur soit à l'origine d'une boucle de régulation positive qui amplifie les signaux WNT et stabilise le système (Kazanskaya et al., 2004).

Les protéines inhibitrices de WNT (les WIF, Wnt Inhibitory Proteins) et les protéines sécrétées apparentées à Frizzled (les sFRP, secreted Frizzled-related proteins) peuvent se lier aux ligands Wnt et agir comme des inhibiteurs de la voie (Hoang et al., 1996; Hsieh et al., 1999). De plus, il a été mis en évidence que l'interaction entre ces inhibiteurs et les membres de la voie Wnt influe sur leur stabilité et leurs schémas de distribution et localisation (Bovolenta et al., 2008).

Les protéines Dickkopf (DKK) (Glinka et al., 1998) qui sont des ligand des LRP, inhibent la voie Wnt *via* compétition avec les ligands de la voie canonique (Mao et al., 2001; Seménov et al., 2001).

Un autre groupe d'inhibiteurs, lié à la famille Wise/SOST, agit en modifiant la conformation du complexe FZD-LRP (Seménov et al., 2005).

Trois grandes voies de signalisation liées à Wnt ont été mises en évidence : la voie canonique, la voie non canonique liée à la polarité cellulaire planaire (Planar Cell Polarity,PCP) et la voie non canonique liée au calcium.

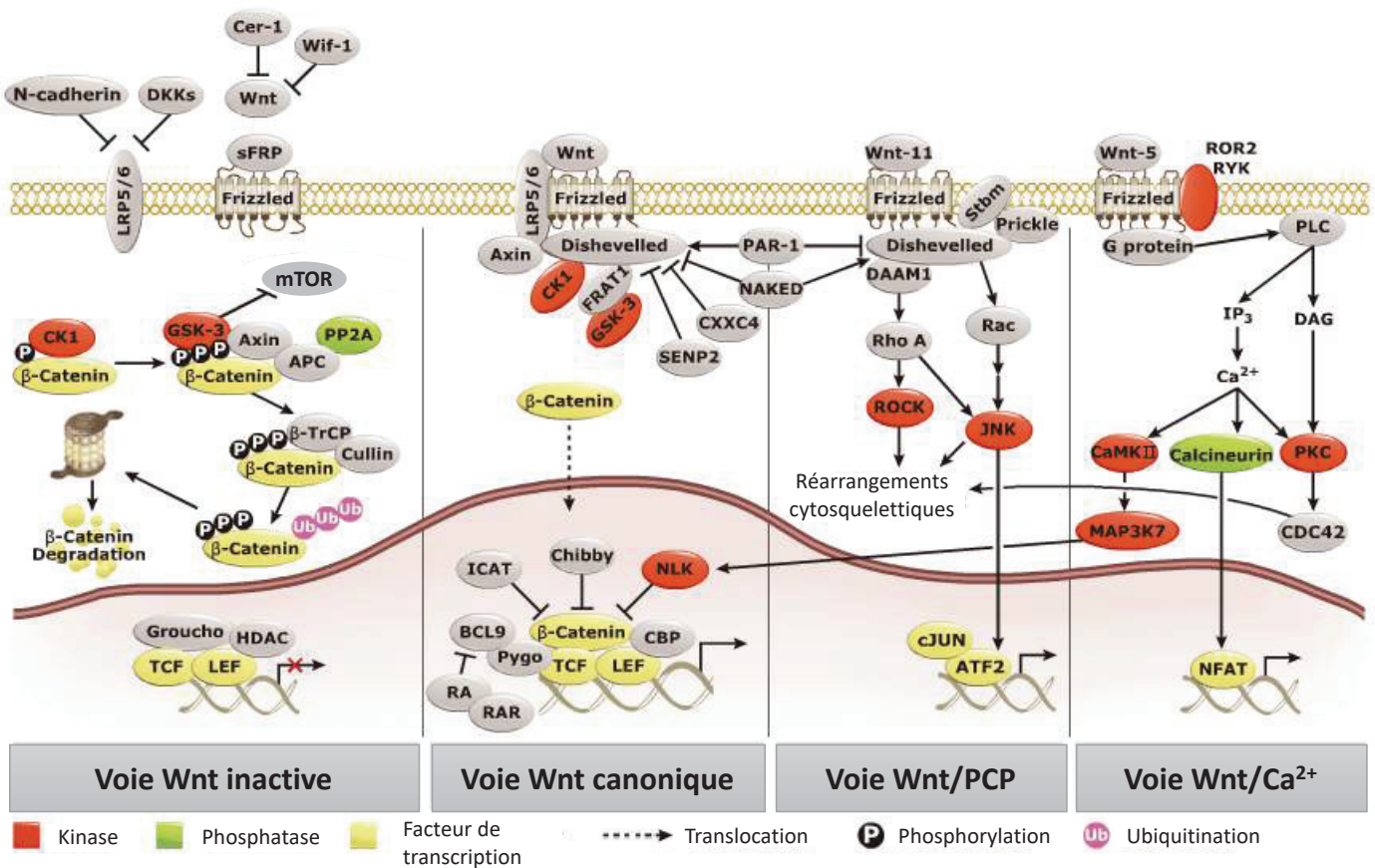
#### **III.B.4.1.4 La voie canonique : voie Wnt/ $\beta$ -caténine**

La voie canonique Wnt est interdépendante de la production et de la dégradation de la  $\beta$ -caténine. L'accumulation de  $\beta$ -caténine active les effecteurs de la voie Wnt alors que son inhibition/dégradation inhibe la partie terminale de la voie (**Figure 18**).

La  $\beta$ -caténine cytoplasmique est en permanence dégradée par un complexe de dégradation formé de l'AXIN, de l'APC (adenomatosis polyposis coli), PP2A (protéine phosphatase 2a), CK1 $\alpha$  (casein kinase 1 $\alpha$ ) et GSK-3 (glycogen synthase kinase 3) (Kimelman and Xu, 2006). La phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par GSK-3 $\beta$  génère des sites reconnaissables par l'ubiquitine ligase E3, ce qui provoque l'ubiquitination puis la dégradation de la  $\beta$ -caténine par le protéasome (Kimelman and Xu, 2006).

L'activation de la voie Wnt par la formation du complexe WNT-FZD-LRP au niveau de la membrane plasmique provoque le recrutement et l'activation de la phosphoprotéine Dishevelled (DSH) (Wong et al., 2003) par un mécanisme encore inconnu, bien que sa phosphorylation directe ou par les kinases PARK1 ou CKII soit envisageable (Chen et al., 2003; Sun et al., 2001; Wong et al., 2003). De manière concomitante à l'activation de DSH, l'AXINE est recrutée à la membrane en se liant à la queue cytoplasmique phosphorylée de LRP, ce qui empêche la formation du complexe de phosphorylation de la  $\beta$ -caténine. Celle-ci s'accumule alors dans le cytoplasme et entre dans le noyau. Une fois dans le noyau, la  $\beta$ -caténine se lie à la queue N-terminale de la protéine TCF/LEF, facilitant le décrochage des co-répresseurs TLE et Groucho (Daniels and Weis, 2005), et activant son activité transcriptionnelle (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996; van de Wetering et al., 1997). Des protéines co-activatrices telles que CBP, BRGK1, Pygo, Hyrax, etc... peuvent alors se

lier à la chromatine et modifier sa structure locale afin de faciliter la transcription des gènes des effecteurs de la voie Wnt (Städeli et al., 2006) (**Figure 18**).



**Figure 18: Les trois voies Wnt**

A gauche, lorsque Wnt n'est pas lié à Frizzled (voie inactive). Les trois schémas de droite représentent les voies Wnt canonique, liée à la polarité cellulaire planaire et au calcium. Adapté de Wnt Pathway, GeneTex.

La grande variété de co-activateurs possibles permet une grande plasticité ainsi qu'une grande diversité des effets de l'activation de cette voie, expliquant en partie l'implication de cette voie dans ces processus aussi diversifiés au cours du développement mais aussi lors du maintien de l'homéostasie. L'implication de la voie Wnt/ β-caténine dans l'EMT n'est plus à démontrer, tant au niveau embryonnaire (Bosada et al., 2016; Howard et al., 2011) que pathologique (Arend et al., 2013; Ghahhari and Babashah, 2015; Zoni et al., 2015), et ce chez de nombreuses espèces.

### **III.B.4.1.5 Première voie Wnt non canonique : voie Wnt/PCP**

Historiquement, les noms des protéines reflètent les effets ayant permis leur identification. Ainsi, Frizzled, Dishevelled, Prickle (crépu, échevelé, épineux) ont été identifiés *via* des défauts d'organisation des poils et soies couvrant la cuticule de la drosophile (Gubb and García-Bellido, 1982; Vinson and Adler, 1987; Vinson et al., 1989). Les phénotypes observés sont dus à un défaut de la polarité cellulaire planaire (PCP), qui permet d'établir la polarité cellulaire et l'organisation des tissus (Strutt, 2003), notamment à travers les mouvements de convergence et d'extension de la gastrulation (Mlodzik, 2002).

L'activation de la voie Wnt/PCP nécessite FZD et DSH (**Figure 18**). Une mutation du domaine DEP de la protéine DSH inhibe la voie Wnt/PCP alors que cette mutation n'a pas d'effet sur la voie *Wnt/β-caténine* (Heisenberg et al., 2000). Ainsi, différents domaines de DSH sont impliqués dans les voies Wnt/PCP et *Wnt/β-caténine*.

Suite à l'activation de FZD et à la liaison de DSH, un complexe transmembranaire multiprotéique est formé à partir des protéines FMI (Flamingo), VANG/STBM (Van Gogh/Strabismus), PK (Prickle) et DGO (Diego) (Strutt, 2003). DSH forme alors un complexe avec DAAM1 permettant l'activation de la protéine G (RHO) *via* un facteur d'échange de guanine. RHO active alors ROCK (Rho associated kinase), un acteur majeur de la régulation du cytosquelette (**Figure 18**) qui peut, entre autres, activer la contraction *via* la phosphorylation indirecte de la chaîne légère de la myosine et permettre le maintien de l'organisation du cytosquelette d'actine (Julian and Olson, 2014; Kim et al., 2015). Il a, entre autre, été mis en évidence que (la surexpression de ROCK entraîne la désorganisation du cytosquelette d'actine à l'origine de la déconnexion synaptique et de l'altération de l'activité neuronale dans les cellules infectées par le prion (Kimelman and Xu, 2006). DSH interagit aussi avec la GTPase RAC1, ce qui a pour effet la mise en place d'une polarité axiale.

### **III.B.4.1.6 Deuxième voie Wnt non canonique : voie Wnt/Ca<sup>2+</sup>**

Des expériences de gain de fonction chez le poisson zèbre ont mis en évidence que l'expression de *wnt5a* et du récepteur *fzd* provoque une augmentation du calcium intracellulaire (Slusarski et al., 1997). Quelques années plus tard, le mécanisme d'action a été élucidé ; ainsi, FZD active DAG (diacylglycerol) et PI3 (Inositol-1,4,5-triphosphate) *via* des

protéines G hétérotrimériques (Li et al., 2009). PI3 va alors se lier à son récepteur au niveau de la membrane du RE (réticulum endoplasmique), provoquant l'ouverture de pores et le relargage de calcium dans le cytoplasme (**Figure 18**) (Li et al., 2009).

Chez les vertébrés, la voie Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  est activée par les mêmes ligands que la voie Wnt/PCP (Strutt, 2003). Cela, ajouté au fait que l'augmentation de DAG corrélée à l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  régule le remodelage du cytosquelette (*via* Cdc42) (Choi and Han, 2002), laisse suggérer que ces deux voies ne sont pas totalement indépendantes et que leurs effets pourraient s'additionner ou se superposer (Strutt, 2003).

Ainsi, les voies Wnt sont diversifiées, tant par leurs mécanismes (signalisation à courte ou longue distance), les structures ciblées (embryogénèse, homéostasie ou maladies) que par leurs effets (organisation des tissus, cytosquelette, calcium...). Ces voies sont extrêmement bien conservées chez les métazoaires, et impliquées dans de nombreux processus cellulaires liés à l'EMT tels que les processus physiologiques normaux, l'embryogenèse ou encore les cancers.

Une autre voie a été démontrée comme nécessaire à l'EMT : la voie Notch. Nous allons d'abord détailler les différents acteurs de la voie Notch avant de nous intéresser aux deux grandes voies possibles, la voie canonique et la voie cytoplasmique.

### **III.B.4.2 Voie Notch**

Contrairement à Wnt, qui agit par l'intermédiaire de gradients de concentration extracellulaire, Notch nécessite un contact direct entre cellules. La voie de signalisation Notch est une cascade de signalisation extrêmement bien conservée chez les métazoaires, impliquée dans de nombreux processus développementaux tels que l'équilibre prolifération/différenciation, la délimitation des bordures des tissus, l'apoptose (Bray, 2006; Fiúza and Arias, 2007) mais aussi dans le maintien de l'homéostasie (Artavanis-Tsakonas and Muskavitch, 2010; Gridley, 1997, 2003) ainsi que dans beaucoup de cancers (Koch and Radtke, 2007; Leong and Karsan, 2006).

La mutation *Notch* a été identifiée chez *Drosophila melanogaster* par Thomas Hunt Morgan (prix Nobel de médecine en 1933 pour son étude du rôle du chromosome dans l'hérédité) au

début du XX siècle. Cette mutation *Notch* (encoche) a été décrite comme provoquant des déchirures à l'extrémité des ailes. La mutation provoque un défaut de formation du tube digestif, la désorganisation du système nerveux ainsi que l'absence de différenciation du mésoderme et est létale au stade embryonnaire chez les femelles homozygotes et chez les mâles (gène situé sur le chromosome X).

### **III.B.4.2.1 Ligands de la voie Notch**

Les ligands de la voie Notch sont principalement des protéines transmembranaires de type I constitués d'un motif DSL en partie N terminale (Delta\Serrate\Lag2), de segments EGF répétés (domaine DOS- Delta/OSM11) et de segments EGF-like. Les domaines DSL et DOS sont tous deux impliqués dans la liaison à Notch. Des études menées sur *C. elegans* mettent en évidence que la protéine OSM-11 peut être remplacée par la protéine DLK1 (une protéine présente chez les mammifères possédant un domaine DOS). Ainsi donc, le motif DOS est extrêmement bien conservé au cours de l'évolution (Komatsu et al., 2008). Il a aussi été mis en évidence que le domaine DSL est impliqué dans l'activation *trans* ainsi que dans la *cis* inhibition (Cordle et al., 2008a).

Ces ligands sont répartis en deux grandes familles, la famille Serrate/Jagged ayant des répétitions EGF interrompues par de courtes séquences de liaison et un domaine riche en cystéines dans la partie extracellulaire, et la famille Delta qui elle, présente des répétitions EGF disposées en continu sans domaine riche en cystéines (Lauret, 2004). L'affinité des ligands pour les différents récepteurs Notch peut être modulée par des glycosylases de la famille Fringe qui, par ajout de sucres sur certaines répétitions EGF de la protéine Notch, diminuent la capacité de liaison de Notch avec les ligands de type Serrate et augmentent la capacité de liaison avec les ligands de type Delta (LeBon et al., 2014).

### **III.B.4.2.2 Récepteurs de la voie Notch**

Chez les Mammifères, la famille des récepteurs transmembranaires de type I NOTCH contient 4 paralogues qui ont des rôles distincts au niveau embryonnaire. Il a notamment été montré chez l'embryon de souris que la double mutation *Notch1/Notch3* présente le même phénotype que la mutation *Notch1* seule alors que la mutation *Notch3* n'est pas phénotypiquement discernable du sauvage. Cela met en évidence que *Notch3* n'est pas indispensable au développement embryonnaire et n'est pas redondant avec *Notch1* (Krebs et al., 2003).



Les protéines Notch sont composées d'un domaine extracellulaire (NECD), un transmembranaire (TMD) et un domaine intracellulaire (NICD).

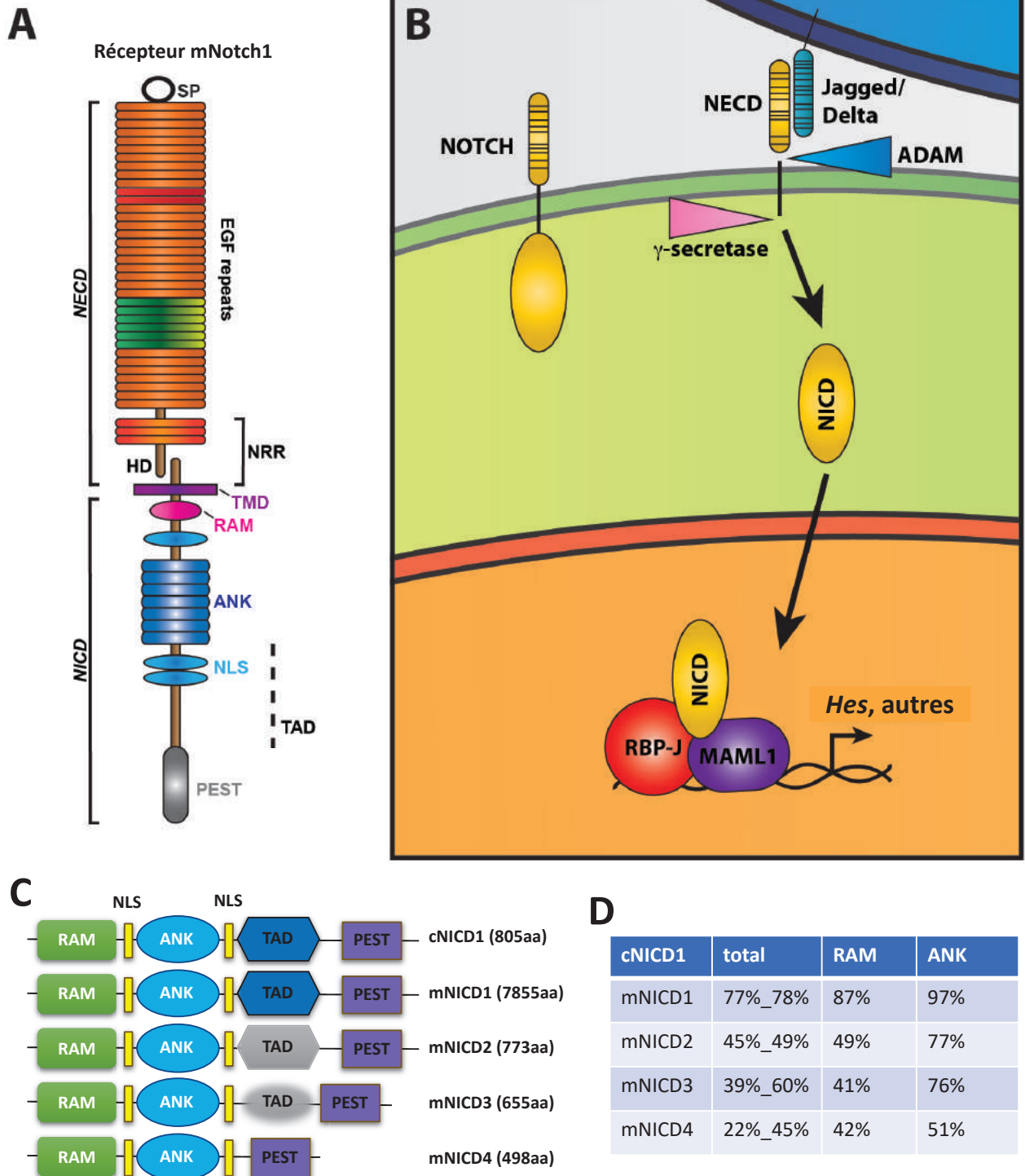
Le domaine extracellulaire se subdivise en répétitions EGF-like permettant la liaison au et en une région de régulation négative (NRR). Le domaine extracellulaire contient des répétitions EGF-like permettant la liaison au ligand. Certaines de ces répétitions peuvent être phosphorylées, ce qui a pour effet une modulation de l'affinité du ligand pour le récepteur. A la suite des répétitions EGF, se situe une région de régulation négative (NRR) composée de 3 répétitions Lin12-Notch riches en cystéine (LNR) et d'un domaine d'hétérodimérisation (HD) (Kopan and Ilagan, 2009). Certaines de ces répétitions peuvent se lier au calcium et influencer sur la structure et l'affinité ligand-récepteur (Cordle et al., 2008b). Il a aussi été mis en évidence que le domaine NRR est nécessaire à la non activation de Notch en absence de son ligand (Gordon et al., 2009). A la suite du domaine extracellulaire décrit ci-dessus, se situe le domaine transmembranaire (TMD), terminé par une région contenant un signal de translocation, riche en lysine et arginine (Kopan and Ilagan, 2009).

Le domaine intracellulaire est constitué d'un domaine RAM (RBPJ associated module), d'un NLS (signal d'adressage au noyau), de sept répétition ankyrine (ANK), de deux autres NLS et d'une séquence PEST, importante pour la stabilité de la molécule (Lubman et al., 2007) (**Figure 19 A**). L'importance relative de ces différents domaines dans la voie de signalisation reste débattue (Jang et al., 2014). L'étude de RAM a mis en évidence une structure tridimensionnelle compacte contenant trois hélices et deux domaines linéaires, cependant seule la séquence et non les structures secondaires influe sur l'activité transcriptionnelle liée à RAM (Sherry et al., 2015).

L'étude *in vivo* et *in vitro* de la régulation des cellules souches neurales montre que les domaines ANK et RAM sont indispensables à la trans-activation des cibles de Notch alors que l'inactivation des domaines NLS n'a aucun effet sur l'activité transcriptionnelle (Jang et al., 2014).

Une fois entré dans le noyau, NICD se lie au facteur de transcription CSL via une interaction bivalente incluant RAM (région de haute affinité) et ANK (région de faible affinité). Cette interaction déplace les co-répresseurs et permet le recrutement de co-activateurs, permettant au CSL de passer à un état actif. Une des fonctions proposées de RAM est de promouvoir l'interaction de ANK avec CSL. Le domaine RAM ne serait pas nécessaire à l'activation de la transcription mais permettrait l'augmentation de l'activité transcriptionnelle. Ainsi, il a été montré qu'une protéine de fusion AKT-CSL est transcriptionnellement active et





**Figure 19: Voie de signalisation Notch classique**

**A.** Représentation schématique des différents domaines du récepteur Notch1 de souris, adapté de (Kopan and Ilagan, 2009; Sieiro Mosti, 2015). **B.** Schématisation de la voie Notch classique, d'après (Sieiro Mosti, 2015). **C.** Comparaison des domaines intracellulaires de Notch1 de poulet et des 4 Notch de souris. **D.** Tableau du pourcentage d'homologie de toute la partie intracellulaire de Notch, du domaine RAM et du domaine ANK des Notch de souris comparé au Notch1 de poulet.

que l'ajout du domaine RAM augmente l'activité transcriptionnelle (Johnson and Barrick, 2012). La mutation ponctuelle F235L -qui empêche la liaison de co-répresseurs au CSL- augmente fortement l'activité transcriptionnelle de la protéine de fusion AKT-CSL par rapport au contexte endogène mais n'est pas influencée par l'ajout ectopique de RAM (Johnson and Barrick, 2012). Ainsi, le rôle du domaine RAM serait de favoriser l'activité transcriptionnelle médiée par le complexe AKT/CSL en déplaçant les co-répresseurs.

La comparaison des domaines NICD chez la souris met en évidence que les domaines RAM et ANK sont très bien conservés, ainsi que le domaine PEST, cependant, le domaine TAD est beaucoup moins bien conservé. En effet, le domaine TAD de mNICD2 est moins actif que celui de mNICD1. Celui de mNICD3, quant à lui, est présent mais ne semble pas avoir de lien avec la trans-activation. Son rôle est encore méconnu. Il ne semble pas y avoir de domaine TAD dans mNOTCH4 (**Figure 19 C**).

Chez le poulet, 3 *Notch* ont été identifiés. Le domaine NICD de *cNotch1* est très homologue à celui de *mNotch1* (**Figure 19 C**). Le calcul du taux d'homologie permet de mettre en évidence une très forte conservation (**Figure 19 D**). Ainsi, les NICD1 de souris et de poulet sont homologues à 77/78% en fonction de la méthode de calcul d'homologie, leurs domaines RAM le sont à 87% et leurs domaines ANK à 97%.

Ainsi donc, la molécule Notch, est très bien conservée, tant au niveau intra qu'interspécifique.

### **III.B.4.2.3 Activation de Notch**

La liaison du ligand à Notch provoque une série d'évènements protéolytiques ayant pour conséquence un double clivage de Notch et l'activation du domaine intracellulaire de Notch *via* sa libération dans le cytoplasme. Le premier clivage est réalisé par la métallo-protéase ADAM, 12 acides aminés avant le TMD (Hartmann et al., 2002; Sotillos et al., 1997) et le second par la  $\gamma$ -secrétase qui va cliver le TMD (Hartmann et al., 2002; Wolfe and Kopan, 2004). Cela a pour effet la libération de NICD dans le cytoplasme (**Figure 19 B**).

### **III.B.4.2.4 Voie Notch classique liée aux CSL**

NICD ainsi libre dans le cytoplasme est rapidement transloqué dans le noyau *via* les NLS qu'il contient. Il se lie alors à des protéines CSL (CBF1/RBPJ/LAG-1) *via* son domaine RAM pour former un complexe trimérique. Le domaine ANK facilite la liaison du coactivateur Mastermind/ LAG-3B (MAML) (Lubman et al., 2004) (**Figure 19 B**). Ce complexe va pouvoir activer la transcription de nombreux gènes. Parmi ces gènes, on peut citer *p21*, *Myc*, *Hes*.

Les protéines HES (hairy and enhancer of split) sont des répresseurs transcriptionnels intimement liés à l'activité de NICD (Jarriault et al., 1995). En effet, l'expression des gènes *Hes* est cyclique : la liaison de NICD/CSL à l'ADN provoque le détachement de répresseurs tels que HES et permet la transcription de gènes, dont *Hes*. Les néo-protéines HES vont alors pouvoir se fixer à l'ADN et provoquer l'inhibition de la transcription (Kobayashi et al., 2009). Ces oscillations dynamiques sont indispensables au bon déroulement de l'embryogenèse, comme par exemple pour la formation du tube neural ou encore pour l'horloge moléculaire permettant la segmentation du mésoderme paraxial en somites (Pourquié, 2011). Cette voie canonique est impliquée dans de nombreuses EMT, embryonnaires (Chen et al., 2014; Garside et al., 2013; MacGrogan et al., 2011; Wang et al., 2010) ou pathologiques (Espinoza and Miele, 2013; Ishida et al., 2013; Li et al., 2013; Shao et al., 2015; Yuan et al., 2014; Zhao et al., 2015)

#### **III.B.4.2.5 Voies Notch non classiques**

Les premières évidences d'une voie Notch non canonique proviennent d'études *in vitro* sur la différenciation de myoblastes en cellules musculaires. Il a été mis en évidence que la surexpression de Notch1 inhibe la différenciation des myoblastes de manière indépendante de la liaison de Notch au CSL et sans lien avec les gènes cibles de NICD (Bush et al., 2001; Nofziger et al., 1999; Shawber et al., 1996). Des études menées *in vivo* chez *Drosophila melanogaster* ont mis en évidence que Notch agissait sur la différenciation des cellules mésodermique *via* la voie canonique mais aussi *via* une voie indépendante des ligands et effecteurs canoniques de Notch (Rusconi and Corbin, 1998). Cette voie a été généralisée à de nombreux processus et de nombreuses espèces.

De plus, une protéine de fusion composée de domaines NES (nuclear export signal) liés à une molécule NICD présentant des NLS mutés a été testée. Elle récapitule les effets de NICD endogène, tels que promotion de l'angiogenèse, ou des caractères de cellule souche neural (Jang et al., 2014). Ces expériences soulignent l'importance de la voie non canonique de Notch, lié à une activité cytoplasmique, dans la régulation des cellules souches neurales.

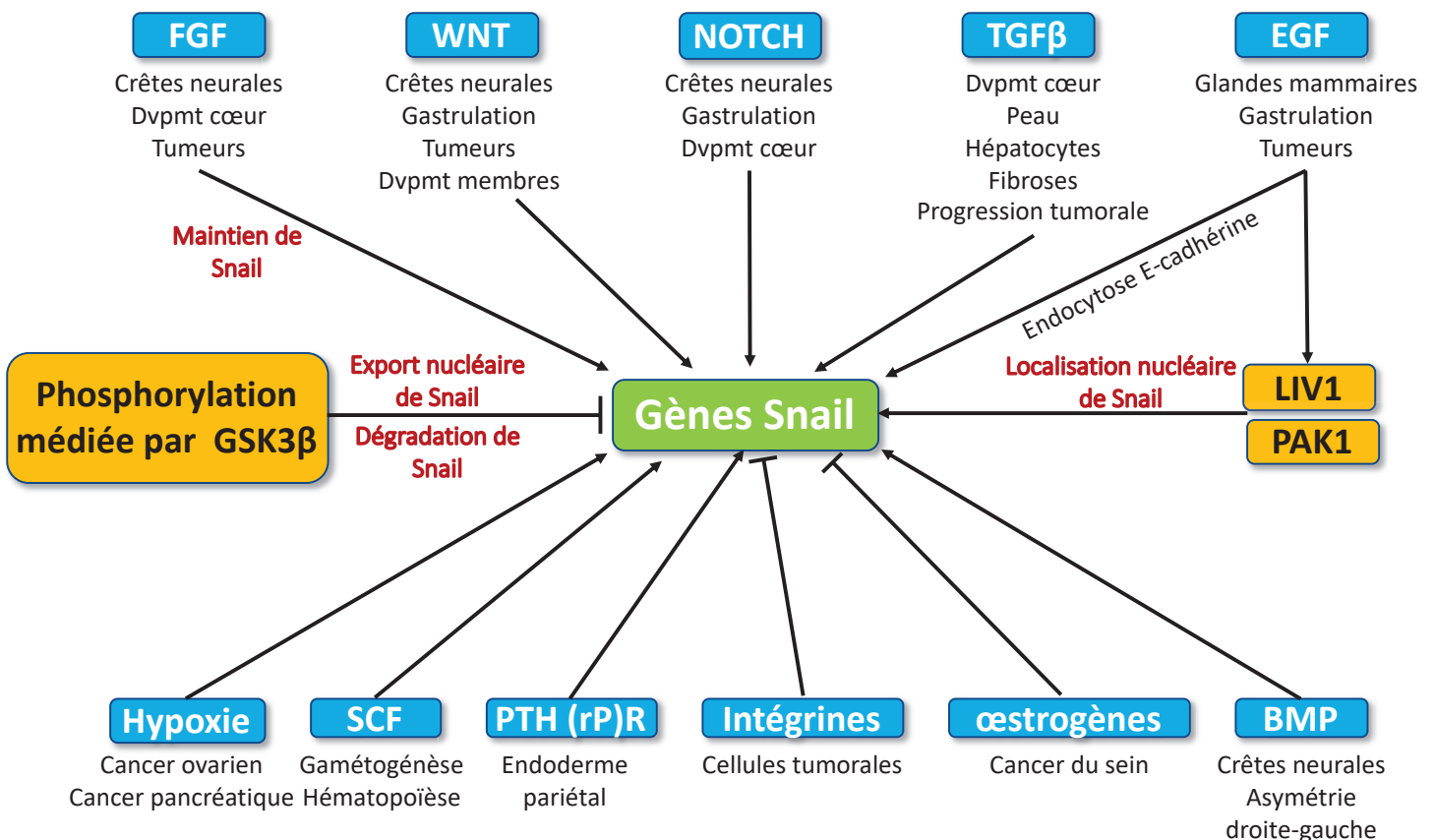
De nombreux mécanismes sont regroupés sous le nom de « voie non canonique » tels que l'absence de ligand ou cibles canoniques, ou encore une activité cytoplasmique (Andersen et

al., 2012; Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Son importance au niveau de différents types de cancers (tout liés aux EMT) a été démontré (Ayaz and Osborne, 2014; Jin et al., 2013) Ainsi, la voie Notch se caractérise généralement par sa voie canonique : activation extra-cellulaire, clivage et translocation du domaine intra-cellulaire dans le noyau afin d'activer la transcription des gènes cibles. Récemment, de nombreuses voies moléculaires non canoniques ont été mises en évidence. Ces voies, canonique et non canoniques, sont impliquées dans la régulation de différentes EMT. Il a, entre autres, été mis en évidence que NOTCH1 induit la prolifération et l'invasion cellulaire des carcinomes œsophagiens et mammaires via SNAIL (Li et al., 2018; Wang et al., 2014). Snail est un gène clef de l'EMT.

### **III.B.4.3 Les facteurs de transcription *Snail***

Chez les Vertébrés, il existe deux gènes *Snail* : *Snail1* and *Snail2* (appelés SNAI1 et SNAI2 chez l'humain). Ce sont des facteurs de transcription contenant des domaines « zinc-finger » dont les fonctions les plus connues sont l'induction de l'EMT (**Figure 20**), notamment dans de nombreux contextes embryonnaires (Nieto, 2002) *via* de nombreuses voies de signalisation différentes. La première mise en évidence expérimentale de l'implication de la famille Snail dans l'induction de l'EMT a été que des embryons de poulet *Snail2* déficients n'étaient pas capable de réaliser une gastrulation correcte, les cellules mésodermales conservant une forte concentration de E-cadhérine (Nieto et al., 1994). Ils sont induits *via* les membres de la famille TGF $\beta$  et les facteurs FGF sont généralement nécessaires au maintien de leur expression ainsi qu'au bon déroulement de la gastrulation (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Ciruna and Rossant, 2001). Cependant, il existe une controverse entre le fait que la famille Snail soit plus un facteur de survie et d'induction de mouvement cellulaire qu'un inducteur d'EMT et donc de destin cellulaire (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005). En effet, les protéines Snail ne sont pas indispensables à la spécification mésodermique à proprement parler : dans des embryons de souris *Snail* mutant, certaines cellules « mésenchymateuses » présentent des marqueurs mésenchymateux mais ces cellules ne migrent pas (Carver et al., 2001). Cependant, elles sont nécessaires aux changements morphologiques, d'adhésion et de mouvements. Cette controverse a tendance à se résoudre du côté non lié à l'EMT du fait que l'hypothèse EMT est cohérente avec l'idée que destin cellulaire et mouvements morphogénétiques sont des événements simultanés qui sont indépendants (Nieto et al., 2016; Sieiro et al., 2016). Cependant, quelle que soit l'hypothèse retenue, la famille Snail est indispensable à l'étape « EMT-changements morphologiques ».

L'étude des cellules tumorales a permis de mettre en évidence l'implication d'une autre molécule clef liée à l'EMT : AKT.



**Figure 20: La famille Snail est un point central de l'EMT**

Exemple de la diversité des voies de signalisation impliquées dans l'induction de l'EMT, toutes via l'intermédiaire de Snail. Les signaux extracellulaires sont indiqués dans les cadres bleus et les processus dans lesquels ces voies sont impliquées sont indiquées en dessous. En plus de la régulation transcriptionnelle, l'activité de Snail est régulée via sa localisation subcellulaire et sa dégradation par au moins deux kinases, GSK3 $\beta$  et PAK1 et par un transporteur à doigts de zinc LIV1. EGF, epidermal growth factor; FGF, fibroblast growth factor; BMP, bone morphogenetic protein; PAK1; p21-activated kinase; TGF $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ; PTH(rP)R, parathyroid hormone related peptide receptor; SCF, stem cell factor. Adapté de (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005).

### III.B.4.4 La sérine-thréonine kinase AKT

AKT est un membre de la famille des protéines kinases AGC. Il existe 3 isoformes de AKT- 1, 2 et 3- homologues à plus de 80% (Hemmings and Restuccia, 2015; Manning and Cantley, 2007; Toker and Marmiroli, 2014). Ces trois molécules partagent une architecture commune, composée d'un domaine catalytique entouré d'un domaine Pleckstrin Homology (PH) en N-ter et d'un domaine régulateur en C-ter (Calleja et al., 2009; Mahadevan et al., 2008).

Le domaine PH de AKT peut se lier à différents PtdIns (phosphatidyl-inositol) (Hanada et al., 2004). Les interactions intramoléculaires du domaine kinase PH permettent de maintenir AKT dans un état inactif. Dans 8% des cas de cancers du sein, une mutation de ce domaine est observée (Carpten et al., 2007). Une courte hélice alpha située entre le domaine PH et le domaine catalytique permettrait la sélectivité des différents isoformes. De manière concomitante à sa traduction, AKT est phosphorylée par le motif Turn de la sérine-thréonine kinase TORC2 sur son résidu Thr450. Cette phosphorylation stabilise AKT et serait la première étape de l'activation de AKT (Chan and Tsichlis, 2001).

Le domaine régulateur est constitué d'environ 40 acides aminés dont un motif hydrophobique F-P-Q-F-S-Y (F-X-XF/Y-S/T-YF pour la famille de kinases AGC) (Peterson and Schreiber, 1999). La phosphorylation de la serine ou de la thréonine de ce motif hydrophobique est nécessaire à l'activation de AKT (une mutation ponctuelle de d'un de ces résidus supprime entièrement l'activité enzymatique (Andjelković et al., 1997).

Les IGF régulent de nombreux aspects de la survie, de la croissance, de la différenciation ainsi que du métabolisme dans de nombreux contextes. La liaison des IGF ou de l'insuline aux récepteurs IGF (IGF-R) active ces derniers. Cela a pour conséquence, via phosphorylation des IRS (insulin receptor substrate) (Dupont and LeRoith, 2001), le recrutement des PI3K qui vont phosphoryler des phospholipides membranaires. Ils génèrent des polyphosphoinositides tels que le phosphatidyl-inositol (3,4,5) triphosphate (PI(3,4,5)P3) qui se lient au domaine PH de AKT. Cette liaison permet la relocalisation de AKT du cytoplasme à la membrane plasmique mais aussi un changement conformationnel qui libère le site catalytique. Cette relocalisation permet la phosphorylation de deux sites régulateurs : Thr308 dans le domaine catalytique et Ser473 dans le motif hydrophobique (Andjelković et al., 1997). La phosphorylation de la Thr308 est nécessaire à l'activation de Akt de PI3K dépendante et est médiée par PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) (Alessi et al., 1997). Le mécanisme de phosphorylation de Ser473 est beaucoup plus débattu, mais il existe un consensus considérant mTORC2 (Rictor-mTOR complex) comme la kinase responsable de

cette phosphorylation dans la plupart des cas (réponse à des facteurs de croissance) (Sarbasov et al., 2005).

La phosphorylation de la Ser1235 de Rictor (rapamycin insensitive-companion of mTOR) *via* GSK3 $\beta$  inhibe AKT en diminuant l'affinité pour le substrat (Chen et al., 2011). De plus, AKT inhibe GSK3 $\beta$  en le phosphorylant sur Ser9. La phosphorylation de Thr 308 est nécessaire et suffisante à l'inhibition de GSK3 $\beta$  (Jacinto et al., 2006). cette phosphorylation inhibitrice de GSK3 $\beta$  par AKT a été démontrée dans de nombreux contextes (Feng et al., 2015; Gao et al., 2015; Kim et al., 2013; Ma et al., 2015; Reis et al., 2015; Wu et al., 2015).

Il a été mis en évidence que AKT peut être phosphorylée sur le site Ser473 par DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) suite à un dommage de l'ADN (Bozulic et al., 2008; Feng et al., 2004).

Plus de 200 substrats de AKT ont été identifiés à ce jour (Manning and Cantley, 2002; Moritz et al., 2010) et sont impliqués dans de nombreux processus tels que synthèse protéique (*Pdcd4*, *Tsc1*), survie (*Xiap*, *FoxO1*, *Bim/Bax/Bad*), prolifération (*p21*, *Cycline D1*), migration (*cadhérines*) ou encore métabolisme (*glycogène synthétase*, *Pfkfb2*). Il a notamment été mis en évidence que Akt1 est essentiel à la transition G1/S et active la prolifération dans le cancer du sein (Héron-Milhavet et al., 2006; Vandromme et al., 2001) mais inhibe la migration. Akt2 à l'effet inverse : il inhibe l'induction tumorale mais promeut la dissémination métastatique (Dillon et al., 2009; Hutchinson et al., 2004; Maroulakou et al., 2007). L'importance de AKT dans l'EMT tumorale pourrait être médiée par la PALLADINE (inhibition de la migration (Chin and Toker, 2010)) ainsi que par la phosphorylation des sous-unités  $\beta$  de l'intégrine (activité pro-migratoire (Arboleda et al., 2003)).

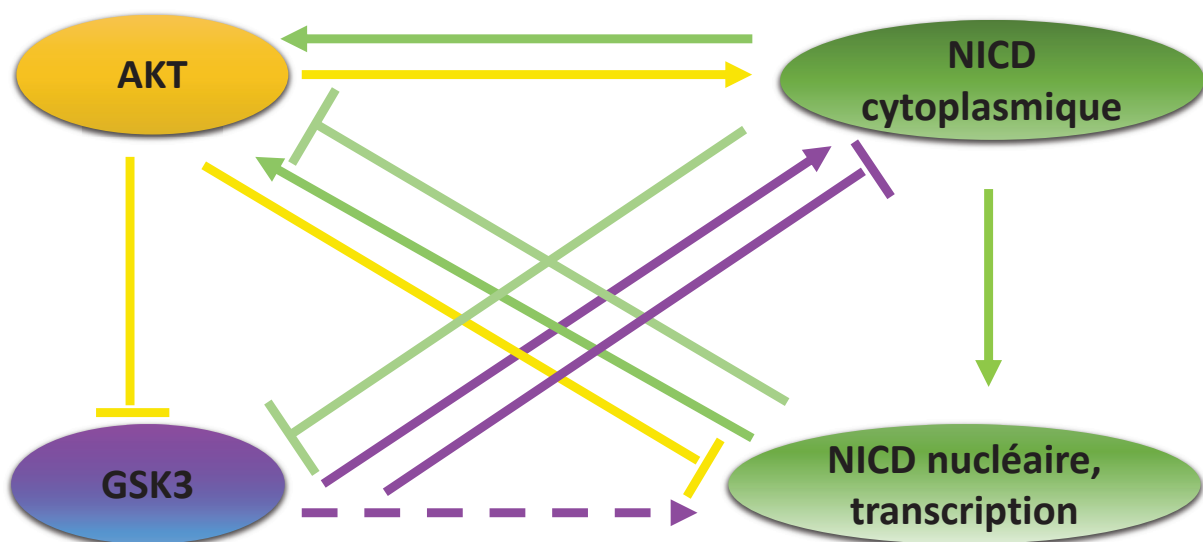
De plus, *Akt* régule la myogenèse. Alors que le niveau d'expression de AKT1 est constant durant le processus de différenciation, celui de AKT2 est croissant (Gonzalez et al., 2004; Kaneko et al., 2002; Rotwein and Wilson, 2009; Vandromme et al., 2001). De manière similaire à la tumogénèse, *Akt1* est indispensable à la prolifération et *Akt2* à la différenciation.

Ainsi, les kinases *Akt* sont nécessaires à la différenciation et à la migration cellulaires (et à l'EMT) dans de nombreux contextes, incluant les tumeurs ainsi que la différenciation musculaire.



*Akt* interagit avec de nombreuses autres voies de signalisation de manière très complexe. La **Figure 21** résume quelques interactions entre NICD, AKT et GSK3 $\beta$ . Pour n'en citer que quelques-unes :

- HES1 (voie Notch canonique) active la phosphorylation activatrice de AKT, qui inhibe alors GSK3 $\beta$  via phosphorylation dans le cancer colo-rectal et nasopharyngé (Gao et al., 2015; Wang et al., 2015) mais ne modifie pas la quantité de AKT présente dans les cellules.
- NOTCH induit une EndMT lors de la formation des valves cardiaques via activation de *Snail1/2*. Cela est corrélé à une diminution de l'activité de AKT1 mais aussi à une diminution de l'activité de GSK3 $\beta$ . Cela s'explique par le fait que Notch induit un switch entre Akt1 et Akt2 (AKT2 phosphorylé entre dans le noyau et y inhibe GSK3 $\beta$ ) (Frías et al., 2016).
- AKT inhibe l'activité transcriptionnelle de Notch via phosphorylation (Song et al., 2008).
- l'activité transcriptionnelle de NOTCH inhibe la phosphorylation activatrice de AKT (Sangphech et al., 2014).
- l'inhibition de AKT dans une lignée T-ALL induit une diminution de NOTCH1. Notch régule aussi la voie Akt. Il y aurait une boucle de régulation réciproque (Calzavara et al., 2008).
- AKT inhibe GSK3 $\beta$  via phosphorylation (Feng et al., 2015; Ma et al., 2015).
- GSK3 $\beta$  stabilise NICD dans le cytoplasme via phosphorylation, et favorise sa translocation nucléaire, activant l'activité transcriptionnelle de NICD (Han et al., 2012)
- Activation de NICD dépendante de l'inhibition de GSK3 $\beta$  dans des cellules T humaines (Verma et al., 2016).



**Figure 21: Exemple des interactions possibles entre AKT, GSK3 $\beta$  et NICD**  
 Les détails de ces interactions sont explicités en page précédente.



De nombreuses autres voies de signalisation telles que les voies FGF, TGF $\beta$ , BMP et EGF sont aussi impliquées dans la régulation de l'EMT mais ne seront pas détaillées ici.

Nous avons donc vu dans cette deuxième partie que les EMT sont des mécanismes indispensables au bon déroulement de l'embryogenèse et qu'elles sont également impliquées dans de nombreux contextes cellulaires. Les voies moléculaires des EMT sont extrêmement complexes et diversifiées mais sont toujours intimement liées à des changements morphologiques et modifications de propriétés migratoires. Nous allons maintenant revenir plus en détail sur deux structures subissant une EMT et une spécification simultanée : les cellules du toit du tube neural qui donnent naissance aux crêtes neurales et les cellules de la lèvre dorso-médiale du somite qui donnent naissance aux progéniteurs musculaires.

### **III.C Deux exemples d'EMT embryonnaires caractéristiques**

## **III.C.1 Les crêtes neurales, de la mise en place à la migration dans différents tissus : un modèle de différenciation classique**

### **III.C.1.1 Historique**

En 1868, Wilhelm His a identifié une bande de cellules situées entre le tube neural et l'ectoderme (futur épiderme) à l'origine des ganglions craniaux et spinaux chez l'embryon de poulet. En 1874, cette région a été identifiée comme pouvant être à l'origine de la formation d'organes. Le terme crêtes neurales serait apparu pour la première fois dans un papier sur le développement des organes olfactifs en 1879 rédigé par Arthur Milnes Marshall.

Une décennie plus tard, Julia Platt a montré que les cartilages cranio-faciaux, les acrs pharyngés et les odontoblastes (cellules à l'origine de la dentine) provenaient de l'ectoderme adjacent au tube neural chez un urodèle de la famille des Proteidae, le Mudpuppy (*Necturus maculosus*). Cette théorie n'a pas été acceptée par la communauté scientifique du fait que les tissus squelettiques devaient dériver du mésoderme, et non de l'ectoderme selon la théorie des trois feuilletts embryonnaires.

C'est seulement 40 ans plus tard que de nouvelles études ont permis de montrer que les crêtes neurales sont à l'origine du mésenchyme, des cartilages, du tissu conjonctif (Stone, 1920-1930) et des ostéoblastes (DeBEER, 1947).

Une étape importante de la compréhension des mécanismes liés aux crêtes neurales a été « The Neural Crest : Its properties and derivatives in the light of experimental research » (Archives of Neurology, 1951), publié par Sven Hörstadius en 1951, soit 82 ans après la découverte des crêtes neurales. Cet ouvrage a permis de confirmer les données obtenues par Julia Platt mais aussi de mettre en évidence l'induction complexe de ces cellules : 'This is the first time that the phenomenon of complex and additive inductive action by different structures has been demonstrated under experimental conditions' (Nature 1950, 169, p. 821).

Un glissement du modèle amphibien vers le modèle aviaire a lieu dans les années 60. La migration des crêtes neurales de la tête et du tronc (Jim Weston puis Mac Johnston) puis les crêtes neurales squeletogéniques (Pierre Chibon) sont étudiés. En 1969, Nicole Le Douarin et son équipe mettent en place une technique de visualisation des crêtes novatrice : des greffes

caille poulet permettent de suivre la migration des crêtes en utilisant des marqueurs spécifiques à l'une des deux espèces.

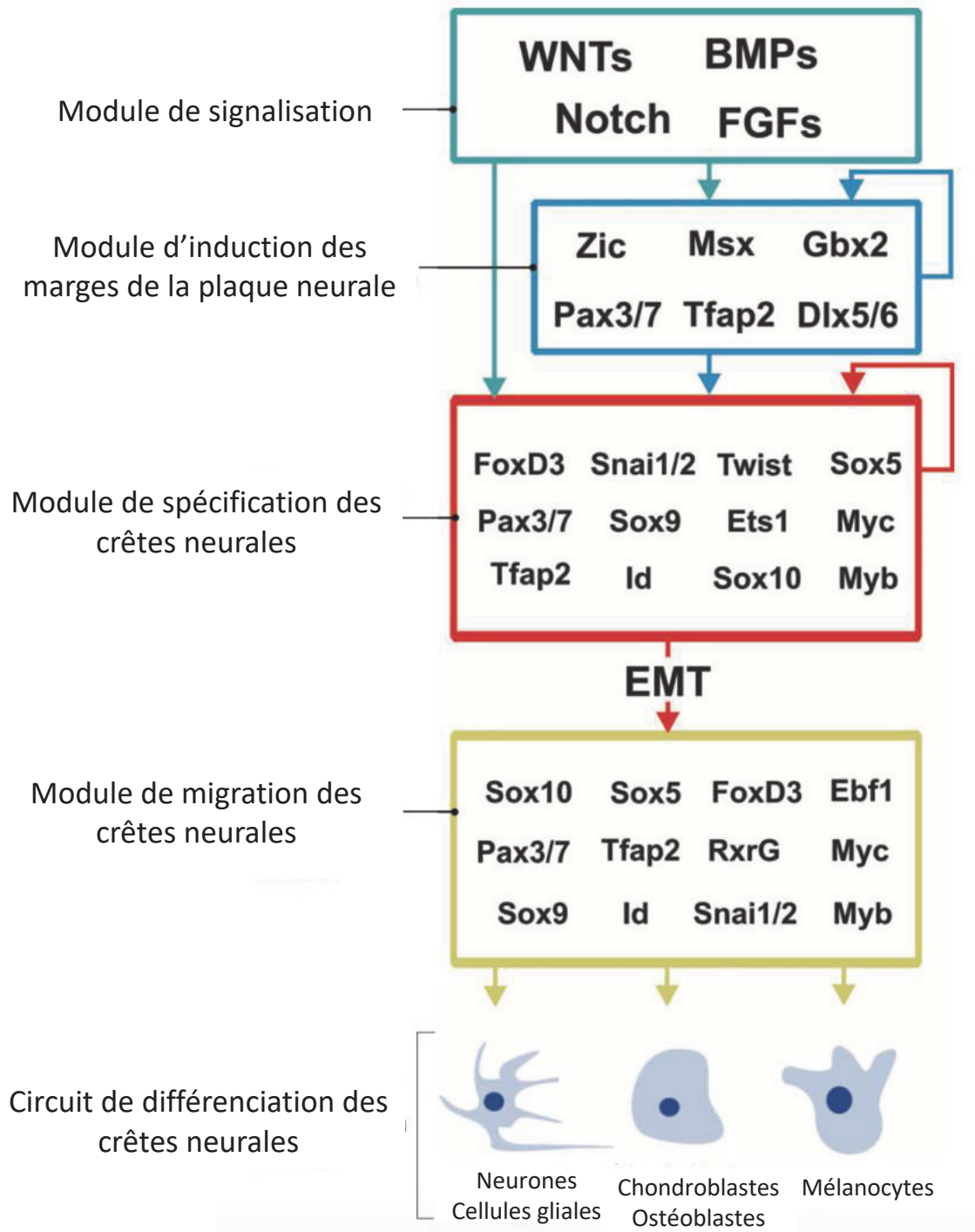
Dans les années 1970, des cartes précises du devenir des cellules des crêtes neurales sont établies. Le rôle clef de l'environnement cellulaire sur la migration, la différenciation et l'organogenèse est reconnu. Des maladies liées à un ou plusieurs types de cellules dérivées des crêtes neurales sont caractérisées et regroupées sous le nom de neurocristopathies.

Les années 1980 à 2000 voient la découverte puis la compréhension des gènes Hox, et avec eux la compréhension des modifications dues aux gènes homéotiques. De grandes avancées sur la compréhension des bases moléculaires de migration, différenciation et apoptoses ont été réalisées durant ces dernières décennies.

Ces cellules sont d'excellents modèles d'études car elles présentent des ressemblances avec des cellules souches, telles les capacités d'auto renouvellement ou de multipotence.

### **III.C.1.2 Induction des crêtes neurales**

Spécifiques des vertébrés, les crêtes neurales sont mises en place de manière précoce lors du développement (Baker and Bronner-Fraser, 1997; Basch et al., 2006). Elles proviennent du repliement des bordures du tube neural au niveau des plaques neurales lors de la fermeture du tube neural. L'induction des crêtes neurales est due à des interactions entre la plaque neurale, l'ectoderme adjacent et le mésoderme paraxial, lequel sécrète un grand nombre de ligands de la famille Wnt ((Baker and Bronner-Fraser, 1997; Gammill and Bronner-Fraser, 2003; García-Castro et al., 2002; Monsoro-Burq et al., 2003). D'autres voies telles que BMP, Notch et FGF sont impliquées dans cette spécification (Streit et al., 2000) (**Figure 22**). BMP et Wnt proviennent des régions latérales de l'embryon et des inhibiteurs de ces voies sont sécrétés au niveau médial de l'embryon. L'équilibre entre activation et inhibition de ces voies crée un gradient médiolatéral, et les futures cellules du bord de la plaque neurale proviennent d'une région à concentration moyenne de BMP et Wnt (Groves and LaBonne, 2014). La voie Notch est doublement nécessaire à cette spécification: Delta exprimé par les cellules épidermiques est nécessaire à l'activation/maintien de BMP4 au niveau du futur tube neural alors que l'activation de Notch dans le tissu épidermique inhibe la spécification des crêtes neurales dans ce tissu (Endo et al., 2002).



**Figure 22 : Voies moléculaires de l'induction des crêtes neurales à leur différenciation.**

Adapté de (Simoes-Costa and Bronner, 2015).

L'importance de la voie FGF a été mise en évidence chez l'embryon d'amphibien : un dominant négatif FGFR1 bloque l'induction des crêtes neurales ; de plus FGF8, exprimé au niveau du mésoderme paraxial est suffisant pour induire certains marqueurs des crêtes neurales, tels que *FoxD3*, *Sox9* et *Zic5* (Monsoro-Burq et al., 2003). De manière similaire,

l'importance de la voie FGF au niveau de l'ectoderme non neural pour l'induction des crêtes neurales a été mise en évidence chez l'embryon de poulet (Yardley and García-Castro, 2012).

Ces interactions et gradients ont pour effet l'induction des crêtes neurales au niveau des marges de la plaque neurale puis l'expression de plusieurs facteurs de transcription tels que FoxD3 (Kos et al., 2001), Slug (Sasai et al., 2001), Sox (Monsoro-Burq et al., 2003), indispensables à la spécification des crêtes neurales. Des analyses génomiques (Gammill and Bronner-Fraser, 2002) ont mis en évidence l'activation d'au moins 83 gènes dans les crêtes neurales nouvellement induites. La plupart de ces gènes sont impliqués dans l'acquisition de propriétés migratoires.

### **III.C.1.3 Une EMT indispensable aux crêtes neurales**

Suite à cette spécification des crêtes neurales, les cellules vont subir une EMT et acquérir des propriétés migratoires (**Figure 22**).

Alors que la voie Wnt canonique est importante pour l'induction, la stabilisation et la délamination des précurseurs des crêtes neurales, la voie Wnt non canonique est nécessaire à la migration : des expériences de time lapse ont mis en évidence que les voies Wnt/PCP ou Wnt/Ca<sup>2+</sup> régissent la mise en place de lamellipodes et filopodes nécessaire à la délamination/migration orientée des crêtes neurales (Carmona-Fontaine et al., 2008; De Calisto et al., 2005).

De plus, la délamination implique la régulation négative de la N-cadhérine et de la cadhérine-6 ainsi que l'activation des cadhérines de type II, telles que les cadhérines 7 et 11 (Nakagawa and Takeichi, 1995; Vallin et al., 1998). Chez l'embryon de poulet, la délamination implique le clivage de la N-cadhérine par la protéase ADAM10 puis par les  $\gamma$ -sécrétase. La partie intracellulaire de la cadhérine transloque alors dans le noyau avec la  $\beta$ -catenin et active la cycline D1, ce qui permet la sortie des cellules de la phase G1. Ce changement de phase est nécessaire à la migration des crêtes neurales (Shoval et al., 2007).

Un autre facteur influant sur le cycle cellulaire est Snail : en réprimant la *cycline D* il empêche l'entrée en phase S (Vega et al., 2004), ce qui permet la synchronisation des cellules prémigratoires. Cela a pour effet une entrée simultanée des cellules en phase S *via* le clivage de la N-cadhérine. De plus, chez l'embryon de poulet, il a été mis en évidence que l'inhibition de la cadhérine 6B provoque la migration de cellules de crêtes neurales immatures, alors que sa surexpression provoque un défaut de migration (Jordan et al., 2011). Cette protéine est

exprimée lors de l'induction des crêtes neurales mais est ensuite réprimée par le facteur de transcription *Snail2* (exprimé dans les cellules prémigratoires et néomigrantes) (Coles et al., 2007; Taneyhill et al., 2007).

Les cadhérines ne sont pas les seules molécules impliquées dans les EMT de la gastrulation et des crêtes neurales : les petites GTPases sont aussi nécessaires à ces deux EMT. Chez l'embryon de xénope, RhoV régule négativement l'expression de *Sox9*, *Snail2* et *Twist* (Guémar et al., 2007), Rac1 induit l'expression de *Snail2* (Broders-Bondon et al., 2016), et active donc la délamination alors que RhoA inhibe la délamination (Broders-Bondon et al., 2016). Il a également été mis en évidence l'importance de RhoB chez l'embryon de poulet, Rap, RhoA et Rac1 chez le poisson zèbre (del Barrio and Nieto, 2002; Perez-Alcala et al., 2004; Smolen et al., 2007).

Le facteur de transcription Sox10, impliqué dans la régulation du développement embryonnaire ainsi que dans la différenciation cellulaire, est incontournable dans l'établissement du phénotype des crêtes neurales. En effet, la surexpression de SOX10 combinée à des facteurs extracellulaires de la voie Wnt permet de reprogrammer des fibroblastes humains en crêtes neurales migrantes (Kim et al., 2006). Cette molécule, impliquée dans les EMT embryonnaires mais aussi métastatiques (migration, prolifération et survie (Graf et al., 2014)) est utilisée comme marqueur. Chez la souris, elle permet de faire du lignage cellulaire (Simon et al., 2012). Elle permet aussi l'identification de cellules métastatiques (Miettinen et al., 2015; Tacha et al., 2015; Willis et al., 2015).

Ainsi, des voies de signalisation analogues permettent l'EMT lors de la gastrulation, de la mise en place des crêtes neurales (Thiery et al., 2009) ainsi que dans les cellules métastatiques. Bien que les mécanismes d'induction de l'EMT au niveau des crêtes neurales ne soient que partiellement conservés entre les espèces, un schéma générique a pu être établi (Simoës-Costa and Bronner, 2015) (Figure 22). La présence de nombreuses boucles de régulation au cours de l'EMT des crêtes neurales explique en grande partie comment l'absence d'un acteur « essentiel » peut n'avoir que des effets limités, et donc comment ce système est si robuste. Pour ne citer qu'un exemple, des embryons de souris *Snail1/Snail2* mutants ne peuvent achever leur gastrulation (Nieto et al., 1994), cependant ils présentent des crêtes neurales (avec des défauts craniaux-faciaux) (Murray and Gridley, 2006). Des régulations épigénétiques ont lieu lors de la spécification et de la migration des crêtes neurales (Hu et al., 2014).



Ainsi donc, l'EMT des crêtes neurales est largement documentée et représente une EMT classique, présentant de nombreuses similarités dans les voies moléculaires avec d'autres EMT telles que celles de certains cancers et de la gastrulation. Nous allons maintenant détailler une EMT particulière qui concerne les cellules de la lèvre dorso-médiale du somite et est étudié depuis plusieurs années au sein de notre laboratoire.

### **III.C.2 Les somites, de la mise en place à la formation du muscle : une EMT particulière**

La formation du dermomyotome au sein du somite est caractérisé, chez l'embryon de souris ainsi que chez l'embryon de poulet, par l'expression de deux membres de la famille PAX (paired homeodomain), *Pax3* et *Pax7* (Goulding et al., 1991; Jostes et al., 1990; Tremblay et al., 1998). Ces deux gènes sont aussi exprimés dans le tube neural dorsal ainsi que dans les crêtes neurales et le cerveau (Dahl et al., 1997; Kalcheim and Burstyn-Cohen, 2005). L'expression de *Pax3* et *Pax7* dans le dermomyotome (partie dorsale du somite néoformé) est simultanée chez le poulet et régulée par des signaux provenant du tubes neural (WNT1, WNT3a et WNT4) ainsi que de l'ectoderme sus-jacent (WNT6) (Bryson-Richardson and Currie, 2008; Fan et al., 1997; Linker, 2005; Otto et al., 2006). Comme détaillé en III.A.4.3, le dermomyotome est composé de quatre bordures DML, VLL, AL et PL et du dermomyotome central. Il a longtemps été admis que les muscles du tronc provenaient exclusivement de la DML et de la VLL (Bardeen, 1900; Boyd, 1960; Hamilton, 1952; Remak, 1855), cependant, des études récentes ont mis en évidence que les 5 régions sont impliquées (Gros et al., 2004; Scaal and Christ, 2004). *Pax3* et *Pax7* sont tous deux nécessaires à une myogenèse correcte, bien qu'ils soient partiellement redondants (Relaix et al., 2004; Seale et al., 2000; Tremblay et al., 1998).

L'équilibre entre prolifération (von Scheven et al., 2006) et différenciation (Buckingham, 2006; Hammond et al., 2007) permet le maintien d'un groupe de cellules progénitrices tout en permettant l'induction de la myogénèse.

Cet équilibre fragile est en partie contrôlé par la voie FGF (Fibroblast Growth Factor) : Sprouty1, un régulateur négatif de cette voie, stimule l'auto-renouvellement de la population progénitrice (qui est Pax3/Pax7 positive) (Lagha et al., 2008), alors que le récepteur *FGFR4* (FGF receptor 4) promeut la différenciation (Marcelle et al. 1995). Les voies de l'IGF (Insulin Growth Factor) et TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) sont aussi impliquées dans cet équilibre (Coleman et al., 1995; Grobet et al., 1997; McPherron and Lee, 1997; Mosher et al., 2007; Schuelke et al., 2004). La *myostatine*, un facteur sécrété de la voie TGF $\beta$  contrôle la différenciation ; ainsi les organismes mutants pour la *myostatine* présentent une croissance musculaire incontrôlée et donc une musculature très développée. Ainsi, la *myostatine* agit comme un régulateur de l'équilibre prolifération/différenciation. Sa surexpression provoque une déplétion du groupe de cellules souches et ainsi une musculature atrophiée alors qu'à l'inverse, son inhibition provoque une expansion du groupe de cellules progénitrices, et ainsi une musculature surdéveloppée (Coleman et al., 1995; Manceau et al., 2008).

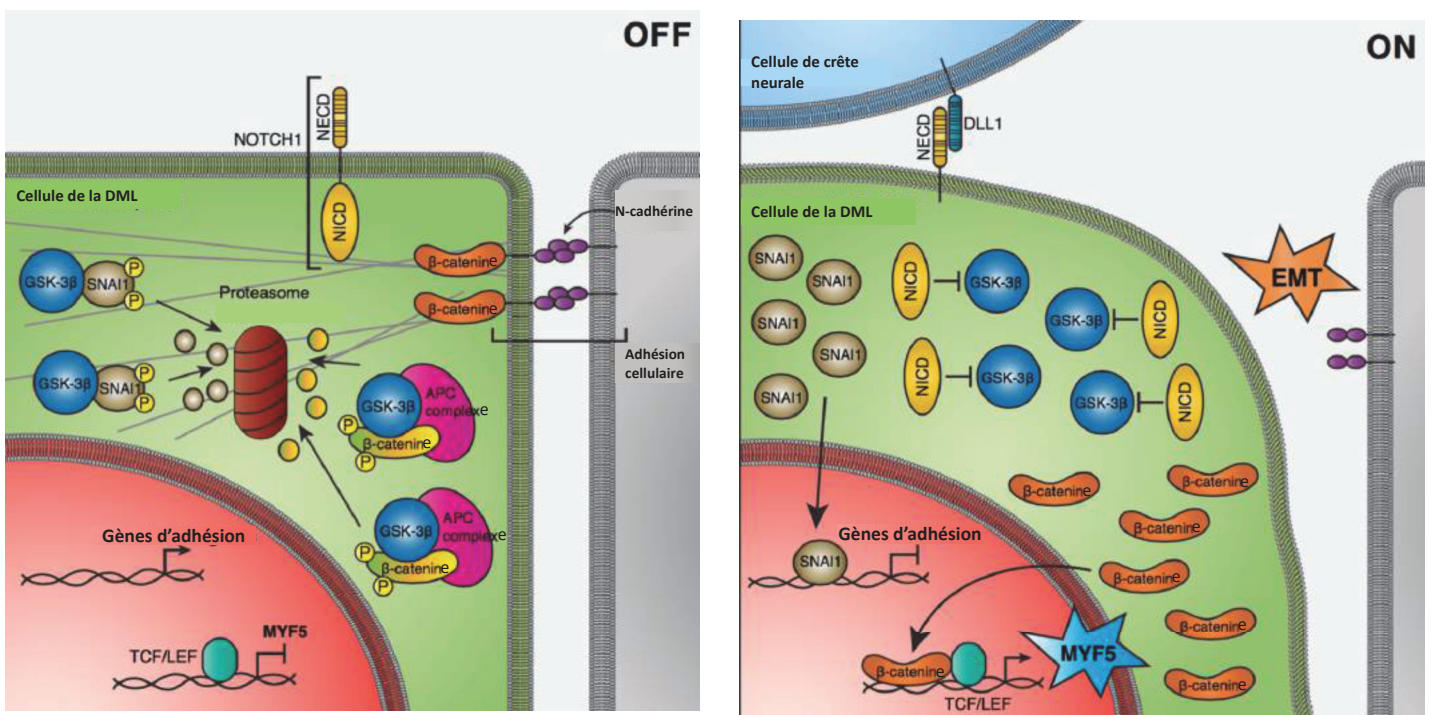
### **III.C.2.1 Induction de la différenciation via les crêtes, Wnt et Notch**

Ainsi, l'équilibre prolifération/différenciation est finement régulée lors de l'initiation de la myogénèse. La première étape dans l'engagement de la voie myogénique est l'expression de MRF (Myogenic Regulatory Factors). De nombreuses études suggèrent que les molécules Wnt provenant du tube neural ainsi que de l'ectoderme sous-jacent, en plus de contrôler la formation du dermomyotome, sont à l'origine de l'expression initiale des MRF (Borello et al., 2006; Dietrich et al., 1997; Münsterberg et al., 1995; Tajbakhsh et al., 1998) via la voie canonique Wnt/ $\beta$ caténine (Borello et al., 2006; Gros et al., 2009). Cependant, il a été mis en évidence récemment au sein du laboratoire (Rios et al., 2011) que la voie Notch contrôle la différenciation des cellules progénitrices de la DML.

Les cellules des crêtes neurales, exprimant *DLL1* (le ligand Notch Delta-like 1), vont, par contact lors de leur migration, activer NOTCH enchâssé à la membrane cytoplasmique des cellules de la DML (Rios et al., 2011) et ainsi induire les MRF. Cette étude, en plus de mettre en évidence un nouveau rôle des crêtes neurales, démontre la nécessité de Notch à l'activation de la myogénèse. Ces données contrastent avec des études mettant en évidence que l'expression de *DLL1*, et la réponse Notch qui y est liée, sont des inhibiteurs de la différenciation (Schuster-Gossler et al., 2007) et promeuvent le maintien du groupe de cellules progénitrices. Ce maintien Notch-dépendant du groupe de cellules progénitrices est

médié par RBPJ, chez l'embryon (Vasyutina et al., 2007) et chez l'adulte (Bjornson et al., 2012; Conboy et al., 2003). Il est donc probable que la différence entre la réponse des cellules de la DML et celles des progéniteurs résidents à l'activation de Notch est contexte-dépendante.

De plus, il a été mis en évidence que l'activation de Notch par les crêtes neurales provoque la libération de la région intracellulaire de NOTCH activé (NICD) et l'activation du programme de différenciation myogénique. La surexpression, chez l'embryon de poulet, d'un NICD enchâssé à la membrane provoque les mêmes effets sur la différenciation myogénique que la surexpression de NICD. Donc, NOTCH active la différenciation myogénique et l'EMT *via* une voie non canonique (non liée à son activité transcriptionnelle) (Sieiro et al., 2016). L'étude de cette voie non canonique a permis de mettre en évidence que NICD inhibe GSK3 $\beta$  (*via* un mécanisme encore inconnu), ce qui a pour conséquence la stabilisation de SNAIL. SNAIL réprime alors l'expression des gènes d'adhésion cellulaire et la  $\beta$ caténine, après translocation dans le noyau, se lie à TCF/LEF pour activer l'expression de gènes myogéniques tels que *Myf5* (**Figure 23**) (Sieiro et al., 2016).



**Figure 23: Activation de l'EMT et de la voie myogénique dans les cellules de la DML, suite à l'activation de NOTCH par les crêtes neurales**

Le schéma de gauche met en évidence qu'en l'absence d'activation de NICD, SNAIL1 et la  $\beta$ caténine libre dans le cytoplasme sont adressées au protéasome par GSK3 $\beta$  ; les gènes d'adhésion cellulaires sont exprimés et ceux de la myogenèse sont réprimés. Le schéma de droite présente la cascade moléculaire induite par l'activation de NOTCH, conduisant à l'activation de l'EMT et du programme myogénique. Adapté de (Sieiro et al., 2016)

Ainsi, prolifération, EMT et différenciation cellulaire dans les cellules de la DML sont liées et mettent en jeu les voies NOTCH et Wnt ( $\beta$ caténine, TCF/LEF) de manière complexe et contexte dépendante.

### III.C.2.2 Les MRF et leurs fonctions

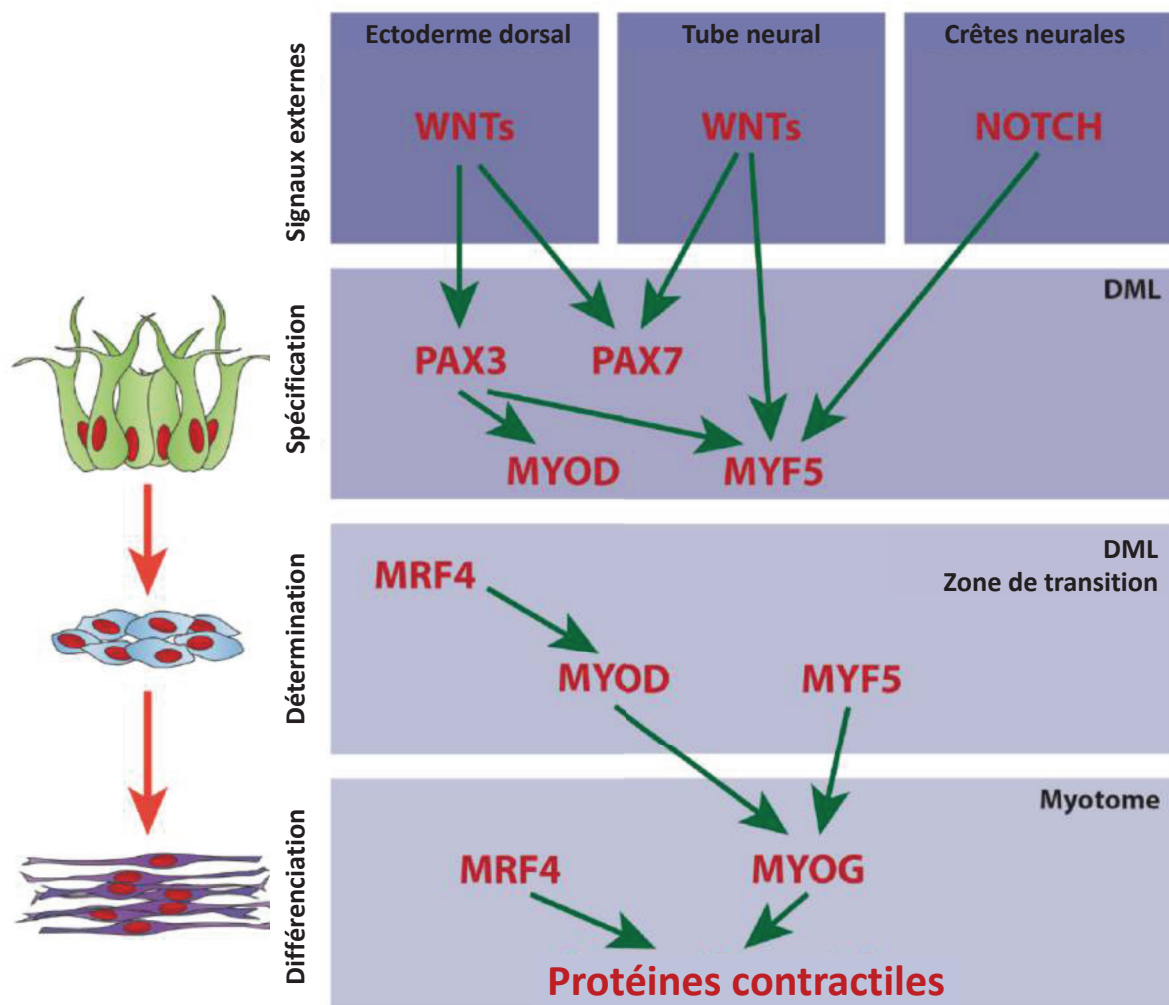
Au sein de la famille des facteurs de transcription hélice-bouche-hélice, 4 MRFs ont été identifiés *MyoD* (Davis et al., 1987), *Myf5* (Braun et al., 1989), *MyoG/myogenin* (Edmondson and Olson, 1989) et *Myf6/MRF4* (Braun et al., 1990; Miner and Wold, 1990). Ces gènes sont exclusivement exprimés dans les muscles squelettiques et leur expression ectopique permet la différenciation de nombreux types cellulaires en myoblastes (Braun et al., 1989, 1990; Davis et al., 1987). Ces protéines, après hétérodimérisation avec des protéines E se lient à des sites CANNTG (E-box), préservés dans les séquences promotrices de nombreux gènes muscle-spécifiques (Buckingham, 1996), et activent la transcription.

L'activation de la myogenèse est marquée par l'expression de *Myf5* et *MyoD*. Chez l'embryon de poulet et de souris, *MyoD* et *Myf5* sont exprimés dès les premiers stades de la formation du dermomyotome *in vivo* (Emerson, 1990). Cependant, chez l'embryon de poulet, MYOD apparaît à un stade plus précoce (Kiefer and Hauschka, 2001). Les souris knock-out uniques *MyoD* ou *Myf5* ne présentent aucun défaut musculaires (Braun et al., 1989; Kablar et al., 1997). Cela démontre que *MyoD* et *Myf5* seuls ne sont pas indispensables à la myogenèse. Cependant, la souris *MyoD<sup>-/-</sup>/Myf5<sup>-/-</sup>* ne présente pas de muscles squelettiques (Rudnicki et al., 1993), ce qui met en évidence que ces deux gènes sont redondants/se compensent mais qu'ils sont indispensables à la myogénèse. De plus, il a été montré que des souris *Pax3<sup>-/-</sup>/Myf5<sup>-/-</sup>* ne présentent aucun muscle au niveau du tronc (Franz et al., 1993; Tajbakhsh et al., 1997). Cela s'expliquerait par le fait que MYOD ne parvient pas à compenser l'absence de MYF5, ce qui suggère que les gènes *Pax* sont en amont des MRF. Cette différenciation *MyoD/Myf5* dépendante est donc aussi dépendante de l'expression de *Pax3/Pax7*.

De plus les MRF contrôlent le cycle cellulaire de manière fine et complexe. En effet, le passage de l'état prolifératif à l'état de différenciation nécessite un arrêt du cycle cellulaire au stade post-mitotique. Des études *in vitro* ont montré que les *cyclines A et D* ainsi que les *CDK* (promotion de la phase G1 à la phase S) sont inhibées lors de la différenciation myogénique alors que des inhibiteurs de cyclines tels *p21*, *p27* et *p57* sont fortement exprimés (Matsuoka et al., 1995; Zabludoff et al., 1998). Or, les protéines *p21*, *p27* et *p57* sont nécessaires à l'induction de la différenciation (Manceau et al., 2008; Zhang et al., 1999). *MyoD* contrôle l'expression de *p21* (Charrier-Savournin et al., 2004) et l'inhibition de *Myf5* et *MyoD* dans des

myoblastes prolifératifs provoque leur entrée en phase G0 (Kitzmann et al., 1998; Lindon et al., 1998).

Contrairement à *MyoD* et *Myf5*, les deux autres MRFs ne s'expriment pas lors de l'induction de la myogenèse, mais lors d'un état totalement différencié. Chez la souris et chez le poulet, la *myogénine* est exprimée très faiblement lors de l'induction puis massivement lors de l'élongation et de la fusion de fibres musculaires. Cette expression est maintenue dans les fibres totalement différenciées (Hacker and Guthrie, 1998; Sassoon et al., 1989).



**Figure 24: Modèle de l'induction de la myogenèse à la différenciation cellulaire lors de la formation des muscles squelettiques**

Les signaux Wnt provenant de l'ectoderme dorsal ainsi que du tube neural induisent Pax3 et Pax7. Les signaux Wnt provenant du tube neural ainsi que les signaux Notch provenant des crêtes neurales induisent Myf5. PAX3 induit aussi Myf5 et MyoD qui a leur tour induisent la myogénine (MYOG). MYOG ainsi que MRF4 induisent les protéines contractiles. DML : lèvre dorso-médiale du somite. Adapté de (Siero Mosti, 2015).



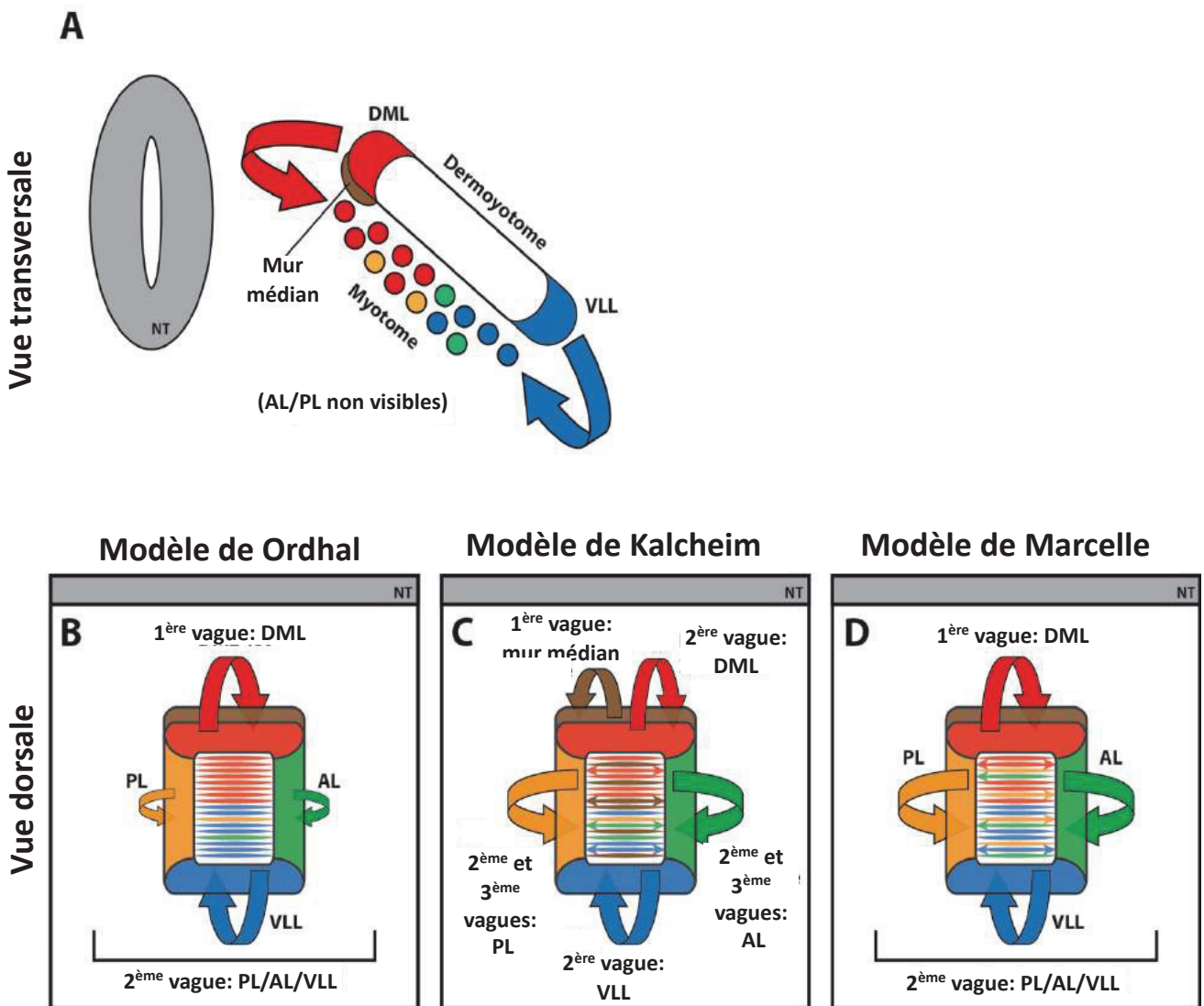
### **III.C.2.3 Formation du myotome**

#### **III.C.2.3.1 Formation du myotome primaire**

Lors de l'initiation de la myogénèse, les cellules de la DML subissent une EMT concomitante aux premières étapes de différenciation (Rios et al., 2011) puis migrent au niveau de la zone de transition, entre le dermomyotome et le sclérotome (Gros et al., 2009). Les cellules présentes dans la zone de transition sont des myoblastes postmitotiques qui vont se différencier en myocytes et ainsi former le myotome. Afin de déterminer l'origine des cellules du myotome primaires, des expériences de lignages cellulaires ont été réalisés par plusieurs groupes dont ceux de C. Ordahl et C. Kalcheim qui ne sont pas parvenus aux mêmes conclusions. Le premier a mis en évidence que les premiers précurseurs se différencient au niveau de la DML afin de former le myotome epaxial et, 1 jour plus tard, les précurseurs de la VLL se différencient pour former le myotome hypaxial (Denetclaw and Ordahl, 2000; Denetclaw et al., 1997). Le second a proposé un modèle en 3 vagues de migrations : une première avant la formation des bordures du dermomyotome, une seconde où les cellules provenant des 4 bordures se différencient et s'intercalent puis une troisième où des cellules de l'AL et la PL entrent dans le myotome, se divisent et augmentent la masse musculaire avant de se différencier (Cinnamon et al., 2001; Kahane et al., 2001). Afin de résoudre ce débat, notre laboratoire, a réalisé des expériences de lignage cellulaire par la GFP, plus précise que le marqueur membranaire Dil précédemment utilisé (Gros et al., 2004). Cette étude révèle que les 4 bordures du dermomyotome contribuent à la formation du myotome en proportions équivalentes. Les cellules de la DML sont les premières à se différencier et à former des fibres, puis les cellules des trois autres lèvres.

#### **III.C.2.3.2 Seconde étape de la myogenèse**

A la suite de la formation du myotome primaire par les 4 bordures du dermomyotome, une augmentation de la taille du myotome a lieu. Les cellules du dermomyotome central subissent une EMT et migrent dans le myotome où elles se multiplient et se différencient (Gros et al., 2005; Kassam-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005).



**Figure 25: Modèles de mise en place du myotome primaire chez l'embryon de poulet**

**A.** Schéma en vue transversale du dermomyotome et myotome de poulet. Les progéniteurs des quatre bordures (DML en rouge, VLL en bleu, AL et PL ne sont pas représentés) migrent dans le myotome, ventralement au dermomyotome, de manière concomitante à leur différenciation. Le mur médian, représenté en marron est situé ventralement par rapport à la DML. B-D. Schémas de trois différents modèles proposés pour expliquer la formation du myotome primaire, en vue dorsale. B. Modèle de Ordahl. C. Modèle de Kalcheim. D. modèle de Marcelle. Les flèches représentent l'élongation des fibres. NT : tube neural, DML : lèvre dorso-médiale, VLL : lèvre ventro-latérale, AL : lèvre antérieure, PL : lèvre postérieure. Adapté de (Sieiro Mosti, 2015)



Ainsi, les somites sont un modèle d'étude de l'EMT moins conventionnel que les crêtes neurales. L'étude de la myogenèse des cellules de la DML a permis de mettre en évidence l'implication de la voie Notch cytoplasmique dans ce processus.

Pour conclure, les cellules des crêtes neurales réalisent une EMT dite « classique » concomitante à leur sortie du toit du tube neural alors que les cellules de la DML réalisent une EMT qui serait induite, à première vue, de manière moins conventionnelle, puisque liée à la voie Notch non canonique. En effet, bien que l'implication de Notch dans de nombreuses EMT liées à des maladies (Espinoza and Miele, 2013; Li et al., 2013; Yuan et al., 2014) soit largement démontré et soit une piste de thérapie, des effets liés à une activité non transcriptionnelle sont beaucoup plus confidentiels. Notre laboratoire a mis en évidence que NICD permet l'inactivation de GSK3 $\beta$  par un mécanisme encore inconnu. Cette inactivation induit, *via* SNAIL et la  $\beta$ caténine, l'induction de l'EMT et de la différenciation. Durant mes trois années de thèse, j'ai cherché à confirmer l'implication de la voie Notch cytoplasmique dans l'induction de l'EMT et de la différenciation des cellules de la DML *via* des expériences complémentaires à celles réalisées auparavant. J'ai aussi cherché à caractériser l'inactivation de GSK3 $\beta$  par NICD. J'ai également voulu démontrer si cette voie, encore inconnue il y a quelques années, pouvait être généralisable à d'autres EMT. J'ai en particulier cherché à la mettre en évidence au niveau de l'EMT des cellules des crêtes neurales.

# IV Résultats

*« Face à la roche, le ruisseau l'emporte toujours,  
non pas par la force mais par la persévérance »*

*H. Jackson Brown*

**IV.A Généralisation de la voie Notch**  
**cytoplasmiques aux cellules de la VLL et aux**  
**crêtes neurales**

## **IV.A.1 Introduction**

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'EMT est un processus extrêmement bien conservé, tant au sein des organismes que dans les divers processus où elle est impliquée. Notre laboratoire a récemment caractérisé les événements cellulaires et moléculaires associés à la différenciation myogénique des cellules de la lèvre dorsomédiale (DML) du somite chez l'embryon de poulet. Il a notamment été mis en évidence que les cellules des crêtes neurales, qui expriment Delta1 de manière mosaïque, vont activer, au cours de leur migration, la signalisation NOTCH dans les cellules de la DML. Notre laboratoire a été le premier à montrer que c'est une fonction non canonique de NOTCH (cytoplasmique et indépendante de son activité transcriptionnelle normale) qui déclenche un module de signalisation impliquant GSK3 $\beta$ , Snail1 et la  $\beta$ Caténine et dont la conséquence est un changement de destin cellulaire (l'activation de la myogenèse) des cellules épithéliales de la DML, mécaniquement lié à l'EMT de ces cellules. Durant ma thèse, j'ai cherché à savoir si ce module de signalisation est spécifique aux cellules de la DML ou bien s'il est généralisable à d'autres EMT embryonnaires. Pour cela, j'ai cherché à mettre en évidence l'implication de cette voie au niveau de la lèvre ventrolatérale du somite ainsi que dans les cellules des crêtes neurales.

## **IV.A.2 Mise en évidence de la voie NOTCH cytoplasmique au niveau de la myogenèse primaire initiée dans la lèvre ventro-latérale du somite**

Comme montré dans (Sieiro et al., 2016), la voie NOTCH cytoplasmique active l'accumulation de SNAIL et de la  $\beta$ caténine via inhibition de GSK3 $\beta$ , ce qui conduit à une EMT ainsi qu'à l'activation de la myogenèse via Myf5.

Afin de tester si cette voie est impliquée dans l'EMT au niveau de la VLL, j'ai testé l'effet de la suractivation de NOTCH activé -NICD- dans cette structure. J'ai co-électroporé NICD sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire dans la VLL avec le biosenseur GSK3 $\beta$ . Le biosenseur (Taelman et al., 2010) permet de visualiser par fluorescence le niveau d'activité de GSK3 $\beta$ . Le biosenseur est constitué d'une GFP couplée à une queue phosphorylable par GSK3 $\beta$  et à un

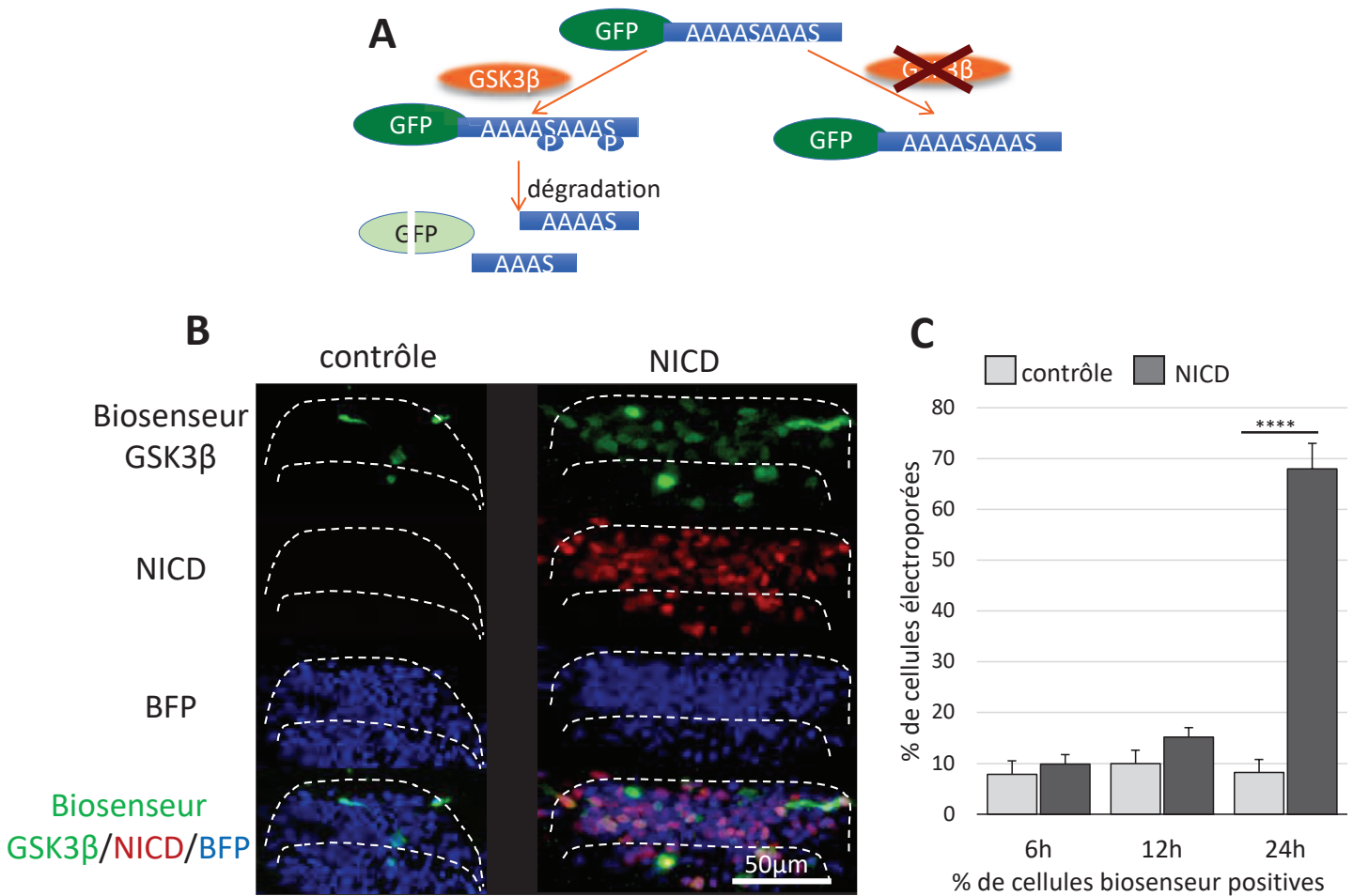
site d'ubiquitination. A l'état basal, le biosenseur émet de la fluorescence dans le vert lorsqu'il est excité. Lorsque la protéine GSK3 $\beta$  est active, elle va phosphoryler la queue du biosenseur et permettre son adressage au protéasome et ainsi sa dégradation, résultant en une faible fluorescence. Lorsque GSK3 $\beta$  est inactive ou absente, elle ne peut plus phosphoryler le biosenseur et celui-ci reste libre dans le cytoplasme et plus de fluorescence est donc visible (**Figure 26 A**).

J'ai co-électroporé de NICD et le biosenseur puis j'ai observé l'effet 6h, 12h et 24h après électroporation. La BFP sert de contrôle interne d'électroporation. Aux trois temps, le contrôle (électroporation du biosenseur) montre qu'un faible pourcentage de cellules électroporées (environ 10%) sont GFP-positives, ce qui signifie qu'environ 90% des cellules électroporées présentent un haut niveau de GSK3 $\beta$  actif. A 6h et 12h après électroporation, la surexpression de NICD n'augmente pas le nombre de cellules fluorescentes observées (ie environ 10%) alors que 24h après électroporation, 78% des cellules présentent une fluorescence verte détectable (**Figure 26 B** et **Figure 26 C**). Ceci signifie que la surexpression de NICD dans la VLL provoque l'inactivation de GSK3 $\beta$  24h après électroporation par rapport au contrôle.

Nous avons observé au niveau de la DML, que la surexpression de NICD provoquait l'inactivation de GSK3 $\beta$  6h après électroporation (Rios et al., 2011). Cette différence temporelle pourrait s'expliquer grâce aux observations réalisées par l'équipe (Gros et al., 2004). Celles-ci mettent en évidence que les cellules de la DML se différencient 13h après électroporation alors que celles de la VLL le font 17h plus tard. Ainsi, la différence temporelle observée entre la DML et la VLL pour l'inactivation de GSK3 $\beta$  par NICD s'explique peut-être par le délai de la VLL à initier la différenciation myogénique par rapport à la DML.

Ainsi il apparaît que la première étape de la voie NOTCH cytoplasmique soit généralisable à plusieurs populations de cellules subissant une EMT au niveau du dermomyotome.

Nous avons ensuite cherché à savoir si cette voie est généralisable à d'autres populations de cellules subissant une EMT durant l'embryogénèse. Pour ce faire, nous avons cherché à mettre en évidence la voie Notch cytoplasmique au sein des cellules des crêtes neurales du tronc de l'embryon de poulet.



**Figure 26: NICD induit l'inactivation de GSK3β dans les cellules de la VLL**

**A.** Schéma du mécanisme d'action du biosenseur GSK3β. Le biosenseur est une GFP couplée à une queue phosphorylable par GSK3β (en haut). En l'absence de GSK3β active, le biosenseur émet de la fluorescence vert (schéma de droite) alors que lorsque la protéine GSK3β est active, elle va permettre la dégradation du biosenseur (schéma de gauche) qui n'émet plus de fluorescence. **B.** Reconstruction 3D d'empilements de coupes optiques de VLL 24h après électroporation. Le panel de gauche met en évidence l'activation endogène du biosenseur et le panel de droite l'activation du biosenseur lors de la suractivation de NICD. Le biosenseur GSK3β est représenté en vert sur la première ligne, NICD en rouge sur la deuxième ligne, le contrôle d'électroporation en bleu sur la troisième ligne et la dernière ligne représente la superposition des trois couleurs. **C.** analyses statistiques à 6, 12 et 24h du nombre de cellules biosenseur positives par rapport au nombre total de cellules électroporées, en présence et en absence du NICD exogène. \*\*\*\* :  $p < 0,001$

### **IV.A.3 Co-activation des voies Wnt and NOTCH dans le toit du tube neural et les crêtes neurales**

Comme indiqué dans l'introduction, les crêtes neurales sont des cellules issues du toit du tube neural après spécification et EMT.

Afin de visualiser si les voies Wnt et NOTCH sont co-activées au niveau du point d'initiation des crêtes neurales, j'ai co-électroporé un rapporteur de la voie Notch et un rapporteur de la voie Wnt. Le rapporteur de la voie NOTCH est constitué d'une GFP déstabilisée (Hes1-d2eGFP) sous contrôle du promoteur HES1 (Ohtsuka et al., 2006). HES1 est une cible directe de NICD et a été utilisé comme rapporteur de l'activité de NOTCH au sein des somites (Rios et al., 2011). Le rapporteur 'TOPflash' (Korinek et al., 1997; Rios et al., 2010) contient 12 répétitions du site de liaison TCF1 suivies d'une DsRed (RFP) déstabilisée (12Tf-DsRedExpDR). L'activité du rapporteur TOPflash est médiée par la liaison du facteur de transcription TCF/LEF et de son co-facteur, la  $\beta$ -caténine.

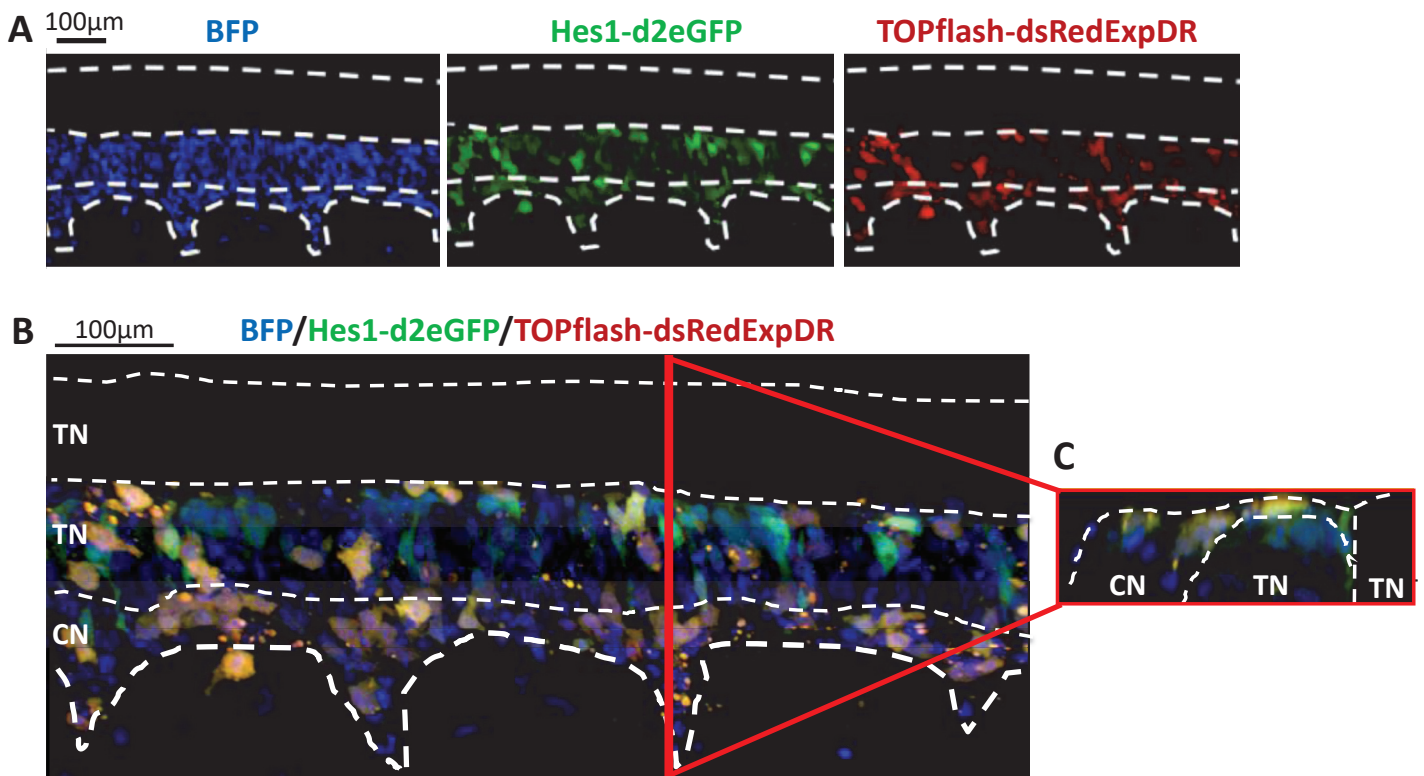
Les deux rapporteurs contiennent des protéines fluorescentes déstabilisées (leur demi-vie est d'environ 2h), ce qui permet de mettre en évidence les cellules engagées dans ces voies de signalisation au moment approximatif de l'arrêt de l'expérience. De plus, l'intensité du signal permet d'évaluer un niveau d'activation de la voie concernée.

6h après électroporation, après immunomarquage, une reconstruction 3D d'un stack confocal en vue dorsale permet de mettre en évidence que certaines cellules du tube neural mais surtout des crêtes neurales néoformées (formées après électroporation) co-expriment les voies NOTCH et Wnt (**Figure 27**).

Des coupes transversales d'embryons ont permis de quantifier ces résultats (**Figure 28**) : 60% des crêtes neurales néoformées sont TOPflash positives et 31% sont Hes1 positives (**Figure 28 A, B et C**). La moitié des cellules TOPflash positives sont Hes1 positives (**Figure 28 D**) alors que la vaste majorité des cellules Hes1 positives sont TOPflash positives (93%) (**Figure 28 D**). De manière similaire, les 55% des cellules du toit du tube neural expriment TOPflash et 32% expriment le rapporteur Notch.

Les rapporteurs des voies de signalisation Wnt et NOTCH sont donc co-activés au niveau des crêtes neurales néoformées.



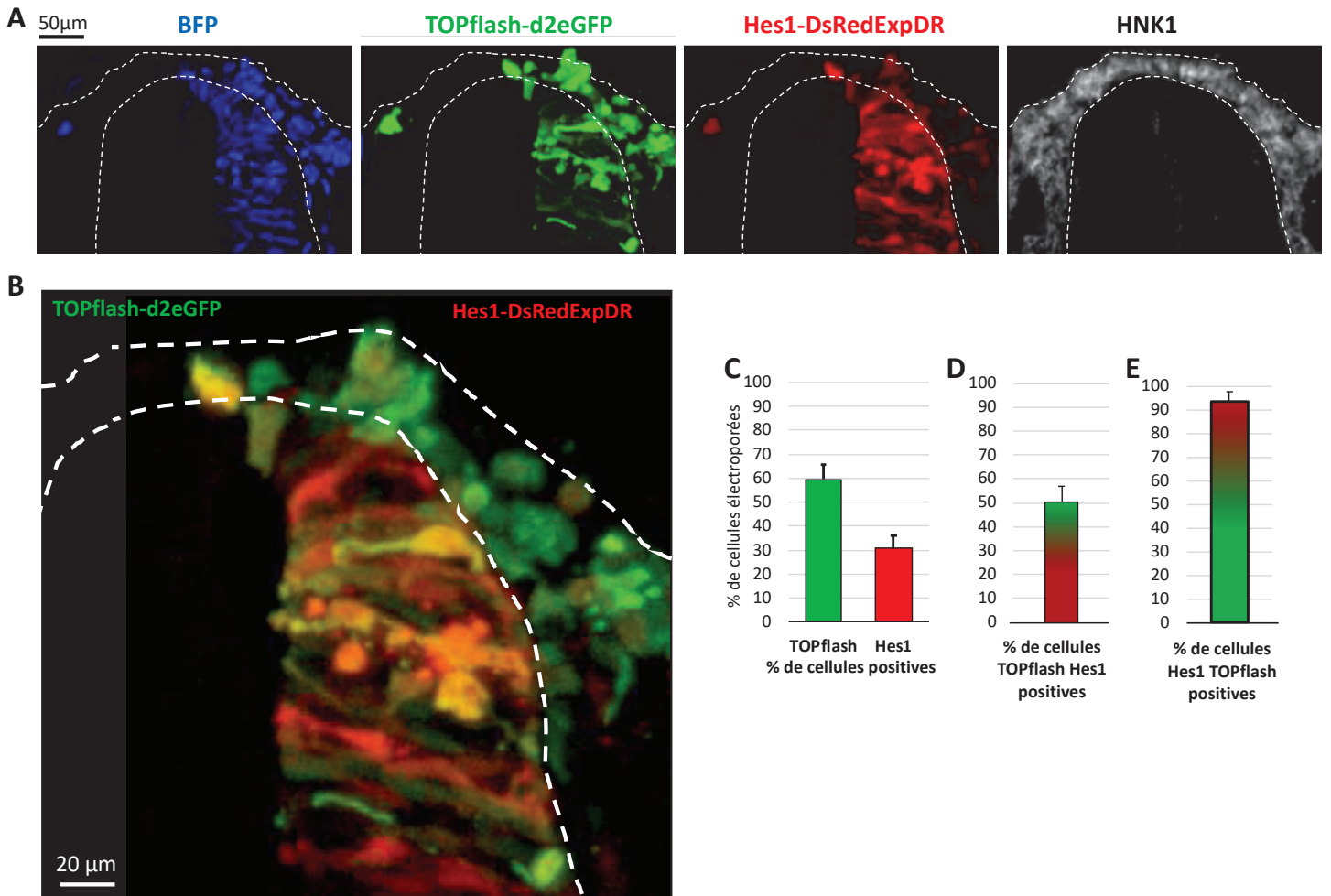


**Figure 27: les rapporteurs de la voie NOTCH et Wnt sont co-exprimés dans les cellules des crêtes neurales**

**A.** Reconstruction 3D d'empilements de coupes optiques de tubes neuraux électroporés et crêtes neurales qui en ont dérivé 12h après électroporation en vue dorsale. Le panel de gauche met en évidence le contrôle d'électroporation en bleu, le panel central le rapporteur Notch en vert et le panel de droite le rapporteur de la voie Wnt en rouge. **B.** Superposition des trois canaux de la sous-figure A. TN : tube neural. CN : crêtes neurales. **C.** Vue transversale de l'embryon selon l'axe rouge de la sous-figure B.

De plus, la plupart des cellules (97%) co-activant ces rapporteurs sont HNK-1 (human natural killer-1) positives (Lipinski et al., 1983). HNK1, aussi connu comme l'épitope CD57, est un marqueur spécifique des cellules des crêtes neurales. Ainsi donc, il existe une forte corrélation entre la co-activation des rapporteurs NOTCH et Wnt et l'initiation du programme de différenciation.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus au niveau des cellules de la DML (Sieiro et al., 2016) où la vaste majorité des cellules positives pour ces deux rapporteurs activaient la myogenèse (Myf5 expression). Cette similarité singulière suggère que des mécanismes moléculaires similaires sont activés au cours de la myogenèse précoce et de la formation des crêtes neurales.



**Figure 28 : Les rapporteurs de la voie NOTCH et Wnt sont co-exprimés dans les cellules des crêtes neurales.**

**A.** Reconstruction 3D d'empilements de coupes optiques de tubes neuraux électroporés et crêtes neurales qui en ont dérivé 12h après électroporation en vue sagittale sur coupes de 30µm. Le panel de gauche met en évidence le contrôle d'électroporation en bleu, le deuxième le rapporteur Notch en vert, le troisième le rapporteur de la voie Wnt en rouge et le dernier HNK1 en gris. **B.** Superposition des canaux vert et rouge (rapporteurs Notch et Wnt) de la sous-figure A. TN : tube neural. CN : crêtes neurales. **C.** Analyses statistiques du nombre de cellules exprimant les rapporteurs de la voie Wnt (en vert) (59,6% ;  $et=6,0$ ) ou le rapporteur de la voie NOTCH (en rouge) (30,7% ;  $et=5,5$ ) par rapport au nombre total de cellules électroporées dans les crêtes neurales. **D.** Analyse statistique du nombre de cellules exprimant le rapporteur de la voie NOTCH par rapport au nombre de cellules électroporées exprimant le rapporteur de la voie Wnt dans les crêtes neurales. (50,4% ;  $et=6,7$ ) **E.** Analyse statistique du nombre de cellules exprimant le rapporteur de la voie Wnt par rapport au nombre de cellules électroporées exprimant le rapporteur de la voie NOTCH dans les crêtes neurales. (93,2% ;  $et=4,2$ ).

#### **IV.A.4 Inhibition de GSK3 $\beta$ par NOTCH activé dans les cellules des crêtes neurales**

Afin de confirmer l'hypothèse précédente, j'ai observé l'effet de la surexpression de NICD sur l'activité GSK3 $\beta$  dans les crêtes neurales. Pour cela, j'ai co-électroporé NICD et le biosenseur GSK3 $\beta$ . La BFP a servi de contrôle d'électroporation. Dans les conditions contrôle, 6h, 12h et 24h après électroporation, seulement quelques cellules sont biosenseur positives (**Figure 29**), suggérant que la plupart des cellules contiennent du GSK3 $\beta$  actif. 6h après électroporation, la surexpression de NICD induit une légère augmentation de la fluorescence du biosenseur (quelques cellules sont faiblement vertes), ce qui indique que GSK3 $\beta$  est légèrement inhibé. 12h après électroporation, la fluorescence du biosenseur induite par la surexpression de NICD est beaucoup plus importante, tant par l'intensité que par le nombre de cellules concernées. Cette augmentation de fluorescence n'est plus observable 24h après électroporation. Ainsi donc, la surexpression de NICD induit une inhibition transitoire de GSK3 $\beta$  rapidement après électroporation (6h), avec un optimum environ 12h après électroporation et un arrêt de l'inhibition 24h après électroporation.

Donc, le domaine intracellulaire de Notch permet l'inhibition de GSK3 $\beta$  dans la région dorsale du tube neural et dans les crêtes neurales néoformées.

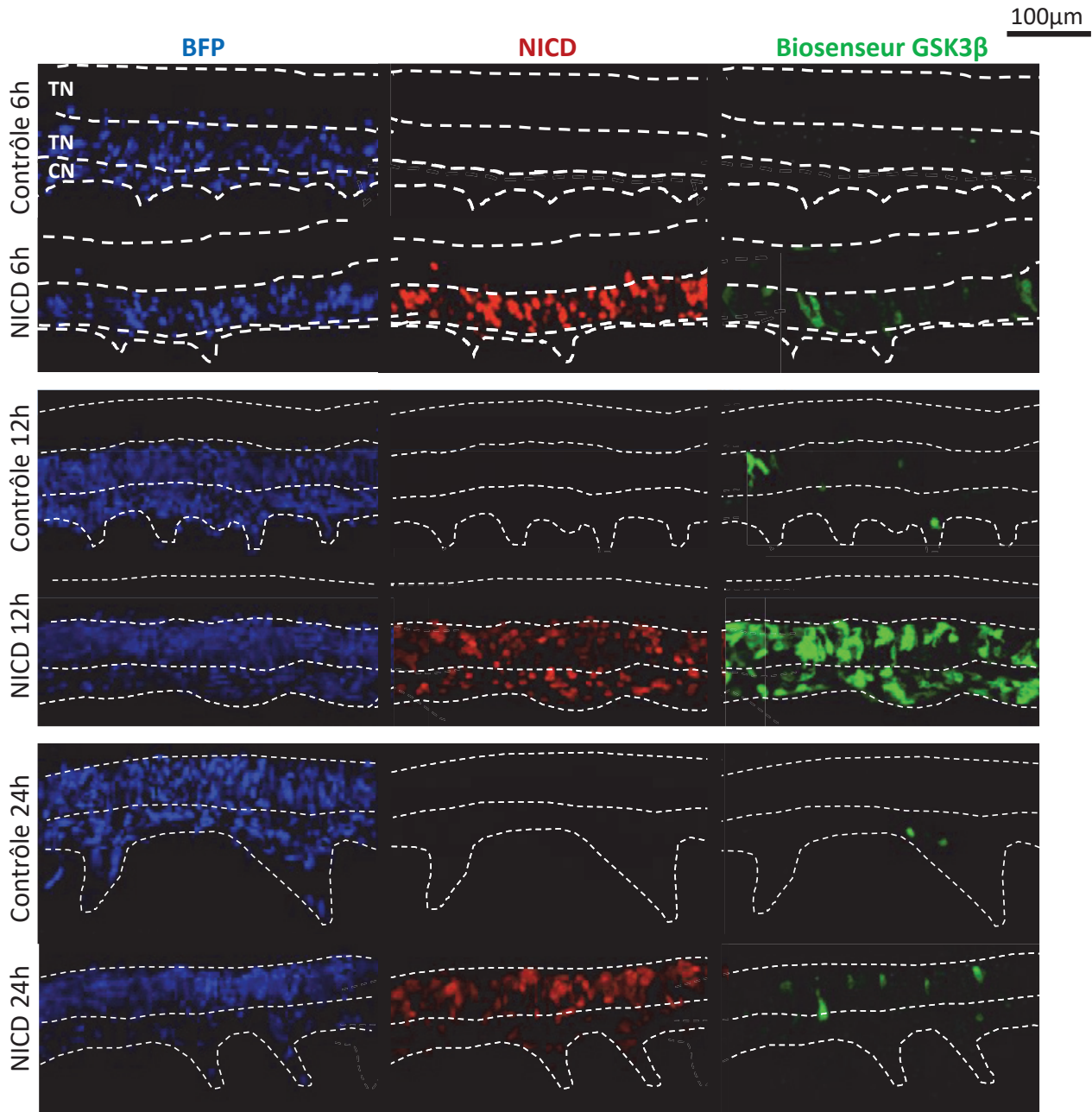
#### **IV.A.5 NOTCH contrôle l'activité de GSK3 de manière indépendante à ses fonctions transcriptionnelles dans le noyau**

Afin de vérifier que l'inhibition de GSK3 $\beta$  par NICD se produit dans le cytoplasme, et donc n'est pas liée à l'activité transcriptionnelle de NICD, l'effet de la surexpression d'un NICD attaché à la membrane (CD4-NICD) sur le biosenseur GSK3 $\beta$  a été observé. Contrairement au NICD utilisé précédemment, le CD4-NICD n'active pas le rapporteur NOTCH (Hes1d2eGFP) (Rios et al., 2011), et son immunomarquage confirme qu'il se situe à la membrane et ne transloque pas dans le noyau.

L'expression du CD4-NICD dans le tube neural provoque une stabilisation massive du biosenseur GSK3 $\beta$  à 6 (**Figure 30**) et 12h après électroporation mais plus à 24h (résultats non présentés). Il apparaît que l'inhibition de GSK3 $\beta$  par le CD4-NICD soit initiée plus rapidement

qu'avec NICD (la fluorescence est plus importante à 6 h et un peu moins à 12h, mais toujours beaucoup plus que dans le contrôle).

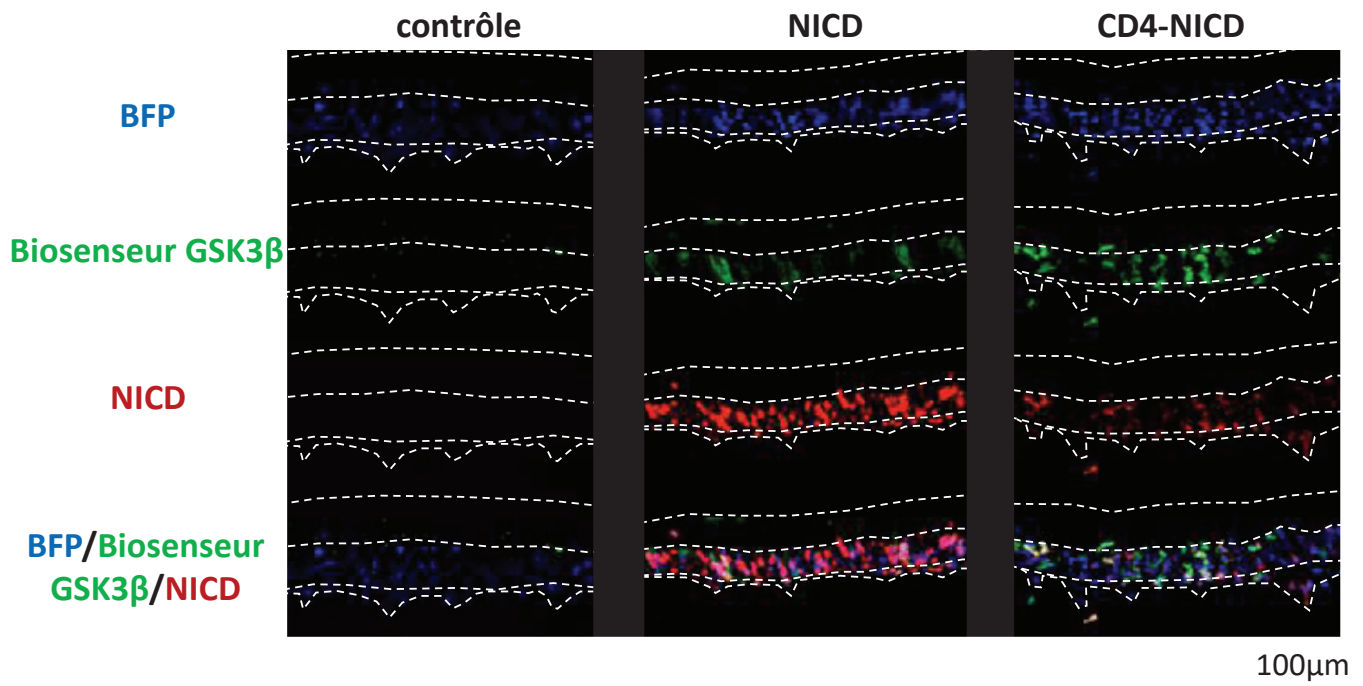
Ces résultats suggèrent que la régulation de l'activité de GSK3 $\beta$  par NICD est indépendante de l'activité transcriptionnelle de NOTCH.



**Figure 29: NICD induit l'inactivation de GSK3 $\beta$  dans les cellules des crêtes neurales et du tube neural dorsal**

Reconstruction 3D d'empilements de coupes optiques de tubes neurax dorsaux électroporés, 6, 12 et 24h après électroporation. Le panel de gauche met en évidence le contrôle d'électroporation en bleu, le panel central NICD en rouge et le panel de droite le biosenseur GSK3 $\beta$  en vert. Les deux premières lignes représentent réciproquement l'activation endogène du biosenseur et l'activation du biosenseur lors de la suractivation de NICD, 6h après électroporation. Les deux lignes centrales 12h après électroporation et les deux lignes du bas idem à 24h après électroporation. TN: tube neural. CN: crêtes neurales.





**Figure 30 : NICD induit l'inactivation de GSK3 $\beta$  dans les cellules des crêtes neurales et du tube neural dorsal**

Reconstructions 3D d'empilements de coupes optiques de tubes neuraux dorsaux électroporés, 6h après électroporation. Le panel de gauche met en évidence l'activation endogène du biosenseur, le panel central l'activation du biosenseur lors de la suractivation de NICD et le panel de droite l'activation du biosenseur lors de la suractivation d'un NICD lié à la membrane (CD4-NICD). Le contrôle d'électroporation est représenté en bleu sur la première ligne, Le biosenseur GSK3 $\beta$  en vert sur la deuxième ligne, NICD et CD4-NICD en bleu sur la troisième ligne et la dernière ligne représente la superposition des trois couleurs.

#### **IV.A.6 *Snail2* inhibe la différenciation des cellules des crêtes neurales mais n'influe pas sur la migration cellulaire.**

Comme énoncé dans l'introduction, Snail est un élément clef de la régulation de l'EMT et notamment au niveau des crêtes neurales. Il a été mis en évidence que la suractivation de SLUG (ie SNAIL2), l'homologue de SNAIL1 présent dans le tube neural, induit l'augmentation de la formation des crêtes neurales crânielles chez l'embryon de poulet (del Barrio and Nieto,

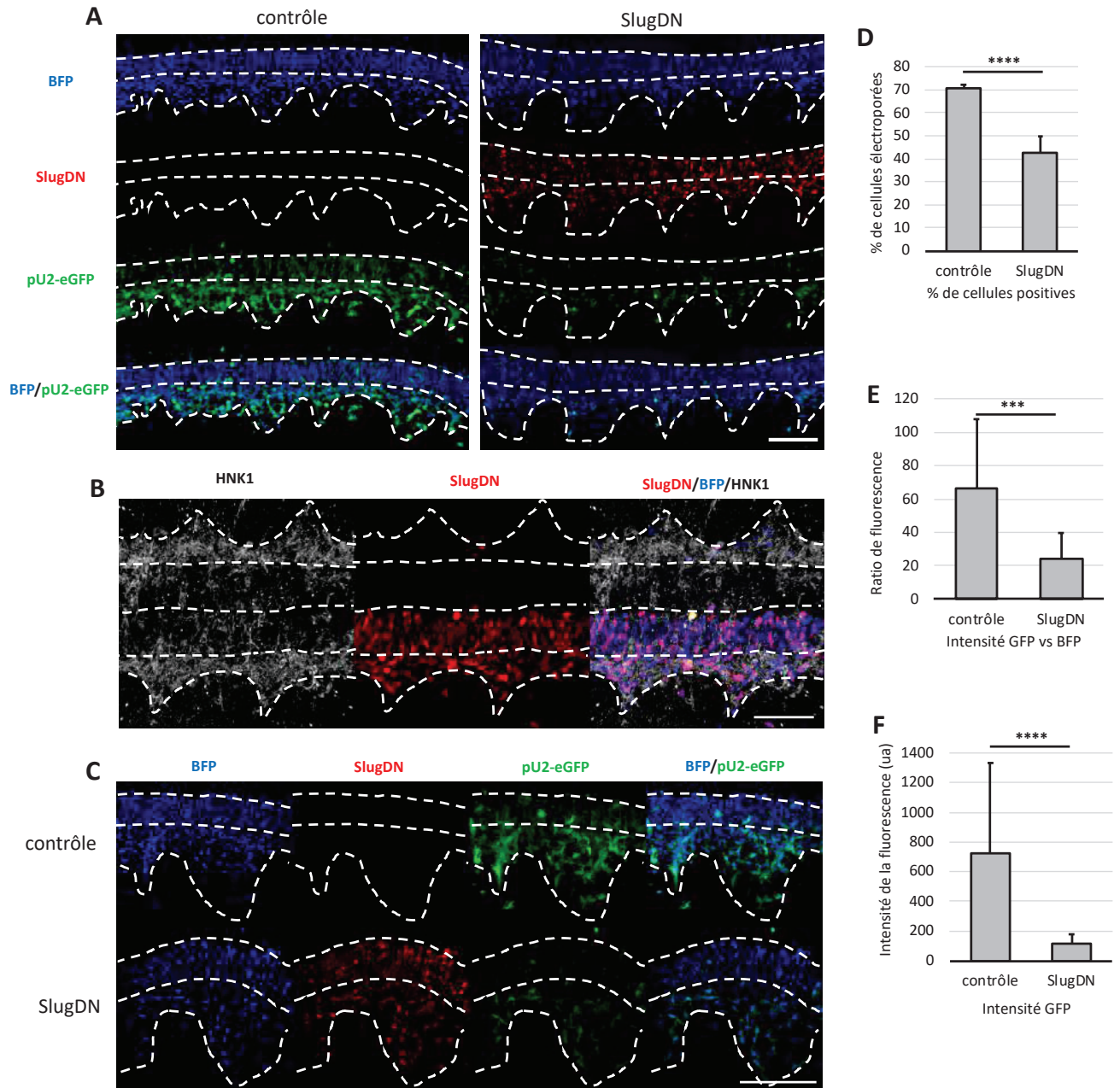
2002). Cependant, cette surexpression n'a pas d'effet au niveau des crêtes neurales du tronc (del Barrio and Nieto, 2002).

Afin de déterminer si Slug influe la différenciation des crêtes neurales au niveau du tronc chez l'embryon de poulet, j'ai construit un plasmide codant une molécule Slug dominant négatif (délétion du domaine VP16) fusionné à une RFP. Afin de mettre en évidence la différenciation des crêtes neurales, un rapporteur constitué d'une GFP sous le contrôle d'une partie du promoteur SOX10 (marqueur de la différenciation au niveau des crêtes neurales) a été utilisé (Rios et al. 2011).

La co-electroporation du DN-Slug-RFP et du pU2-GFP a permis de mettre en évidence que 12h après électroporation, la fluorescence verte produite par le plasmide pU2-GFP est moins importante que les contrôles (**Figure 31 A**), tant au niveau du nombre de cellules Sox10 positives (**Figure 31 D**) qu'au niveau de l'intensité (**Figure 31 E**). Cependant, la comparaison de la répartition de l'intensité verte en fonction de l'intensité bleue met en évidence qu'il n'y a pas de corrélation entre les deux intensités de fluorescence ; cela est nettement visible sur les régressions linéaires du contrôle :  $y = -0,075x + 491,4$ ,  $R^2 = 0,0003$  et de SlugDN  $y = -0,049x + 1269$ ,  $R^2 = 0,0058$ ,  $x < 0,05$  et  $R^2 < 0,006$ . Ainsi l'intensité de la fluorescence verte générée par l'activation du plasmide pU2-GFP n'est pas corrélée à l'intensité de la fluorescence bleue du contrôle d'électroporation. J'ai donc comparé les intensités de fluorescence des cellules GFP positives. Comme cela est visible sur la Figure 31A, les niveaux d'intensité sont très variables d'une cellule à l'autre, ce qui explique les écarts type, cependant la différence est significative (**Figure 31 F**) ; la surexpression de SlugDN inhibe l'activation du plasmide pU2-GFP.

Ainsi donc, un défaut de Slug influencerait négativement la différenciation des crêtes neurales mais pas leur migration.

Afin de confirmer les résultats observés 12h après électroporation, la même expérience a été réalisée 24 (**Figure 31 C**) et 48h (résultats non présentés) après électroporation. De manière similaire à l'expérience précédente, l'inhibition de Slug provoque une diminution de l'activation de la transcription de Sox10, régulant ainsi négativement la différenciation. Aucun effet notable sur la migration n'a été observé (**Figure 31 C**).



**Figure 31: *Slug* permet l'activation de la différenciation cellulaire au niveau des crêtes neurales mais n'influe pas sur la migration**

**A.** Reconstructions 3D d'empilements de coupes optiques de tubes neuraux dorsaux électroporés, 12h après électroporation. Le panel de gauche met en évidence l'activation endogène de Sox10 et le panel de droite l'activation de Sox10 en présence du dominant négatif Slug (*SlugDN*). Le contrôle d'électroporation est représenté en bleu sur la première ligne, le pU2-GFP en vert sur la deuxième ligne, *SlugDN* en rouge sur la troisième ligne et la dernière ligne représente la superposition des trois couleurs. **B.** Reconstructions 3D d'empilements de coupes optiques d'un tube neural dorsal électroporé, 12h après électroporation. Le panel de gauche met en évidence HNK1 en blanc, marqueur des crêtes neurales, le panel central *SlugDN* en rouge et le panel de droite la superposition de HNK1, *SlugDN* et le contrôle d'électroporation en bleu. **C.** Reconstructions 3D d'empilements de coupes optiques de tubes neuraux dorsaux électroporés, 24h après électroporation. La



première ligne met en évidence l'activation endogène de Sox10 et la seconde l'activation de Sox10 en présence du dominant négatif Slug (SlugDN). Le contrôle d'électroporation est représenté en bleu sur la première colonne, le pU2-GFP en vert sur la deuxième colonne, SlugDN en rouge sur la troisième et la dernière colonne représente la superposition des trois couleurs. **D-F.** Analyses statistiques des cellules pU2-GFP 12h après électroporation. **D.** Analyse du nombre de cellules électroporées exprimant pU2-GFP par rapport au nombre total de cellules électroporées dans les crêtes neurales (70,5% ;  $et=2,0$  pour le contrôle et 42,6% ;  $et=6,9$  pour le SlugDN). **E.** Intensité de la fluorescence des cellules pU2-GFP positives par rapport à l'intensité de la BFP (contrôle d'électroporation) (66,7 ;  $et=41,0$  pour le contrôle et 24,1 ;  $et=15,7$  pour le SlugDN). **F.** Intensité de la fluorescence des cellules pU2-GFP positives (722,2ua ;  $et=610,7$  pour le contrôle et 116,4 ;  $et=62,2$  pour le SlugDN). Échelle : 100 $\mu$ m. \*\*\*\* :  $p<0,0001$ , \*\*\* :  $p<0,0005$

## IV.A.7 La relocalisation de la $\beta$ caténine des jonctions est nécessaire à la différenciation cellulaire des crêtes neurales.

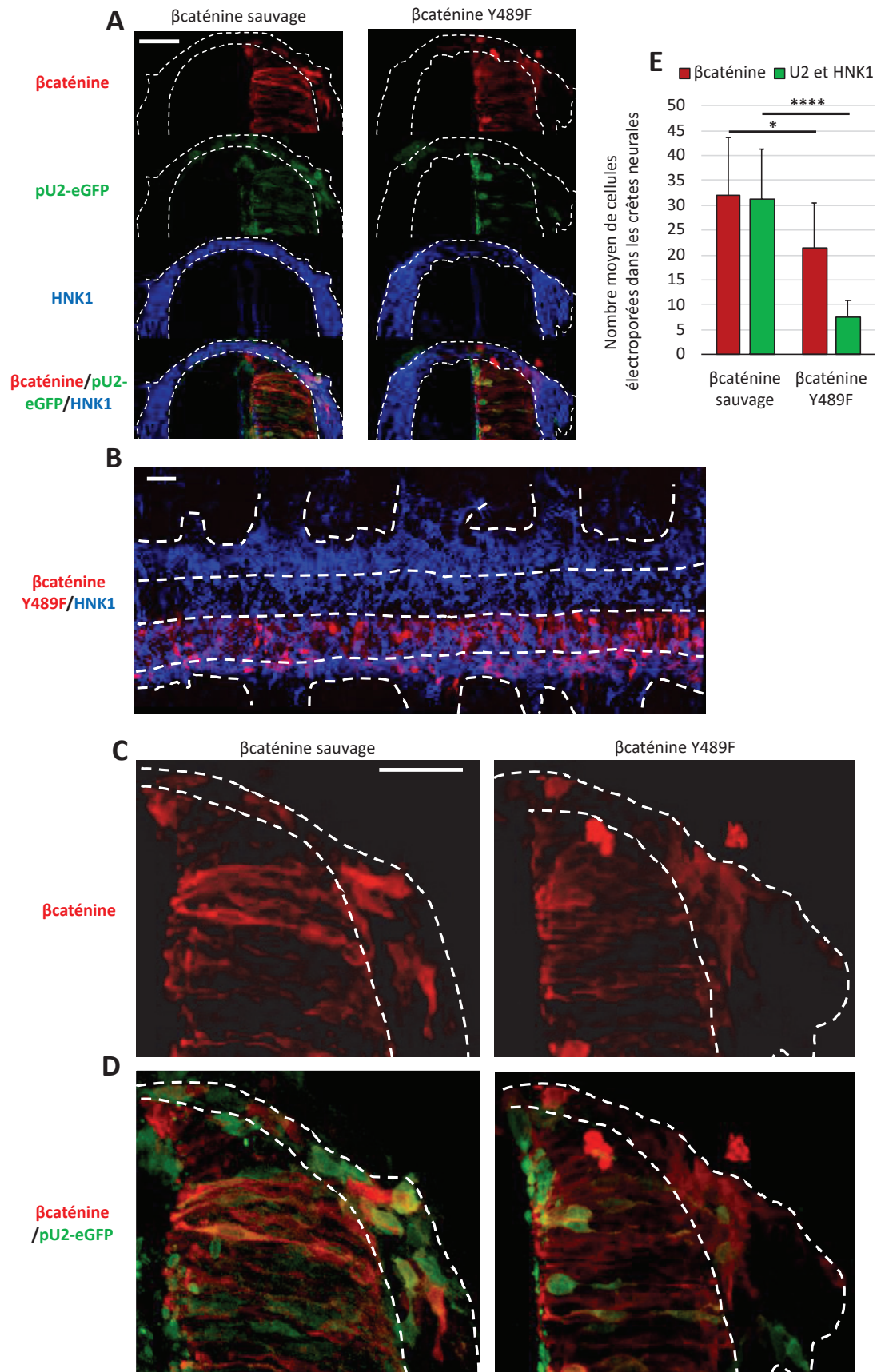
Il a été précédemment démontré au sein du laboratoire que la relocalisation de la  $\beta$ caténine des jonctions est une étape indispensable de l'EMT et de la myogénèse primaire au niveau des cellules de la DML. Afin de vérifier si la  $\beta$ caténine a la même importance dans l'EMT des cellules de la DML que dans l'EMT des cellules du toit du tube neural, j'ai comparé l'effet de la surexpression de la  $\beta$ caténine sauvage et d'une  $\beta$ caténine mutée, constitutivement bloquée à la membrane, Y489F.

Bien qu'un effet à peine perceptible sur la migration soit observé au regard de HNK1 (voir aucun effet significatif) à 6h, 12h (**Figure 32 A** et **Figure 32 B**) et 24h après électroporation, une légère diminution du nombre de cellules migrant dans les crêtes neurales est observable (**Figure 32 C** et **Figure 32 E**) après électroporation de la Y489F. Ces données sont relativement complexes à analyser, du fait que les comptages ont été faits sur des sections aléatoires transversales de 30 $\mu$ m d'épaisseur, et ainsi certaines coupes présentant beaucoup plus de cellules de crêtes neurales (au niveau inter-somitique) que d'autres. De plus, le nombre de cellules migrant au sein des crêtes neurales étant trop important, il est très compliqué de compter les cellules. Comparer le nombre de cellules électroporées migrant nécessite un grand nombre d'embryon de par le fait que, bien que l'électroporation soit une technique très reproductrice, chaque embryon présente un pourcentage de cellules

électroporées unique. Ces deux raisons expliquent en grande partie pourquoi les écarts types sont si importants.

La **Figure 32 D** et **Figure 32 E** mettent en évidence que moins de cellules électroporées expriment le plasmide pU2-GFP (moins de cellules vertes), ce qui signifie que Sox10, marqueur de la différenciation, n'est pas actif.

Ainsi donc, séquestrer la  $\beta$ caténine à la membrane a un faible effet sur la migration cellulaire mais inhibe la différenciation au niveau des crêtes neurales.



**Figure 32: La  $\beta$ caténine permet l'activation de la différenciation cellulaire au niveau des crêtes neurales mais n'influe pas sur la migration**

**A-D.** Reconstructions 3D d'empilements de coupes optiques de tubes neurax dorsaux électroporés, 12h après électroporation. **A, C-D.** vues sagittales. Le panel de gauche met en évidence l'activation de Sox10 lors de la surexpression de la  $\beta$ caténine sauvage et le panel de droite lors de la surexpression de la  $\beta$ caténine constitutivement liée à la membrane (Y489F). La  $\beta$ caténine est représenté en rouge sur la première ligne, le pU2-GFP en vert sur la deuxième ligne, HNK1 en bleu sur la troisième ligne et la dernière ligne représente la superposition des trois couleurs. **B.** Vue dorsale. HNK1, marqueur des crêtes neurales, est présenté en bleu et la  $\beta$ caténineY489F en rouge. La partie située au haut de l'image (partie gauche de l'embryon) représente le contrôle interne de migration. **C-D.** agrandissement des images du panel A. **E.** analyses statistiques du nombre de cellules électroporées présentes dans les crêtes neurales exprimant la  $\beta$ caténine (en rouge) (31,1 cellules ;  $et=11,5$  pour la sauvage et 21,5 cellules ;  $et=8,8$  pour la mutée) ou bien pU2-GFP et HNK1 positives (en vert) (31,2 cellules pour la sauvage ;  $et=10,0$  et 7,6 cellules ;  $et=3,4$  pour la mutée). Échelle : 100 $\mu$ m. \* :  $p<0,02$ , \*\*\*\* :  $p<0,0001$ .

## IV.A.8 Conclusion

Ainsi, j'ai pu mettre en évidence que NICD inhibe GSK3 au niveau des cellules de la VLL et des crêtes neurales. J'ai aussi démontré que les voies Wnt et Notch sont co-exprimées au niveau des crêtes pré-migratoires et migratoires. De plus Slug et la  $\beta$ -caténine libre dans le cytoplasme induisent la différenciation des cellules des crêtes neurales. Ainsi, la voie Notch cytoplasmique semble généralisable aux cellules de la VLL et des crêtes neurales.

## **IV.B Akt, NOTCH and GSK3 $\beta$ interact to trigger early myogenesis in vertebrate embryos.**

Cet article va être soumis très prochainement. Les ISH d'AKT doivent être optimisées afin d'être insérées en figure supplémentaire.



## **AKT, NOTCH and GSK3 $\beta$ interact to trigger early myogenesis in vertebrate embryos.**

Diane Lebrun<sup>1\*</sup>, Pamela Rahal<sup>1\*</sup>, Valérie Morin<sup>1</sup>, Christophe Marcelle<sup>1,2</sup>

1. Institut NeuroMyoGène (INMG), Université Claude Bernard Lyon1, Faculty of Medicine and Pharmacy, CNRS UMR 5310 - INSERM U1217, Lyon, France

2. Australian Regenerative Medicine Institute (ARMI), Monash University, Clayton, Victoria, Australia,

\*. These authors contributed equally to this work

### **ABSTRACT**

During early embryonic development, migrating neural crest cells expressing the NOTCH ligand Delta1 (DLL1) trigger the activation of NOTCH1 signaling in selected epithelial cells within newly formed somites. A key event in this process is a dramatic inhibition of GSK3 $\beta$  activity, initiated by the activation of NOTCH1 and that takes place independent of its transcriptional function. Here, we investigated the mechanism whereby NOTCH1 exerts its non-canonical function in somites. Using the activation of myogenesis as a read-out of the ability of NOTCH receptors to trigger transcription-independent responses in somites, we found that all NOTCH receptors (1-4) activate MYF5 expression and we showed that the RAM (RBPJ-Associated Molecule) domain of the NOTCH Intracellular Domain (NICD) is necessary and sufficient in this process. We then demonstrated that the NOTCH1 Intracellular Domain (NICD1) physically interacts in the cytosol with GSK3 $\beta$  and with the serine threonine protein kinase AKT. Activating AKT triggers myogenesis, likely via the inhibition of GSK3 $\beta$ . We found that AKT, in a dose-dependent manner, decreases the transcriptional activity of NOTCH, suggesting a role in the balance between the canonical and non-canonical functions of NOTCH. Altogether these data strongly support the hypothesis that transcription-independent function of NICD is a central mechanism driving myogenesis in early somites and suggests that, in this tissue, AKT, NOTCH and GSK3 $\beta$  interact in the cytoplasm to trigger a signaling cascade that leads to the formation of the early myotome in vertebrates.

### **INTRODUCTION**

During early embryogenesis, extensive tissue rearrangements and cell migration, associated with rapid cell fate changes, allow the formation of the tissues and organs of the future adult. A model where such complex issues are amenable to experimentation is the early formation of skeletal muscles in the chick embryo. Over many days of development, the medial border of the dermomyotome (DML) generates the first skeletal muscle cells that assemble into a primary myotome. This arises from a crucial cell fate decision: epithelial cells in the DML either self-renew or undergo myogenic differentiation, accompanied by an EMT that allows their translocation into the primary myotome<sup>1-4</sup>.

We previously demonstrated that the activation of MYF5 and MYOD in the DML is dependent upon the transient activation of NOTCH signaling, itself triggered by a mosaic expression of Delta1-positive neural crest cells migrating from the dorsal neural tube, a



mode of signaling we named "kiss-and-run" mechanism<sup>4</sup>. The molecular response that takes place within DML cells upon activation by neural crest cells was recently characterized<sup>5</sup>. Within DML cells, the "kiss-and-run" mechanism triggers a signaling module encompassing NOTCH, GSK-3 $\beta$ , SNAI1 and  $\beta$ -catenin and which couples the initiation of myogenesis in DML cells with their EMT.

In the vast majority of cellular processes, NOTCH utilizes a well-characterized "canonical" pathway initiated by the interaction of NOTCH with cell bound ligands (Delta-like or Jagged). This results in cleavage of NOTCH extracellularly by ADAM proteases, and intracellularly by the  $\gamma$ -secretase complex. This releases NICD, which translocates into the nucleus to interact with RBPJ, converting it into a potent transcriptional activator of downstream target genes<sup>6,7</sup>. One of the remarkable features of the kiss-and-run signaling was that the activation of myogenesis by NOTCH seemed independent of its transcriptional function. This was based on the observation that a membrane-tethered NOTCH Intracellular Domain (NICD) displayed similar activity on myogenesis than NICD, while constitutively active and dominant negative forms of the NOTCH effector RBPJ had no effect on this process. This led to the hypothesis that unconventional functions of NOTCH triggers early myogenesis<sup>5</sup>. Ligand- and transcription-independent functions of NOTCH have been reported in a growing number of cellular contexts and are collectively referred to as "non-canonical" NOTCH signaling<sup>8-10</sup>. In fact, NOTCH and WNT/ $\beta$ -catenin signaling are known to interact through non-canonical mechanisms during development and in pathological processes, but in all cases studied, both pathways act antagonistically<sup>11-15</sup>. In contrast, we found that NOTCH promotes the  $\beta$ -catenin-dependent activation of myogenesis in early somites, suggesting that an atypical interaction is at work between these two major signaling pathways to initiate the myogenic program in developing somites.

To decipher the molecular events taking place downstream of NOTCH activation, we focused our attention here on the mechanism inhibiting GSK-3 $\beta$  function. We demonstrated that *in vivo*, NICD, GSK3 $\beta$  and AKT work within a complex, in which AKT kinase activity is required to induce MYF5 expression, likely through its inhibitory role on GSK3 $\beta$ . Reinforcing this hypothesis, we found that SNAI1, a direct target of GSK3 $\beta$ , is a necessary step downstream of AKT in the chain of molecular events leading to myogenesis initiation. We observed that AKT negatively regulates NOTCH transcriptional activity, suggesting that the canonical and non-canonical NOTCH responses are mechanistically linked. Finally, we uncovered that all NOTCH receptors are able to activate MYF5 expression and we show that the RAM domain of NICD is necessary and sufficient in this process. Altogether these data shed a novel light on the molecular mechanisms whereby NOTCH regulates early myogenic differentiation in vertebrates and suggests that such signaling module could be active in a number of cellular contexts.

## RESULTS

### All four NOTCH receptors are capable of activating MYF5 expression

There are four NOTCH receptors in the mouse genome, while only three have been detected in the chicken genome<sup>7,16</sup>. Since all receptors share similar canonical functions (e.g. complex formation with the transcription factor RBPJ), it is plausible that they could also share non-canonical, cytoplasmic activities when placed in similar cellular contexts.



We speculated that the electroporation of early somites could serve as an experimental paradigm where this hypothesis could be tested. NOTCH1 was previously identified as the endogenous receptor responsible for triggering MYF5 (and MYOD) expression in the DML of chicken embryos through a transcription-independent mechanism<sup>4</sup>. We therefore used the induction of MYF5 expression as a read-out of the ability of other NOTCH receptors to display similar non-canonical functions. We electroporated the constitutively active forms of all four mouse NOTCH (mNICD1-4) in newly formed somites. The chicken NICD1 (cNICD1) served as positive control while the electroporation vector alone (H2B-RFP) served as negative control (indicative of MYF5 expression in normal condition). Six hours later, we analyzed those embryos and we compared the expression of MYF5 in the DML of embryos electroporated with these constructs to that of wild type (WT) embryos. We observed that all four NICD induced a robust activation of MYF5 expression (very similar to that of cNICD1, Figure 1 A-B), compared to controls. These data indicate that all NICDs share the same ability to activate myogenesis, likely through the signaling module that we previously uncovered, supporting the assumption that all NOTCH receptors display non-canonical function in specific cellular contexts.

#### **The RAM domain is necessary and sufficient for myogenic activation**

We then determined which of the NICD domains is responsible for its non-canonical function. NICD is composed of several domains, including the RAM (RBPJ Associated Module) domain, the 7 Tandem Ankyrin-like Repeats (ANK), the TAD (Trans-Activation Domain) and the PEST domain<sup>17</sup>. The RAM domain and ANK repeats are thought to be necessary for NOTCH signaling through the canonical (RBPJ-dependent) pathway<sup>18,19</sup>. The RAM domain presents high binding affinity for RBP-J and the ANK domain a low binding affinity for this molecule<sup>20,21</sup>. Since both domains are implicated in protein-protein interactions, we wondered whether they could be involved in the molecular events leading to the induction of myogenesis in the cytosol of DML cells. Since the TAD domain is not present in mNICD4 (Suppl. Figure 1A), while this molecule is capable of triggering myogenesis (see above), this excluded a role of TAD in early myogenesis. To test the function of the RAM and ANK domains, deletion constructs for each or both domains were generated and electroporated in DML cells of early chicken embryos (Suppl. Figure 1 B). Expression of MYF5 served as a read-out of their activity. As shown in Figures 2 A and D, the deletion of the RAM domain significantly decreased the number of MYF5<sup>+</sup> electroporated cells as compared to the WT NICD. In contrast, the deletion of the ANK repeats resulted in a percentage of MYF5<sup>+</sup> electroporated cells similar to that obtained with the WT NICD. Finally, RAM and ANK deletion presented a significant decrease in MYF5<sup>+</sup> cells, similar to that observed in the RAM-only mutant (Figures 2A and C).

Since we had previously shown that NICD or a membrane tethered NICD (CD4-NICD) comparably activate MYF5 expression in DML cells<sup>5</sup>, we tested whether the same would apply to the NICD deletion mutants. The fusion of CD4 to NICD results in a molecule that does not enter the nucleus and is unable to activate NOTCH reporters<sup>5</sup>. We found that the deletion of the RAM domain from the CD4-NICD abrogated the induction of MYF5 expression observed after electroporation of the CD4-NICD alone. On the contrary, the deletion of the ANK repeats had no effect (Suppl. Figure 2A and B). Together these results suggest that the RAM domain of NICD is necessary for activation



of myogenesis in the cytosol of DML cells of the chicken embryo.

We next determined whether the RAM domain is sufficient to induce MYF5 expression in DML cells. To demonstrate this, we constructed a plasmid that encodes only the RAM domain (Suppl. Figure 1B) and we electroporated it in DML cells. We observed that, compared to non-electroporated control embryos, the RAM domain was sufficient to increase the percentage of MYF5<sup>+</sup> cells to a similar level to that observed after electroporation of the WT NICD (Figure 2B and D).

Altogether, these results suggest that the RAM domain of NICD is necessary and sufficient to trigger the chain of molecular events leading to the induction of myogenesis in the chicken embryo. Since we have shown previously that RBPJ is not involved in myogenesis in the DML<sup>5</sup>, this suggests that the RAM domain of NICD likely interacts with other protein(s) in the cytosol to mediate its pro-myogenic activity.

### **NICD physically interacts with GSK3 $\beta$ and AKT in the cytoplasm of muscle progenitors.**

Using a reporter for GSK-3 $\beta$  activity, we have previously shown that both NICD and a membrane-tethered CD4-NICD induce a dramatic inhibition of GSK-3 $\beta$  activity<sup>5</sup>. Although previous studies suggested that GSK-3 $\beta$  binds to NOTCH to activate or inhibit its transcriptional activity<sup>22,23</sup>, the mechanism whereby NOTCH could regulate GSK-3 $\beta$  activity is unknown. As a first step towards this aim, we tested whether NICD and GSK-3 $\beta$  physically interact *in vivo*. We performed co-immunoprecipitation (co-IP) experiments on total protein extracts of somites electroporated with tagged (myc) NICD and CD4-NICD. To focus on primary events resulting from manipulations, we performed the analyses of embryos six hours after electroporation. About 40-50 electroporated embryos per condition were tested and the experiments were repeated 3 times. Protein extracts (1mg/lane) showed equivalent amounts of GAPDH protein in all samples (Figure 3A). Similar amounts of endogenous GSK-3 $\beta$  protein were also present in all protein extracts and the electroporated constructs (NICD and CD4-NICD) were also detected. Analysis of the immunoprecipitation showed that NICD and CD4-NICD co-precipitated with GSK3 $\beta$  (Figure 3B). Quantification of three independent co-IPs suggests that NICD physically interacts with GSK-3 $\beta$  in muscle progenitors present within the DML (Figure 3C).

Since NICD does not display any kinase activity to inhibit GSK-3 $\beta$ , it is unlikely that NICD directly regulates GSK-3 $\beta$  activity. Therefore, it is probable that another kinase(s) is responsible for this effect. A well-documented GSK-3 $\beta$  modulator is the serine threonine kinase AKT (also known as Protein Kinase B)<sup>24</sup>, which phosphorylates and inhibits GSK-3 $\beta$ , notably in response to growth factor stimulation or to G-protein-coupled receptor (GPCR) activation.

We first determined whether AKT is co-expressed with NOTCH at the triggering of myogenesis in developing embryos, i.e. in the medial border of the dermomyotome of newly formed somites (DML)<sup>4</sup>. As in mammals, 3 AKT homologs (1-3) are present in the chicken genome. We performed *in situ* hybridization with probes for AKT1-3 on developing embryos and we observed that AKT1 and 2 are expressed in the DML at the time that muscle progenitors are generated in this structure, supporting the possibility that this molecule could play a role in this process (Suppl. Figure XX).

We then investigated whether AKT protein interacts with NICD in the DML. To test this,



we performed co-IP experiments of somite extracts electroporated with the two NICD variants described above. To detect endogenous AKT, we used an antibody that recognizes all 3 AKTs. We observed that endogenous AKT co-immunoprecipitated with NICD and CD4-NICD, suggesting that NICD and AKT proteins physically interact within DML cells.

Together these results show that NICD directly interacts with GSK3 $\beta$  and AKT at the initial step of the signaling cascade leading to myogenesis. Given the reported inhibitory role of AKT on GSK3 $\beta$ , our results suggest that AKT mediates the GSK3 $\beta$  inhibition needed to trigger the signaling cascade for induction of myogenesis in the DML.

#### **AKT induces MYF5 expression in a kinase-dependent manner.**

If AKT were to inhibit GSK3 $\beta$  in the DML, modulating its activity should affect myogenesis. To test this we electroporated the DML of developing chicken embryos with a construct coding for a wild type or a constitutively active form of AKT (CA AKT). Quantification of the proportion of electroporated cells expressing MYF5 showed that both WT and CA AKT expression led to a robust increase in the proportion of MYF5-positive cells (about 75%, Figure 4). This increase was alike the effect obtained after NICD over-expression in DML cells (80%, see above and<sup>4</sup>). To verify that the kinase domain is required for this effect we electroporated a kinase-dead form of AKT. In this case, the number of MYF5-positive cells was comparable to control embryos. Altogether, these data suggest that the kinase activity of AKT controls the activation of MYF5 expression in the DML.

#### **AKT regulates myogenesis through SNAI1**

The result above is coherent with the hypothesis that AKT acts on GSK3 $\beta$ . However, AKT is a pleiotropic kinase with a multitude of known substrates. Therefore, it is possible that the activation of MYF5 expression we observed after activation of AKT was only partly due to its activity on GSK3 $\beta$ . To address this possibility, we tested whether blocking a downstream target of GSK3 $\beta$  would counteract the AKT-mediated activation of MYF5. A direct consequence of GSK3 $\beta$  inhibition in muscle progenitors is a stabilization of the transcription factor Snail1 (SNAI1)<sup>5</sup>. SNAI1 is a direct target of GSK3 $\beta$ <sup>25</sup> and SNAI1 stabilization is a necessary step for activation of MYF5 in the DML. We have co-electroporated AKT, together with a dominant-negative form of SNAI1 (DN SNAI1). We observed that the increase in MYF5 expression observed with AKT alone was abrogated when DN SNAI1 was co-expressed with AKT (Figure 5). This confirms SNAI1 activation is a necessary step downstream of AKT-mediated MYF5 expression, and altogether reinforces the hypothesis that AKT regulates GSK3 $\beta$  activity in the DML.

#### **AKT, independent of its kinase activity, negatively regulates NOTCH transcriptional function**

The data above strongly suggest that AKT is a novel component of the signaling module, upstream of SNAI1, which translates NOTCH activation by migrating DLL1-positive neural crest cells into the initiation of the myogenic program in DML cells. To test whether AKT may also regulate the canonical function of NOTCH, we co-electroporated increasing amounts of a tagged form of AKT together with a NOTCH reporter<sup>4</sup>. We



observed that the activity of the reporter decreased with the increasing quantity of AKT (Figures 6A and 6D). The decrease in NOTCH transcriptional activity is likely independent of AKT kinase activity, since the co-electroporation of a dominant-negative (DN, i.e. kinase-dead) and a constitutively active mutant forms of AKT led to a similar decrease in the NOTCH reporter activity (Figures 6B and 6E). Finally, we found that the NOTCH transcriptional activity was similarly decreased when membrane-tethered forms of AKT and DN AKT were electroporated in DML cells (Figures 6C and 6F). Altogether, these data suggest that the balance between the transcriptional and non-transcriptional activities of NOTCH is mechanistically linked in DML cells. The mechanism whereby this regulation may take place is yet to be uncovered, but our data suggest that it may be due to an interaction between NICD and AKT that takes place in the cytosol.

## DISCUSSION

The main purpose of this study was to obtain compelling evidence supporting the hypothesis that NOTCH plays non-canonical (cytoplasmic, transcription-independent, ligand-dependent) functions in the DML. The demonstration that NOTCH, AKT and GSK3 $\beta$  physically interact in the cytosol of DML cells provides direct evidence for a role of NICD in the cytoplasm of those cells. It also identifies the binding of GSK3 $\beta$  to NOTCH as the initiating event, immediately downstream of NOTCH activation, in the signaling module leading to the initiation of MYF5 expression in this tissue. The identification of AKT in a protein complex with NOTCH suggests a possible mechanism whereby NOTCH could inhibit GSK3 $\beta$  activity: GSK3 $\beta$  being a major target of AKT<sup>24</sup>, it is tempting to postulate that its activity is inhibited by AKT within a protein complex encompassing all three molecules. The observation that SNAIL1 activation is a necessary step downstream of GSK3 $\beta$  and AKT further supports a model whereby AKT regulates myogenesis in the DML solely through its action on GSK3 $\beta$ .

AKT is itself activated by the stimulation of receptor tyrosine kinases (RTK) or G-protein-coupled receptors (GPCR). Binding to their cognate ligand leads to plasma membrane recruitment and activation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) that in turn activates AKT<sup>26</sup>. The uncovering that AKT plays a role in the signaling module triggering myogenesis therefore suggests that additional inputs from RTKs and/or GPCRs into the pathway leading to the activation of the myogenic program may play a role during this process. The nature of this signal(s) is only speculative at this point. Intriguingly, many FGFs (which signal through FGFR1-4 RTKs) are robustly expressed by the growing myotome and they were shown to trigger, through a poorly characterized mechanism, a SNAIL1-dependent EMT of the overlying dermomyotome in early chicken somites<sup>27</sup>. Since SNAIL1 is also a crucial component of the signaling module leading to the initiation of myogenesis in DML cells, it is plausible that SNAIL1 in the DML is receptive to FGFs secreted by the adjacent myotome. It was also suggested that Sonic Hedgehog (SHH, whose role in early myogenesis has been debated<sup>30</sup>) activates AKT phosphorylation and that AKT phosphorylation is required for SHH signaling<sup>28,29</sup>. A tempting hypothesis is therefore that in the DML, SHH and/or FGFs synergize with NOTCH signaling *via* AKT to trigger early myogenic differentiation.

The observation that the NICDs of all four NOTCH receptors similarly activate myogenesis in the DML strongly suggests that they do so through similar, non-canonical mechanisms. The widespread expression of AKT, GSK3 $\beta$  and the NOTCH receptors



suggests that similar interactions between those molecules could take place in many cellular contexts where cell fate changes are associated with an EMT.

In conclusion, this study provides novel evidence for a transcription-independent function for NICD in somites and establishes AKT as a novel key player in the signaling cascade that leads to the formation of the early myotome in vertebrates

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Electroporation**

The somite electroporation technique that was used throughout this study has been described elsewhere<sup>2-4,34</sup>. Briefly, we targeted the expression of various constructs to the dorso-medial portion of newly formed interlimb somites of Hamburger–Hamilton (HH<sup>35</sup>) stage 15–16 chick embryos (24–28 somites). We have previously shown that this technique allows the specific expression of cDNA constructs in the DML, and that fluorescent reporters (e.g. GFP) are detected 3 hr after electroporation in this structure<sup>36</sup>. We have analyzed all embryos 6 hrs after electroporation, implying that the molecules under study here have been acting during a narrow timeframe (about 3 hrs).

### **Expression constructs**

*The following constructs have been previously published:*

The CAGGS-H2B–RFP (provided by Dr. S. Tajbakhsh<sup>4</sup>) contains a fusion of Histone 2B with RFP, downstream of the CAGGS strong ubiquitous promoter (CMV/chick  $\beta$ -actin promoter/enhancer).

The CAGGS–EGFP<sup>4</sup> contains the CAGGS promoter followed by the EGFP reporter gene.

The dominant negative form of SNAI1 consists of the chicken SNAI1, in which the repressor domain was replaced by the VP16 activator domain of the Herpes simplex virus<sup>27</sup>.

CAGGS HA-NICD-6xMyc contains the chicken NICD flanked with HA and 6xMyc downstream of the CAGGS promoter<sup>4</sup>.

The GSK3 biosensor (pCS2 GFP-GSK3-MAPK, Addgene #29689) contains a CMV promoter upstream of a GFP molecule followed by a polypeptide tail that contains 3 GSK-3 $\beta$  phosphorylation sites, a priming site for MAPK/Erk and a site for the binding of E3 polyubiquitin ligases<sup>37</sup>.

HES1–d2EGFP (provided by Dr. R. Kageyama) contains the HES1 mouse promoter followed by a destabilized d2EGFP<sup>38</sup>.

The membrane tagged NICD was constructed using Gibson assembly (NEB) with the signal peptide FGFR2 (from *Danio rerio*), the extracellular and transmembrane domain



of human CD4 (both obtained from Dr. J Kaslin) followed by the HA tagged NICD previously described, cloned either into the bidirectional vector tetracycline responsive vector or into the pCX-Myc described above.

The H2B-BFP has been made by replacing the RFP from the CAGGS-H2B-RFP described above by a TagBFP (Evrogen) <sup>5</sup>.

CAGGS-BFP has been made by cloning the TagBFP (Evrogen) into the pCAGGS vector.

*The following plasmids were constructed:*

The four mouse NICD have been made by cloning them (addgene 20183, 20184, 20185 and 20186) by Gibson simple fragment assembly with pCAAGS HA-NICD-6xMYC described in<sup>4</sup> as a backbone opened with ClaI and BglII.

The delta NICD and the RAM domain have been constructed according to the description domains of<sup>39</sup>, by deletion of the pCAAGS HA-NICD described in<sup>5</sup> with a Gibson double fragment assembly with the XbaI enzyme.

The delta DC4-NICD have been constructed as the delta NICD, using the pCAAGS HA-NICD-6xMYC<sup>5</sup> as a backbone.

The AKT variants have been constructed by Gibson simple fragment assembly with pCAAGS HA-NICD-6xMyc described in<sup>4</sup> as a backbone, open with ClaI and EcoRI. The AKT variants come from addgene 39531, 16243 and 17245.

The CD4-AKT variants have been constructed as the AKT variants, using the pCAAGS HA-NICD-6xMYC<sup>5</sup> as a backbone.

### **Immunohistochemistry**

Whole-mount antibody staining was performed as described<sup>3</sup>. The following antibodies were used: rabbit polyclonals directed against chick myogenic regulatory factor MYF5 (obtained from Dr. B. Paterson<sup>40</sup>; 1/200); and anti-RFP (Abcam #62341, 1/1000); chicken polyclonal antibody against EGFP (Abcam #13970, 1/1000). Mouse monoclonal antibodies against c-myc-tag (Abcam #32072, 1/200), HA-tag (CST, #2367S, 1/100).

### **Confocal analyses**

Dorsal views of somites shown in all figures are projections of stacks of confocal images taken using a 4-channel Leica SP5 confocal microscope (Leica). Confocal stacks of images were visualized and analyzed with the Imaris software suite (Bitplane). Cell counting was performed using the cell counter plugin (Kurt De Vos, University of Sheffield) within the ImageJ software<sup>41</sup>.



### **Quantifications and statistical analyses**

Electroporation results in the transfection of a portion of the targeted cell population, which is variable from embryo to embryo. To precisely evaluate the phenotypes obtained after electroporation of cell-autonomously acting cDNA constructs, the number of positive cells was compared to the total number of electroporated cells, recognized by an internal fluorescent reporter construct. On average, more than 700 cells were counted per point and the corresponding quantifications are shown in all figures.

To determine the fluorescence intensity of electroporated cells, the surface of electroporated cells were rendered manually with Imaris software. The mean intensity for each cell and each channel in three-dimensions was collected for statistical analyses.

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software. Mann–Whitney non-parametric two-tail testing was applied to populations to determine the P values indicated in the figures. In each graph, columns correspond to the mean and error bars correspond to the standard deviation. \*\*\*p value < 0.001, extremely significant; \*\*p value 0.001 to 0.01, very significant.

### **Co-Immunoprecipitation**

Two and a half days old non-electroporated (WT) chick embryos or DML electroporated with HA-NICD-6xcMyc (NICD) or HA-CD4-NICD-6xcMyc (CD4-NICD) were incubated for 6hrs at 37°C. After screening, somites of approximately 40 embryos per condition containing electroporated (NICD and CD4-NICD) and non-electroporated (WT) DML cells were mechanically dissected under the microscope, homogenized using 26 gauge syringes and lysed for 1h at 4°C using lysis buffer present in the coIP kit (Active Motif Co-IP kit). Cell Lysates were then centrifuged for 10min at 4°C at 14000 rpm and supernatants were dosed using Bio-Rad DC protein assay (DC protein assay kit, Bio-Rad, 500-0116). Cell lysates were subjected to co-IP experiment as described by Active Motif universal Magnetic coIP Kit (ref: 54002). Briefly, 1mg of total protein extracts were incubated with c-Myc antibody O/N at 4°C. The next day, 30uL of Magnetic beads were added to the mix and incubated for 1hr at 4°C. Negative control consists of NICD or CD4-NICD electroporated lysates with only magnetic beads addition. Afterward, beads were collected using a magnetic stick and supernatants were removed. The beads were washed for up to 5 times using the Co-IP/ wash Buffer in the Kit. Lastly, beads were resuspended with 2X Laemmli loading buffer and heated for 10min at 95°C before migration on a 10% SDS-page gel and transfer into a PVDF membrane (Millipore, IPVH00010) for western blot analysis.

### **Western blot**

For co-IP inputs lanes, 30 µg of total protein extract samples and co-IP eluates resuspended with 2x Laemmli buffer were separated on a 10% SDS-PAGE gel, then transferred onto PVDF Immobilon-P membranes (Millipore, IPVH00010). After transfert, membranes were blocked with 5% of non-skimmed milk diluted in TBS-T (Tris-buffered saline (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) + 0.1% Tween 20) and



incubated overnight at 4°C with 1/1000 diluted primary antibodies including c-Myc (abcam; ab-32), GSK3β (cell signaling technology; cs-9832), AKT (cell signaling technology; cs-9272S) and GAPDH (cell signaling technology; cs-2118). Membranes were washed 3 times in TBS-T for 15 min and incubated for 1 hour at RT with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1/10 000). After 3 washes of 5 minutes each in TBS-T, membranes were incubated with enhanced chemiluminescence reagents (Amersham ECL Prime, GE Healthcare; Ref: RPN2232) and revealed by Chemiluminescence detecting machine from Thermo Electron Corporation (serial number: 392-562L (RS232C)).

### FIGURE LEGENDS

**Figure 1: all NOTCH receptors activate MYF5 expression.** (A) confocal stacks of somites after electroporation of the four mouse NICD isoforms (in green) and an electroporation marker (in red). MYF5 is shown in blue. Dotted lines delineate the borders of the DML. Scale bars: 50μm. (B) bar chart showing the percentage of electroporated MYF5<sup>+</sup> cells compared to the total number of electroporated cells. \*\*\*:P<0,001 31,7% of cells electroporated only with the electroporation marker express MYF5. 78,7% the cells electroporated with chicken NICD express MYF5 and respectively 76,2%, 77,5%, 77,6% and 75,1% of the cells electroporated with the isoforms 1 to 4 of the mouse NICD express MYF5.

**Figure 2: the NOTCH RAM domain is necessary and sufficient to induce Myf5 expression.** (A) Confocal stacks of somites after electroporation of mutant forms of cNICD1 (in green) together with an electroporation marker (in red). MYF5 expression is shown in blue. (B) Confocal stacks of somites after electroporation of either cNICD1 or the RAM domain of cNICD1 (in green), together with an electroporation marker (in red). MYF5 expression is shown in blue. (C) Bar charts showing the percentage of electroporated MYF5<sup>+</sup> cells. 29,0% of electroporated cells express MYF5 in controls, 79,0% with chicken NICD and 80,8% with the RAM. (D) Bar charts showing the percentage of electroporated MYF5<sup>+</sup> cells. 28,0% of electroporated cells express MYF5 in controls, 71,9% with NICD and 36,7%, 71,9, and 41,4% with i) a NICD missing the RAM domain; ii) a NICD missing the ANK domain; iii) a NICD missing the RAM and the ANK domains. \*\*\*:p<0,001. Scale bars: 50μm. Dotted white lines indicate the borders of the dorsomedial lip of the somite.

**Figure 3: NICD physically interacts with GSK3β and AKT in the cytoplasm of muscle progenitors.** Co-IP of endogenous GSK3β and endogenous AKT by exogenously expressed, tagged NICD and membrane tethered (CD4-)NICD. (A) Detection of GSK3β and AKT in total protein extracts (1mg) of DML electroporated with controls (WT), NICD and CD4-NICD plasmids. (B) 30 μg of the protein extract were used for coIP with c-Myc antibody and reacted with GSK3β and AKT antibodies. Negative control lane is a test of the co-IP beads specificity: NICD electroporated extract, no c-Myc antibody, and reacted with Magnetic coIP beads. (C) Bar charts representing the results (measured in bands intensities) of 3 coIP experiments (as shown in B). GSK3β (dark grey) and AKT (light grey).



**Figure 4: Akt induces myogenesis in a kinase-dependent manner.** (A) Confocal stacks of somites after electroporation of NICD or several AKT variants (in red) together with a nuclear electroporation marker (in blue). MYF5 expression is shown in grey. (B) Bar chart showing the percentage of electroporated MYF5<sup>+</sup> cells in the DML. Controls electroporated with the marker (31,0% of electroporated cells express MYF5); 81,9% MYF5<sup>+</sup> with NICD and 76,8%, 76,9, and 41,7% were MYF5<sup>+</sup> after electroporation of ATK, Myr-AKT (CA) and DN-AKT. \*\*\*: p<0,001. Scale bars: 50μm. Dotted white lines indicate the borders of the DML.

**Figure 5: AKT regulates myogenesis through SNAI1 stabilization.** (A) Confocal stacks of somites 6h after electroporation of AKT (in red), a dominant negative form of SNAI1<sup>27</sup> (in green) or both plasmids, together with an electroporation marker (blue). MYF5 is shown in grey. Dotted white lines indicate the borders of the DML. Scale bars: 50μm. (B) Bar chart showing the % of electroporated MYF5<sup>+</sup> cells. Controls: 26,0% MYF5<sup>+</sup>; AKT 71,2% MYF5<sup>+</sup>; DN-SNAI1, 13,6% MYF5<sup>+</sup>; AKT & DN-SNAI1, 21,2% MYF5<sup>+</sup>. \*\*\*: p<0,001.

**Figure 6: AKT negatively regulates NOTCH transcriptional function, independently of its kinase activity.** (A, C, E) Confocal stacks of somites after electroporation of several variants of AKT (in red), a reporter of NOTCH transcriptional activity (Hes1-d2eGFP<sup>4</sup>, in green) and an electroporation marker (in blue). Dotted lines indicate the borders of the DML. Scale bars: 50μm. (A) Increasing amounts of AKT. (C) Electroporation of AKT, constitutively active (Myr)AKT, and dominant negative (DN)AKT. (E) Electroporation of membrane tethered (CD4-) AKT or DN-AKT. (B) Bar charts showing the decreasing transcriptional activity of NOTCH with increasing amounts of exogenous AKT. Relative intensities (in U.A.): 1884 in controls (no AKT); 1254 with 0,5μg/μL AKT; 937 with 1μg/μL; 517 with 3μg/μL. (D) Bar charts showing that 27,1% of DML cells electroporated with WT-AKT express the NOTCH reporter; 26,4% NOTCH reporter<sup>+</sup> cells with DN-AKT; 22,0% NOTCH reporter<sup>+</sup> cells with CA-AKT; in controls, 48,1% NOTCH reporter<sup>+</sup> cells. (F) Bar charts showing 27,5% NOTCH reporter<sup>+</sup> cells with CD4-AKT; 25,2% NOTCH reporter<sup>+</sup> cells with CD4-DN-AKT; and 45,7% NOTCH reporter<sup>+</sup> cells in controls. \*\*\*: p<0,001; \*\*: p<0,005.

## REFERENCES

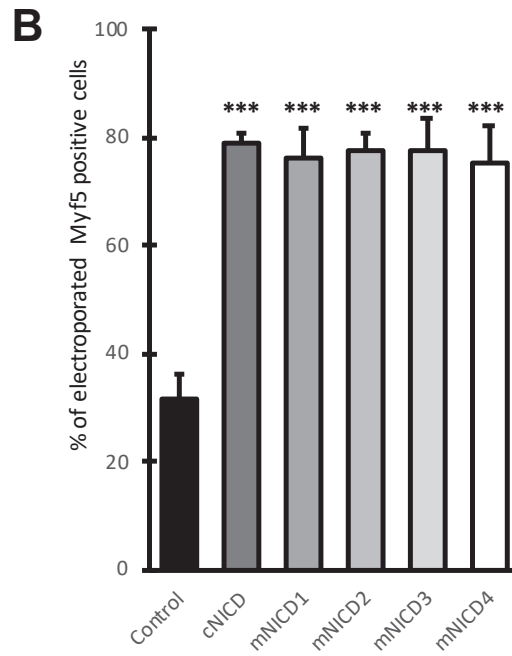
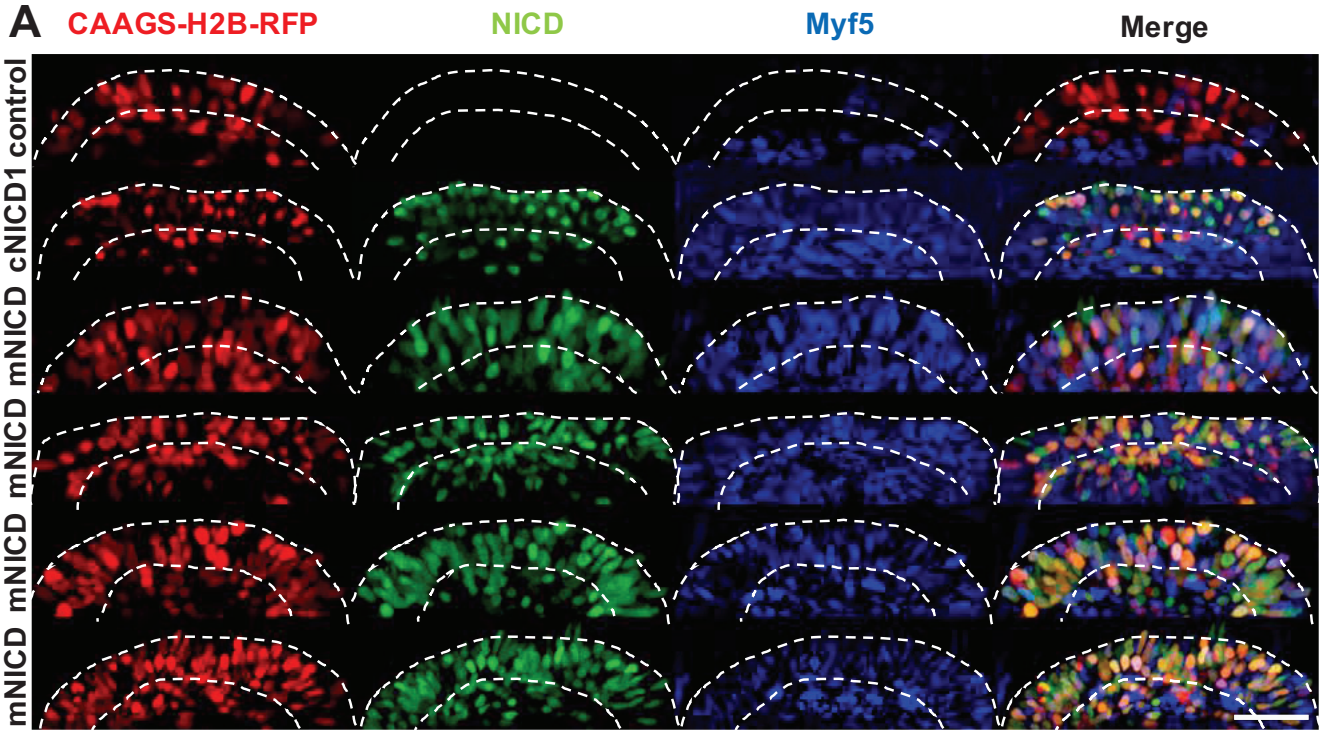
1. Denetclaw, W. F., Christ, B. & Ordahl, C. P. Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Development* **124**, 1601–10 (1997).
2. Gros, J., Scaal, M. & Marcelle, C. A two-Step mechanism for myotome formation in chick. *Dev. Cell* **6**, (2004).
3. Gros, J., Serralbo, O. & Marcelle, C. WNT11 acts as a directional cue to organize the elongation of early muscle fibres. *Nature* **457**, (2009).
4. Rios, A. C., Serralbo, O., Salgado, D. & Marcelle, C. Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH. *Nature* **473**, (2011).



5. Sieiro, D., Rios, A. C., Hirst, C. E. & Marcelle, C. Cytoplasmic NOTCH and membrane-derived  $\beta$ -catenin link cell fate choice to epithelial-mesenchymal transition during myogenesis. *Elife* **5**, (2016).
6. Kopan, R. & Ilagan, M. X. G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* **137**, 216–233 (2009).
7. Hori, K., Sen, A. & Artavanis-Tsakonas, S. Notch signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **126**, 2135–2140 (2013).
8. Ayaz, F. & Osborne, B. A. Non-Canonical Notch Signaling in Cancer and Immunity. *Front. Oncol.* **4**, (2014).
9. Andersen, P., Uosaki, H., Shenje, L. T. & Kwon, C. Non-canonical Notch signaling: Emerging role and mechanism. *Trends in Cell Biology* **22**, 257–265 (2012).
10. D'Souza, B., Meloty-Kapella, L. & Weinmaster, G. *Canonical and non-canonical notch ligands. Current Topics in Developmental Biology* **92**, (2010).
11. Collu, G. M. *et al.* Dishevelled limits Notch signalling through inhibition of CSL. *Development* **139**, 4405–4415 (2012).
12. Kwon, C. *et al.* Notch post-translationally regulates beta-catenin protein in stem and progenitor cells. *Nat Cell Biol* **13**, 1244–1251 (2011).
13. Acosta, H., Lopez, S. L., Revinski, D. R. & Carrasco, A. E. Notch destabilises maternal  $\beta$ -catenin and restricts dorsal-anterior development in Xenopus. *Development* **138**, 2567–2579 (2011).
14. Munoz-Descalzo, S., Tkocz, K., Balayo, T. & Arias, A. M. Modulation of the ligand-independent traffic of Notch by Axin and Apc contributes to the activation of Armadillo in Drosophila. *Development* **138**, 1501–1506 (2011).
15. Sanders, P. G. T. *et al.* Ligand-independent traffic of notch buffers activated armadillo in Drosophila. *PLoS Biol.* **7**, (2009).
16. Bray, S. J. Notch signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**, 722–735 (2016).
17. Lubman, O. Y., Korolev, S. V. & Kopan, R. Anchoring Notch genetics and biochemistry: Structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data. *Molecular Cell* **13**, 619–626 (2004).
18. Nofziger, D., Miyamoto, A., Lyons, K. M. & Weinmaster, G. Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development* **126**, 1689–702 (1999).
19. Shawber C *et al.* Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* **122**, 3765–3773 (1996).
20. Tamura, K. *et al.* Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* **5**, 1416–1423 (1995).
21. Roehl, H., Bosenberg, M., Blemloch, R. & Kimble, J. Roles of the RAM and ANK domains in signaling by the C. elegans GLP-1 receptor. *Embo J.* **15**, 7002–7012 (1996).
22. Espinosa, L., Inglés-Esteve, J., Aguilera, C. & Bigas, A. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J. Biol. Chem.* **278**, 32227–32235 (2003).
23. Foltz, D. R., Santiago, M. C., Berechid, B. E. & Nye, J. S. Glycogen synthase

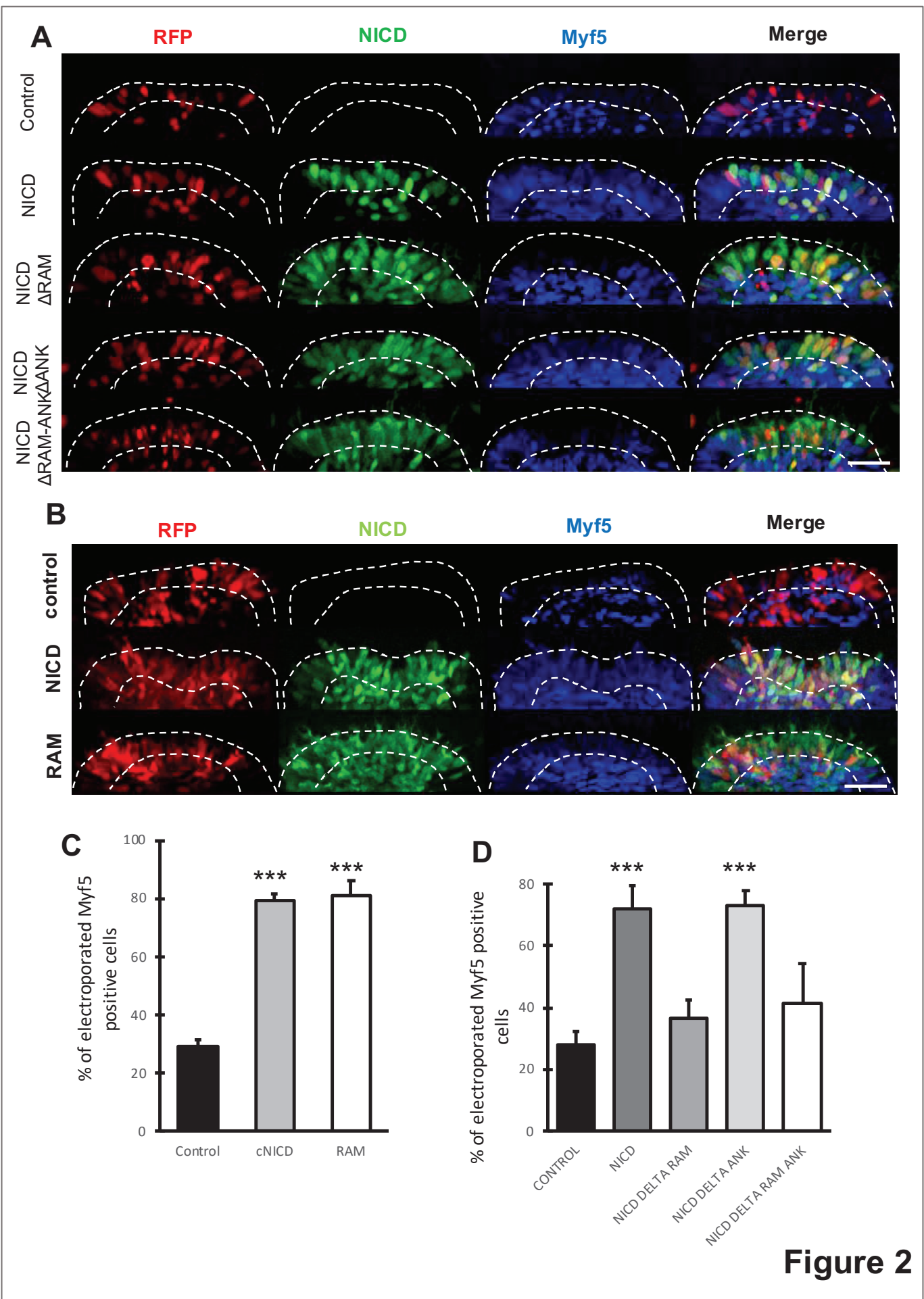


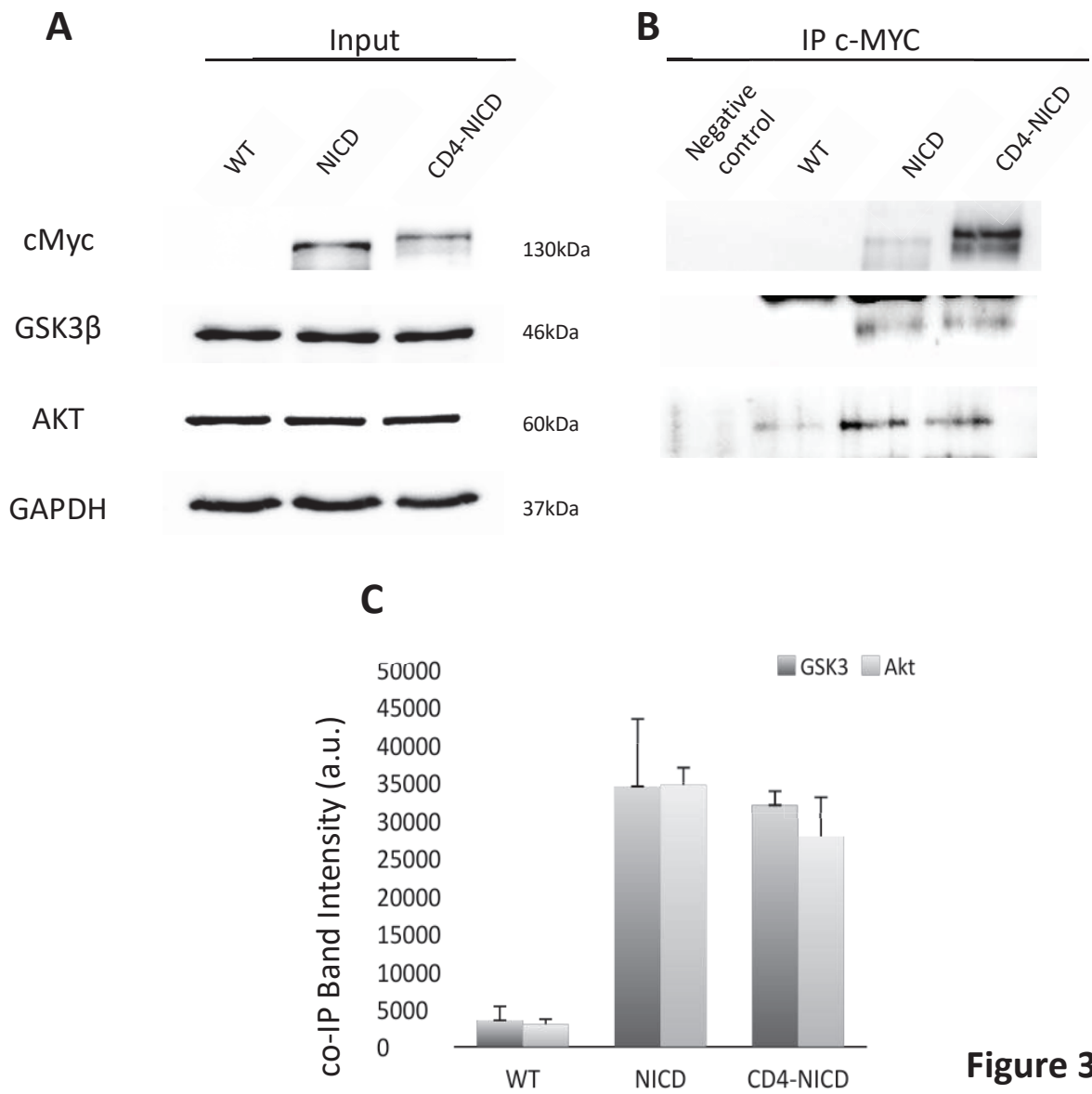
- kinase-3beta modulates notch signaling and stability. *Curr. Biol.* **12**, 1006–1011 (2002).
24. Cross, D. a, Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. a. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785–9 (1995).
  25. Zhou, B. P. *et al.* Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* **6**, 931–40 (2004).
  26. Manning, B. D. & Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **169**, 381–405 (2017).
  27. Delfini, M.-C. *et al.* The timing of emergence of muscle progenitors is controlled by an FGF/ERK/SNAI1 pathway. *Dev. Biol.* **333**, (2009).
  28. Riobó, N. A., Lu, K., Ai, X., Haines, G. M. & Emerson, C. P. Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4505–10 (2006).
  29. Elia, D., Madhala, D., Ardon, E., Reshef, R. & Halevy, O. Sonic hedgehog promotes proliferation and differentiation of adult muscle cells: Involvement of MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1438–46 (2007).
  30. Münsterberg, A. E., Kitajewski, J., Bumcrot, D. A., McMahon, A. P. & Lassar, A. B. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev.* **9**, 2911–2922 (1995).
  31. Bassel-Duby, R. & Olson, E. N. Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 19–37 (2006).
  32. Lai, K.-M. V. *et al.* Conditional Activation of Akt in Adult Skeletal Muscle Induces Rapid Hypertrophy. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9295–9304 (2004).
  33. Rommel, C. *et al.* Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1009–1013 (2001).
  34. Gros, J., Manceau, M., Thomé, V. & Marcelle, C. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* **435**, (2005).
  35. Hamburger, V. & Hamilton, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev. Dyn.* **88**, 49–92 (1951).
  36. Scaal, M., Gros, J., Lesbros, C. & Marcelle, C. In Ovo Electroporation of Avian Somities. *Dev. Dyn.* **229**, (2004).
  37. Taelman, V. F. *et al.* Wnt signaling requires sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* **143**, 1136–1148 (2010).
  38. Ohtsuka, T. *et al.* Visualization of embryonic neural stem cells using Hes promoters in transgenic mice. *Mol. Cell. Neurosci.* **31**, 109–122 (2006).
  39. Aster, J. C. *et al.* Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7505–7515 (2000).
  40. Manceau, M. *et al.* Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. *Genes Dev.* **22**, (2008).
  41. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671–675 (2012).



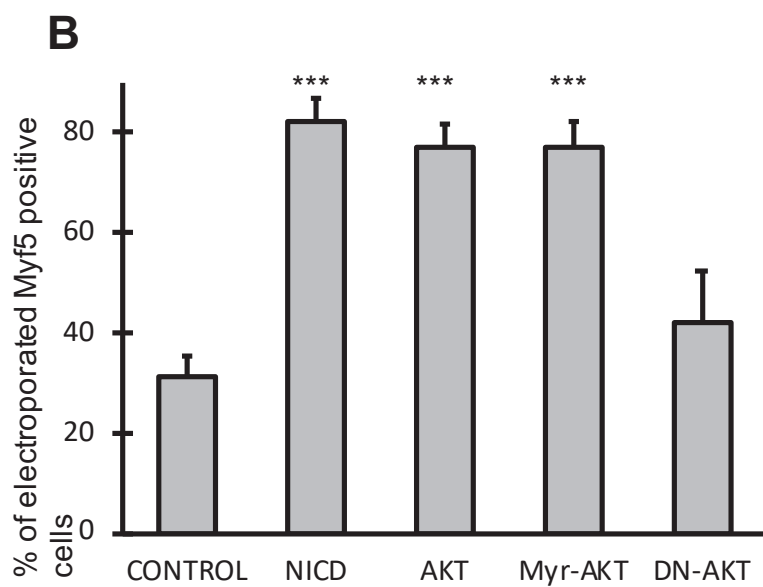
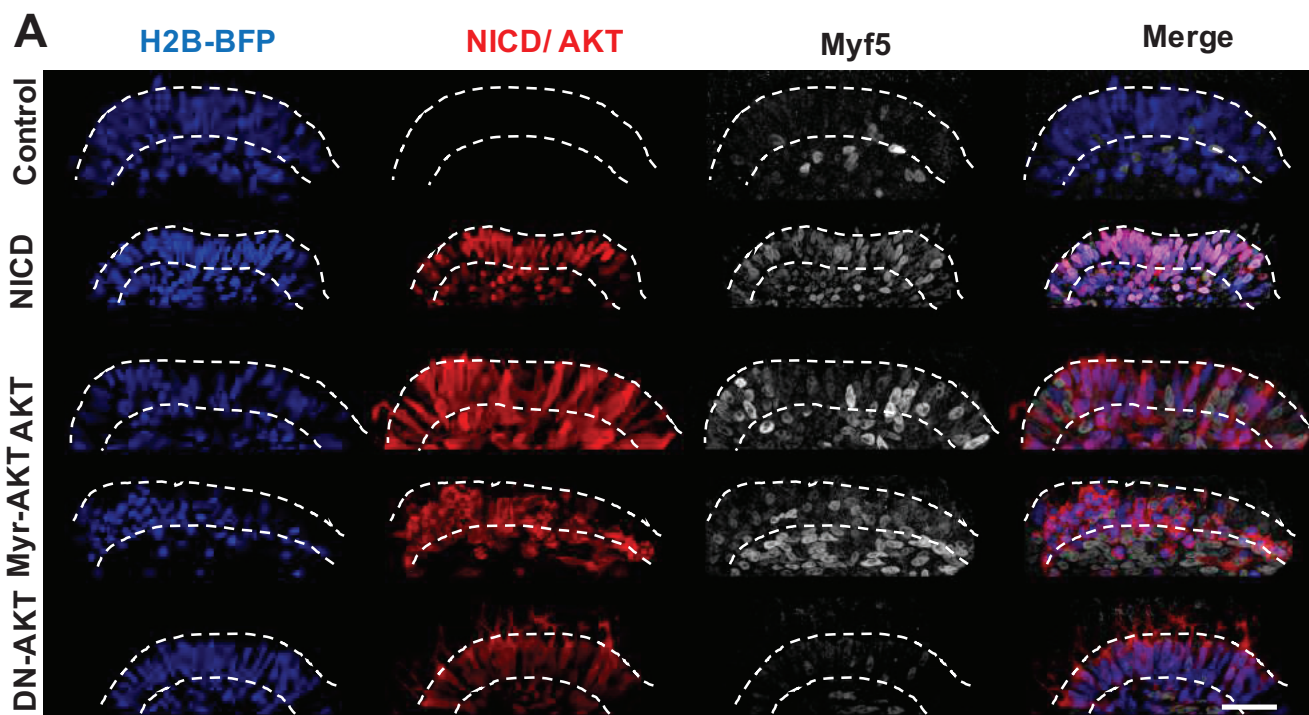
**Figure 1**



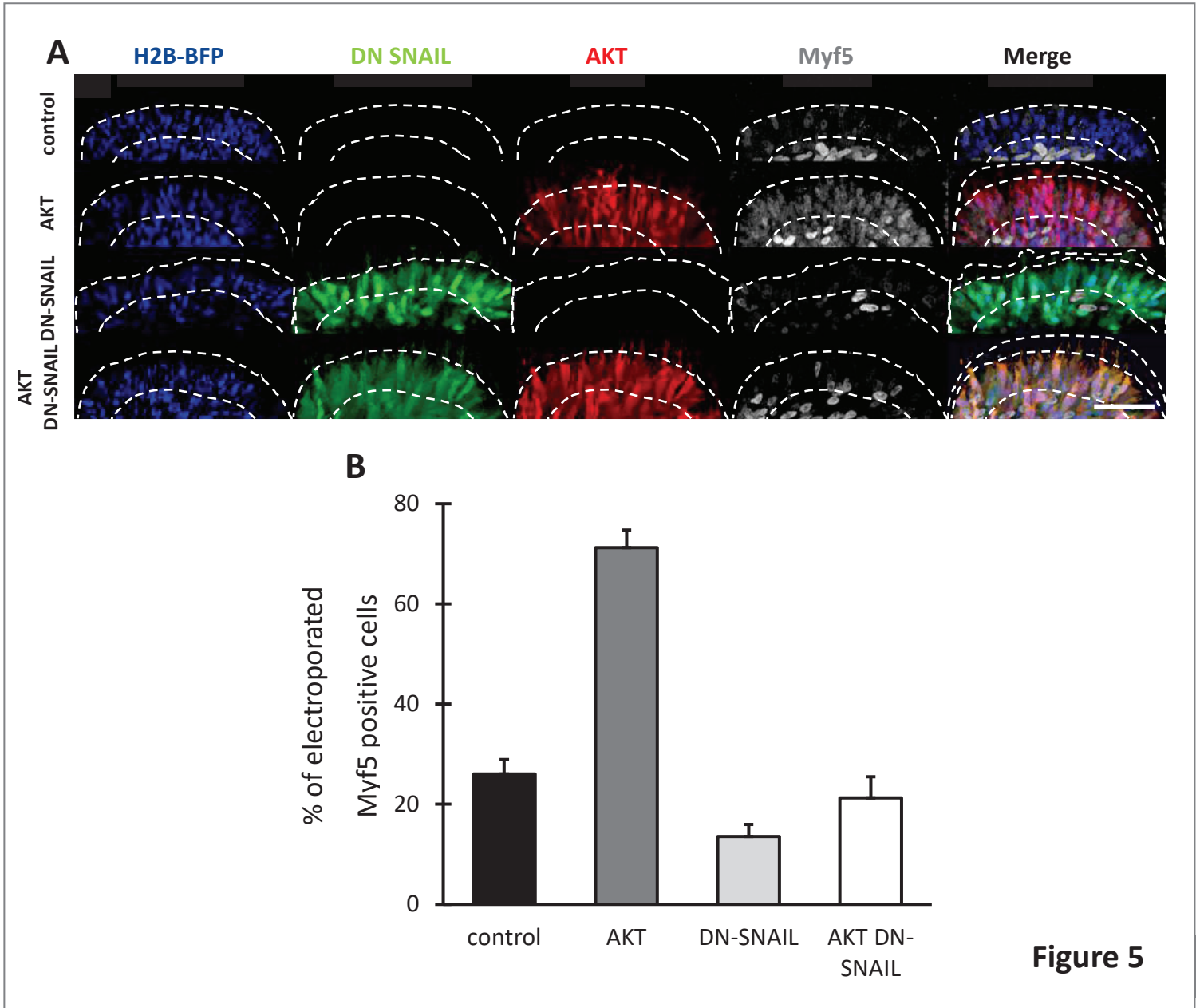




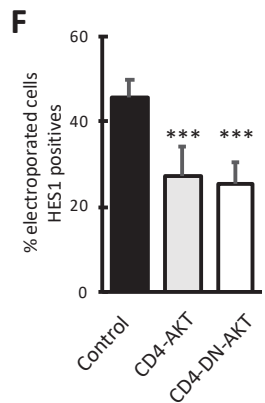
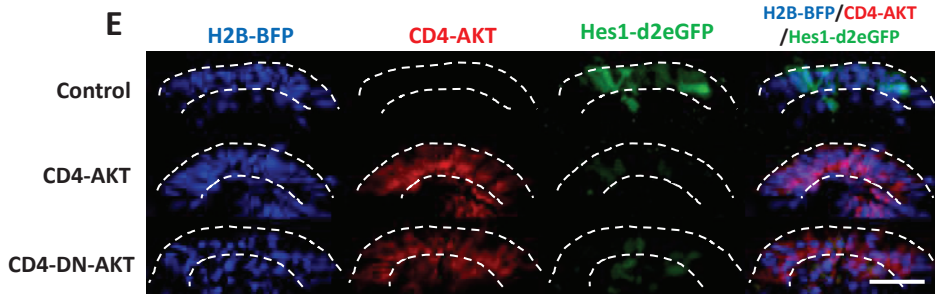
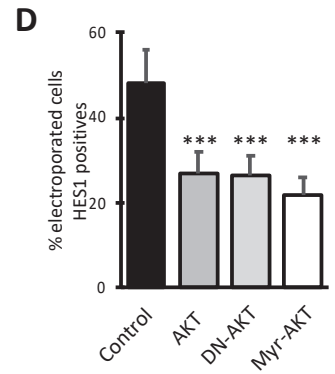
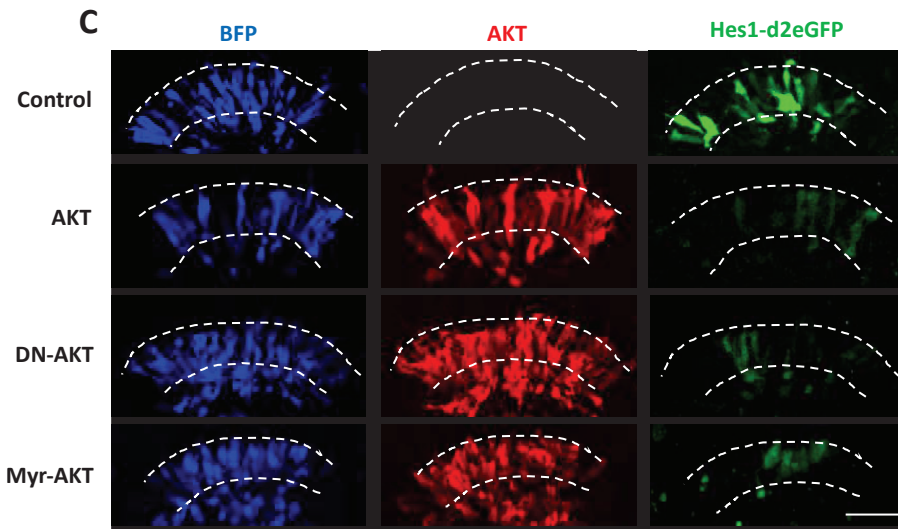
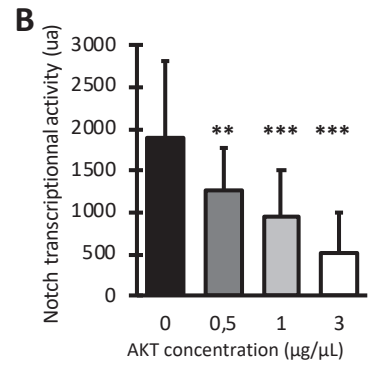
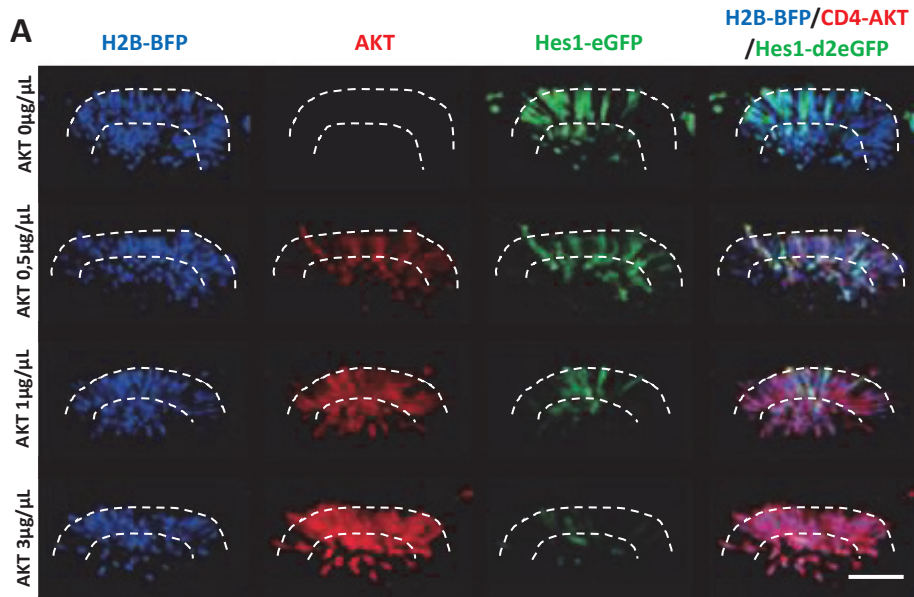
**Figure 3**



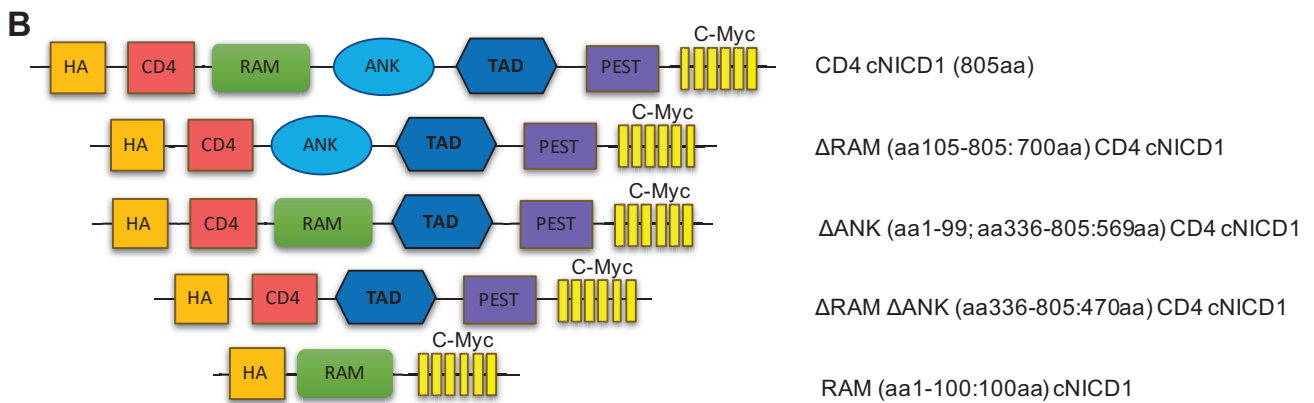
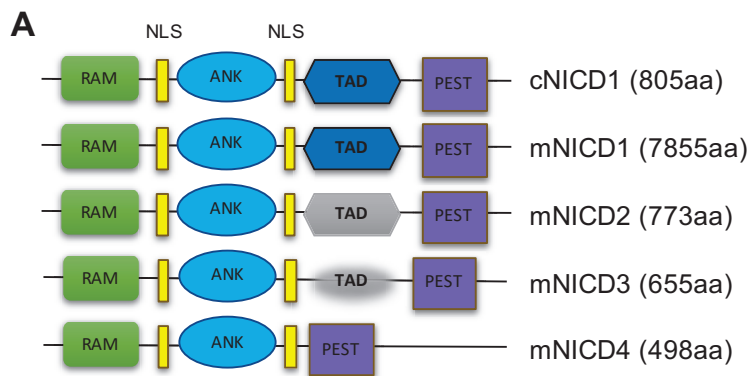
**Figure 4**



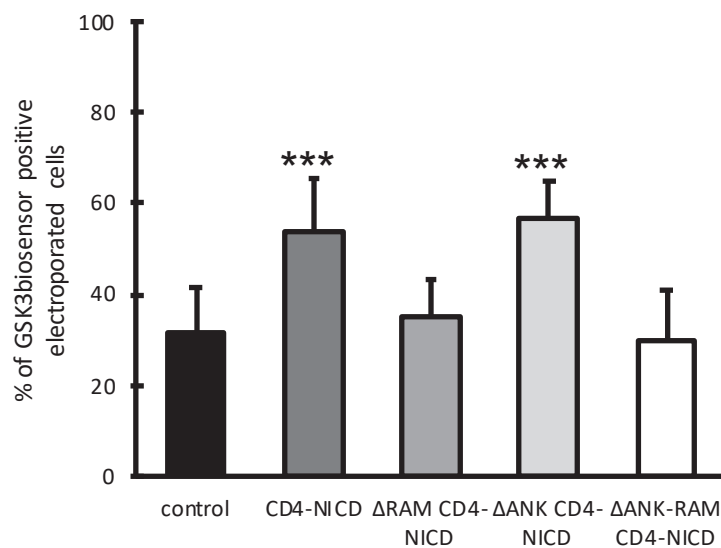
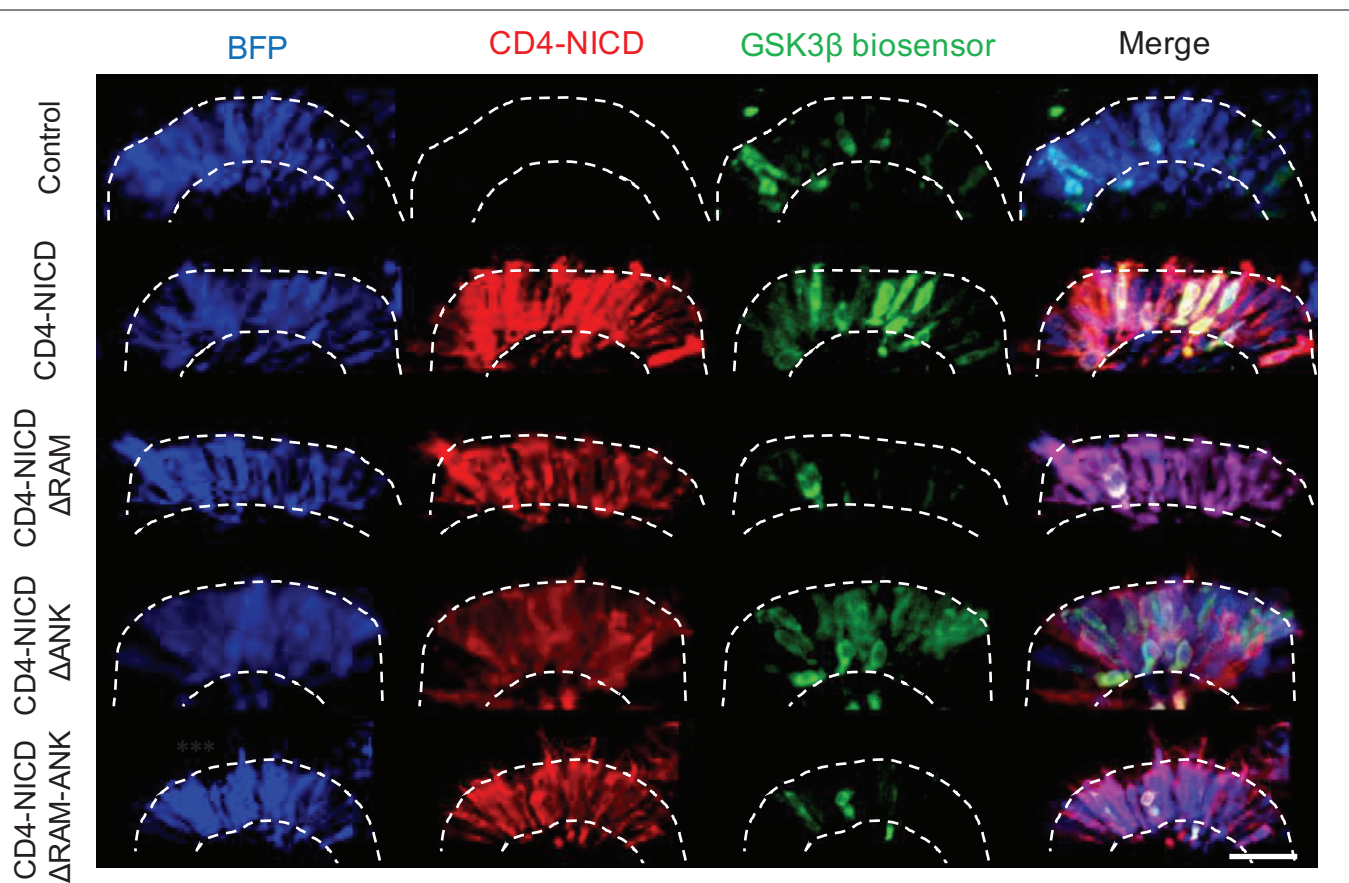




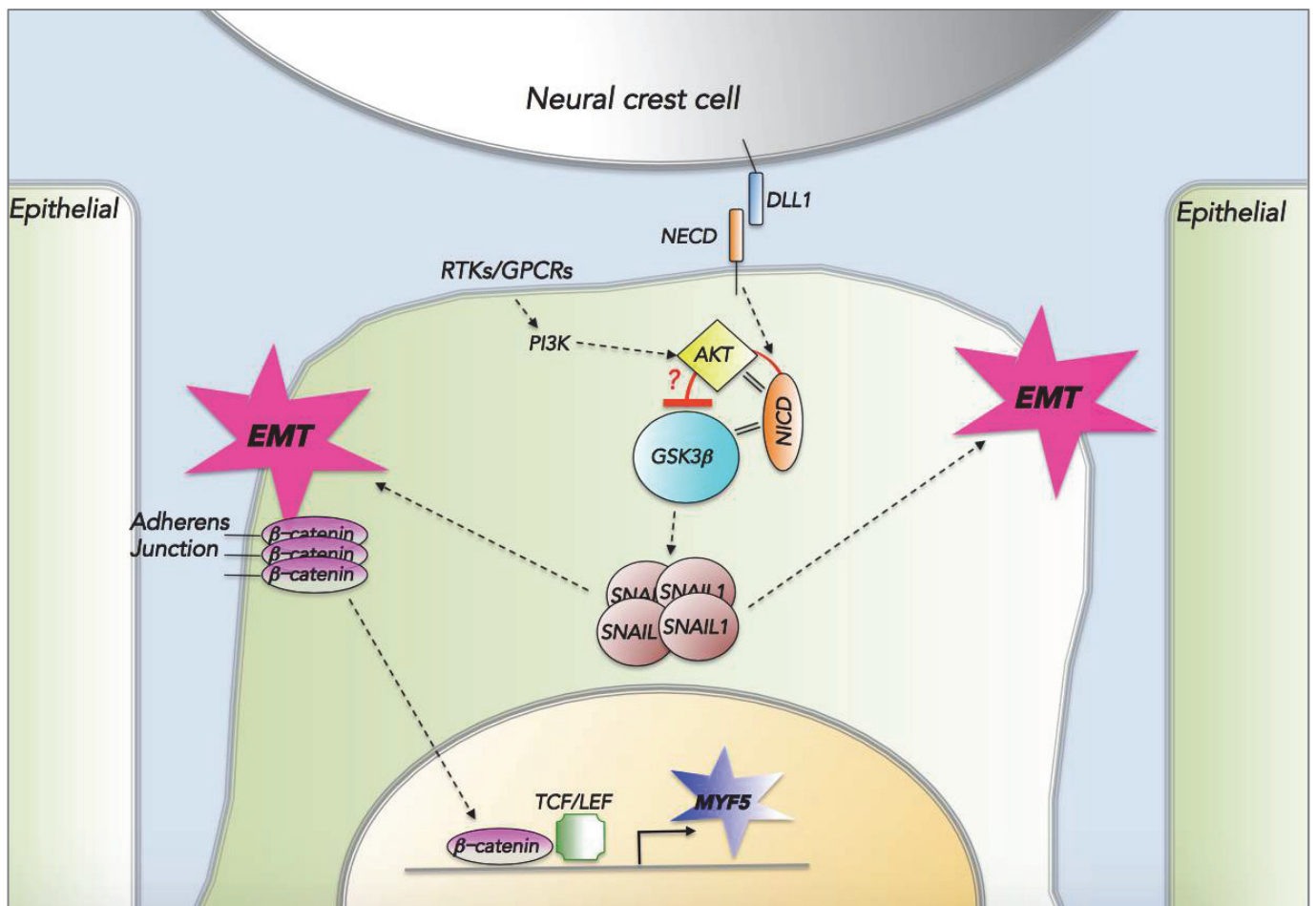
**Figure 6**



**Supplementary figure 1**



Supplementary figure 2





# **V Discussion**

*« Demain, dès l'aube... »*

*Victor Hugo*

## V.A Généralisation de la voie Notch cytoplasmiques aux cellules des crêtes neurales

### V.A.1 CD4-NICD inhibe GSK3 $\beta$ plus rapidement que NICD

Afin de démontrer que la voie Notch cytoplasmique régule l'induction des crêtes neurales, j'ai co-électroporé le biosenseur GSK3 $\beta$  avec NICD et CD4-NICD. Les deux variants de NICD activent le biosenseur et ainsi inhibent GSK3 $\beta$ , cependant l'inhibition par CD4-NICD est plus rapide que l'inhibition médiée par NICD. Cette observation a aussi été faite dans les cellules de la DML. De plus, au niveau de la DML, j'ai pu mettre en évidence qu'en présence de CD4-NICD, certaines cellules migrent à travers le sclérotome. Bien que ces observations ne soient pas encore expliquées, on pourrait imaginer que retenir NICD à la membrane pourrait influencer sur son interaction avec AKT. En effet, ce dernier est activé via phosphorylation au niveau de la membrane. Ainsi, la présence simultanée de ces deux molécules en région sub-membranaire permettrait une interaction facilitée. Leur inclusion en radeaux lipidiques, qui permettrait une augmentation de la probabilité de synergie des deux molécules.

### V.A.2 Effet de SLUG sur l'EMT et la différenciation des crêtes neurales

*Snail* est un élément clef de la régulation de la délamination du mésoderme et des crêtes neurales via l'EMT (Duband et al., 1995; Hay, 1995; Nieto et al., 1994). De plus, *Slug* est nécessaire à la délamination des crêtes neurales mais aussi à la formation des précurseurs des crêtes neurales chez le poulet (LaBonne and Bronner-Fraser, 2000). Une autre étude, toujours chez le poulet, a montré que *Slug* inhibe la délamination des crêtes neurales au niveau de la moelle épinière (Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999). De plus, *Snail/Slug* induit l'acquisition d'un phénotype invasif dans les cellules tumorales et inhibe le phénotype épithélial dans des cellules de mammifères (Cano et al., 2000).

Ainsi *Snail* et *Slug* ont des rôles diversifiés -parfois interchangeables- et différents selon les contextes d'EMT : régulation positive de la division (Hemavathy et al., 2000), répression du phénotype épithélial (Cano et al., 2000), répression de la E-cadhérine (Bolos, 2003; Cano et al., 2000; Hemavathy et al., 2000; Jhingory et al., 2010) acquisition de phénotype invasif (Cano et al., 2000), induction de la différenciation (Aybar, 2003), induction de la migration (del Barrio and Nieto, 2002)... bien que tous ces effets soient interconnectés et très proches, ils ne sont pas identiques. On peut aussi noter que les effets de cette famille sont distincts lors d'EMT qui sont très proches, telles que les EMT des crêtes neurales de différentes régions de l'embryon.

Ainsi, les expériences que j'ai réalisées mettent en évidence un défaut de différenciation des crêtes neurales, mais pas un défaut de migration de cellules électroporées. Un défaut de *Slug* influencerait négativement la différenciation des crêtes neurales mais pas leur migration. Bien que ces résultats soient différents des résultats obtenus par (del Barrio and Nieto, 2002) au niveau des crêtes neurales crânielles, ils ne sont pas antinomiques, du fait que l'EMT des crêtes neurales n'est pas identique dans toutes les régions de l'embryon. *Slug* est nécessaire à la délamination des crêtes neurales mais aussi à la formation des précurseurs des crêtes neurales chez le poulet (LaBonne and Bronner-Fraser, 2000) ; En effet, la surexpression de *Slug* dans la région crâniale augmente le nombre de cellules prémigratoires et migratoires de crêtes neurales, au niveau de la moelle épinière, *Slug* permet seulement l'augmentation du nombre de précurseurs chez l'embryon de poulet (del Barrio and Nieto, 2002). Une autre étude, toujours chez le poulet, a montré que *Slug* inhibe la délamination des crêtes neurales au niveau de la moelle épinière (Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999).

Cependant, les études de (del Barrio and Nieto, 2002) mettent en évidence, *via* marquage Rho-B, que la surexpression de *Slug* augmente le nombre de cellules pré-migratoires mais n'influe pas la migration au niveau du tronc, ce qui est concordant avec les résultats que j'ai obtenu. Cependant, je n'ai pas observé de différence significative du nombre de cellules migrantes en me basant sur le nombre de cellules électroporées ayant migré et sur HNK1. Mais si l'on considère uniquement les cellules différenciées, il y a un défaut de migration de crêtes neurales matures. Ainsi, la méthode de détection de crêtes neurales migrantes, en se basant sur les cellules électroporées, ou bien en se servant de marqueurs de différenciation influe sur ce que l'on considère comme crêtes neurales.

L'utilisation d'autres méthodes de détections telles que des anticorps contre E-cadhérine et N-cadhérine, des ISH contre Rho-B ou encore un marquage Dil permettrait de mieux évaluer

le stade de différenciation des cellules migrantes et ainsi déterminer si la régulation des crêtes neurales au niveau du tronc a lieu uniquement au niveau pré-migratoire, ou aussi au niveau migratoire.

Déterminer si Slug influe sur la différenciation des cellules pré-migratoires ou bien leur division (*Snail* est impliqué dans la division asymétrique chez la *Drosophila* (Hemavathy et al., 2000)) permettrait peut-être d'expliquer plus le mécanisme de régulation de la migration par *Slug*.

### **V.A.3 Implication de *Slug* dans la voie Notch cytoplasmique**

Les expériences que j'ai réalisées mettent en évidence qu'au niveau des crêtes neurales du tronc, NICD cytoplasmique réprime l'activité de GSK3 $\beta$ . J'ai aussi mis en évidence que *Slug* active la différenciation des crêtes neurales du tronc. Ces expériences, additionnées à celles réalisées dans les cellules de la DML par (Sieiro et al., 2016) laissent très fortement penser que la voie Notch cytoplasmique impliquée dans l'EMT et la différenciation des cellules du myotome primaire est aussi impliquée dans l'EMT et la différenciation des crêtes neurales du tronc. Vérifier que CD4-NICD active *Sox10* permettrait de vérifier cette hypothèse. De plus, la co-électroporation de CD4-NICD et du DN-SLUG devrait inhiber la différenciation de manière similaire à l'électroporation du DN-SLUG.

### **V.A.4 Effet de la $\beta$ -caténine Y489C à long terme**

Afin de vérifier les effets obtenus à moyen terme avec la  $\beta$ caténine Y489C, j'ai réalisé la comparaison de de la surexpression de la  $\beta$ caténine sauvage et mutée à 48h post électroporation.

De manière étonnante, aucune différence significative n'est observable, tant au niveau de la longueur de fibres, que du nombre de fibres ou l'intensité de la fluorescence émise par le pU2-GFP lors d'analyses préliminaires. Des analyses plus fines ou à plus long terme permettraient peut-être de visualiser certaines différences.

Il a été mis en évidence que la  $\beta$ caténine Y489C est constitutivement enchâssée à la membrane et empêche la délamination au niveau des cellules de la DML (Sieiro et al., 2016). Cependant, au niveau de la délamination des cellules des crêtes neurales, du fait que la délamination est beaucoup plus importante qu'au niveau de la DML et que les cellules proviennent d'une région très restreinte du tube neural, deux hypothèses peuvent être émises



afin d'essayer d'expliquer ce résultat. La première est que les cellules adjacentes qui migrent restent jointes aux cellules électroporées et ces derniers sont emportées par les premières. La seconde hypothèse est que, du fait de la délamination massive, la cellule électroporée avec la  $\beta$ caténine mutée n'a plus de cellule à qui rester jointe et ainsi la cellule suivrait simplement le flux de cellules migrant. Dans les deux cas, une fois la délamination initiée, les cellules se différencieraient tardivement (plus de 12h post électroporation), certainement sous l'influence des cellules adjacentes et des facteurs extracellulaires.

## **V.B AKT et la voie Notch cytoplasmique lors de la différenciation myogénique**

### **V.B.1 CoIP du complexe NICD/ GSK3 $\beta$ /AKT**

Nous avons mis en évidence via des expériences de CoIP que NICD (et CD4-NICD) sont en complexe avec GSK3 $\beta$  et avec AKT mais l'expérience ne démontre pas que les trois molécules sont dans le même complexe. Une expérience de double CoIP en conditions non dénaturantes ou bien stabilisation des ponts disulfures, par exemple en descendant les complexes contenant NICD puis parmi les complexes descendus descendre à nouveaux ceux contenant GSK3  $\beta$  et vérifier la présence de AKT. Cependant cette expérience semble compliquée à réaliser dans les conditions dans lesquels les CoIP décrites précédemment ont été réalisées. En effet, il faudrait électroporer et disséquer plus de 900 œufs (X3 réplicas) afin de réaliser cette expérience, en considérant qu'il n'y aurait pas de mise au point expérimentale et que la conservation de la conformation tridimensionnelle ne gênerait pas la liaison des anticorps.

Une option plus envisageable serait de réaliser cette expérience *in vitro*, par exemple sur des myoblastes de poulet. Une autre option serait la production *in vitro* (via transfection de bactéries, purification puis passage sur colonnes) de ces trois molécules afin de vérifier si elles peuvent se complexer.

Une autre possibilité serait de réaliser de la spectrométrie de masse sur les complexes contenant NICD exogène. Cette technique aurait aussi pour avantage de pouvoir déterminer si d'autres molécules participent à ce complexe.

## **V.B.2 Optimisation du AKT-K179M**

La surexpression de AKT de souris (sAKT), induit la myogenèse chez l'embryon de poulet. Ainsi, AKT est impliqué dans la régulation de la myogenèse et les molécules sauvages de AKT de poulet et de souris semblent interchangeable. La phosphorylation inhibitrice de GSK3 $\beta$  par AKT a été démontrée dans de nombreux contextes (Feng et al., 2015; Gao et al., 2015; Kim et al., 2013; Ma et al., 2015; Reis et al., 2015; Wu et al., 2015). Afin de démontrer que l'inhibition GSK3 $\beta$  par AKT est bien médiée par l'activité kinase de AKT dans notre système, nous avons utilisé un AKT de souris muté : K179M. Ce remplacement de la lysine de la position 179 par la méthionine a pour effet l'inhibition du domaine kinase de AKT (Dudek et al., 1997). De plus, il a été mis en évidence que cette molécule est un inhibiteur compétitif de AKT endogène et qu'il agit comme un dominant négatif (Hsu et al., 2001; Songyang et al., 1997). Cependant, l'électroporation du DN-AKT dans les cellules de la DML ne semble pas avoir d'effet sur l'induction de la myogenèse primaire (ou une très faible activation). Cela pourrait être dû au fait que, dans notre système (poulet), AKT-K179M ne soit pas un inhibiteur compétitif mais plutôt un inhibiteur non compétitif. Cela pourrait s'expliquer par le fait que, bien qu'extrêmement bien conservées entre les espèces, AKT1 de poulet et AKT1 de souris ne sont pas strictement identiques et ainsi le DN-AKT de souris n'aurait pas le même effet compétiteur dans les deux systèmes.

Afin de confirmer qu'AKT inhibe bien GSK3 $\beta$  via phosphorylation, nous pourrions utiliser des SiRNA. En effet, cette technique est maîtrisée au sein du laboratoire et les SiRNA peuvent être insérés dans les cellules par électroporation. L'utilisation de SiRNA permettrait d'inhiber l'expression d'AKT endogène, et ainsi visualiser l'effet du AKT kinase dead K179M. Dans ces conditions, il n'y aurait plus de compétition entre AKT endogène et exogène et ainsi nous pourrions mettre en évidence l'implication du domaine kinase de AKT.

## **V.B.3 Effet de AKT sur SNAIL**

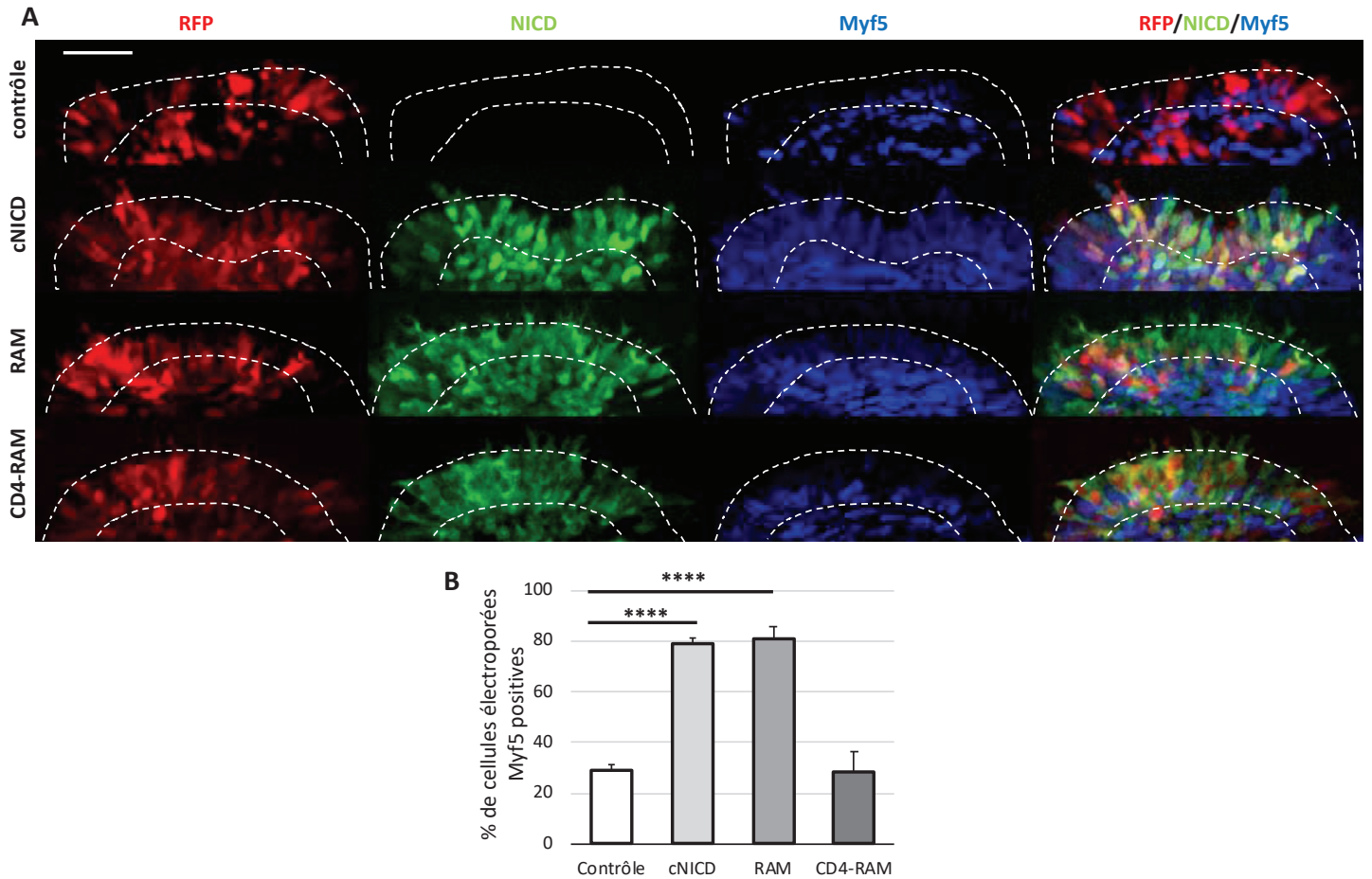
Les expériences réalisées mettent en évidence que AKT inhibe GSK3 $\beta$ , très certainement via phosphorylation. D'autre part, le laboratoire a mis en évidence que l'inhibition de GSK3 $\beta$  induit, entre autres, la stabilisation de SNAIL qui induit la myogenèse primaire ainsi que l'EMT.

Afin de vérifier si ces deux observations peuvent être regroupées au sein d'une même voie de signalisation, nous avons co-exprimé AKT et le DN-SNAIL. Cette co-électroporation a pour effet une restauration de l'induction de la myogenèse primaire. L'induction est similaire aux conditions natives mais supérieure à la surexpression du DN-SNAIL seul. Ainsi, il pourrait être envisageable de penser que AKT pourrait faiblement induire la myogenèse primaire via une voie SNAIL indépendante, par exemple *via* la  $\beta$ -caténine. Une autre hypothèse repose sur des observations (détaillées en V.B.5) qui mettent en évidence que AKT régule l'activité transcriptionnelle de NICD. AKT servirait de balance entre NICD nucléaire et NICD cytoplasmique. Ainsi, la surexpression de AKT provoquerait une séquestration de NICD au niveau cytoplasmique, ce qui induirait une suractivation de la partie initiale de la voie de signalisation. Cependant, l'électroporation de NICD ne permet pas de restaurer l'inhibition de la myogenèse induite par DN-SNAIL (Sieiro et al., 2016) bien que la surexpression de NICD seul provoque une augmentation drastique de la myogenèse. Ainsi, la restauration de la voie myogénique par AKT en présence du DN-SNAIL pourrait être liée à une voie parallèle ou bien à une séquestration de NICD par AKT dans le cytoplasme qui influencerait sur ses propriétés d'induction de la myogenèse.

#### **V.B.4 Effet du CD4-RAM sur la myogenèse**

L'électroporation de NICD- $\Delta$ RAM ou de CD4-NICD- $\Delta$ RAM ne modifie pas l'induction de la myogenèse. Ainsi le domaine RAM est nécessaire à l'induction de la myogenèse. Afin de vérifier s'il est suffisant à l'induction de la myogenèse, j'ai électroporé le domaine RAM seul ou le RAM fusionné avec un CD4 et observé l'effet sur Myf5 (Figure 33). Alors que la surexpression du domaine RAM seul induit Myf5 de manière identique à la surexpression de NICD, la surexpression de CD4-RAM ne semble pas influencer sur l'expression de Myf5, bien que l'on sache que l'induction de ma myogenèse se déroule dans le cytoplasme. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce résultat serait que l'accessibilité aux sites de liaison du domaine RAM soit modifiée par la présence trop proche de la membrane, soit en modifiant directement la conformation tridimensionnelle, soit en ne donnant pas accès au site de liaison de NICD à AKT et/ou GSK3 $\beta$ , soit simplement par répulsion hydrophobique. Cependant, une étude tend à laisser croire que ce ne serait pas la conformation secondaire ou tertiaire qui influencerait sur les capacités de RAM à se lier à d'autres molécules mais sa structure primaire (Johnson and Barrick, 2012). Ainsi, l'hypothèse de la répulsion hydrophobique ou du masquage de site par la membrane semble plus plausible. Utiliser une protéine de fusion CD4-linker-RAM pourrait permettre de légèrement déplacer RAM par rapport à la membrane

-tout en le maintenant dans le cytoplasme- ce qui devrait limiter l'effet de la membrane. La réalisation de Co-IP à partir de RAM exogène (contre AKT et GSK3 $\beta$ ) permettrait de conforter ces résultats.



**Figure 33 : Le domaine RAM de NOTCH est nécessaire et suffisant à l'induction de la myogenèse primaire dans les cellules de la DML.**

**A.** Reconstitutions 3D d'empilements de coupes optiques de somites électroporés. La colonne de gauche met en évidence le contrôle d'électroporation en rouge, la suivante NICD en vert, la troisième Myf5 et bleu et la dernière la superposition des trois précédentes. La première ligne représente l'activation endogène de Myf5 alors que la seconde ligne représente l'activation de Myf5 lors de la suractivation de NICD et les deux suivantes l'activation de Myf5 lors de la surexpression du module RAM de NICD, dans le cytoplasme ou enchâssé à la membrane (CD4-RAM). **B.** Analyse du nombre de cellules électroporées exprimant Myf5 par rapport au nombre total de cellules électroporées dans la DML (29,0% ;  $et=2,1$  pour le contrôle et 79,0% ;  $et=2,3$  pour NICD, 80,8% ;  $et=5,0$  pour le domaine RAM et 28,5% ;  $et=8,3$  pour le domaine RAM membranaire. Échelle : 20  $\mu$ m. \*\*\*\* :  $p<0,0001$ .

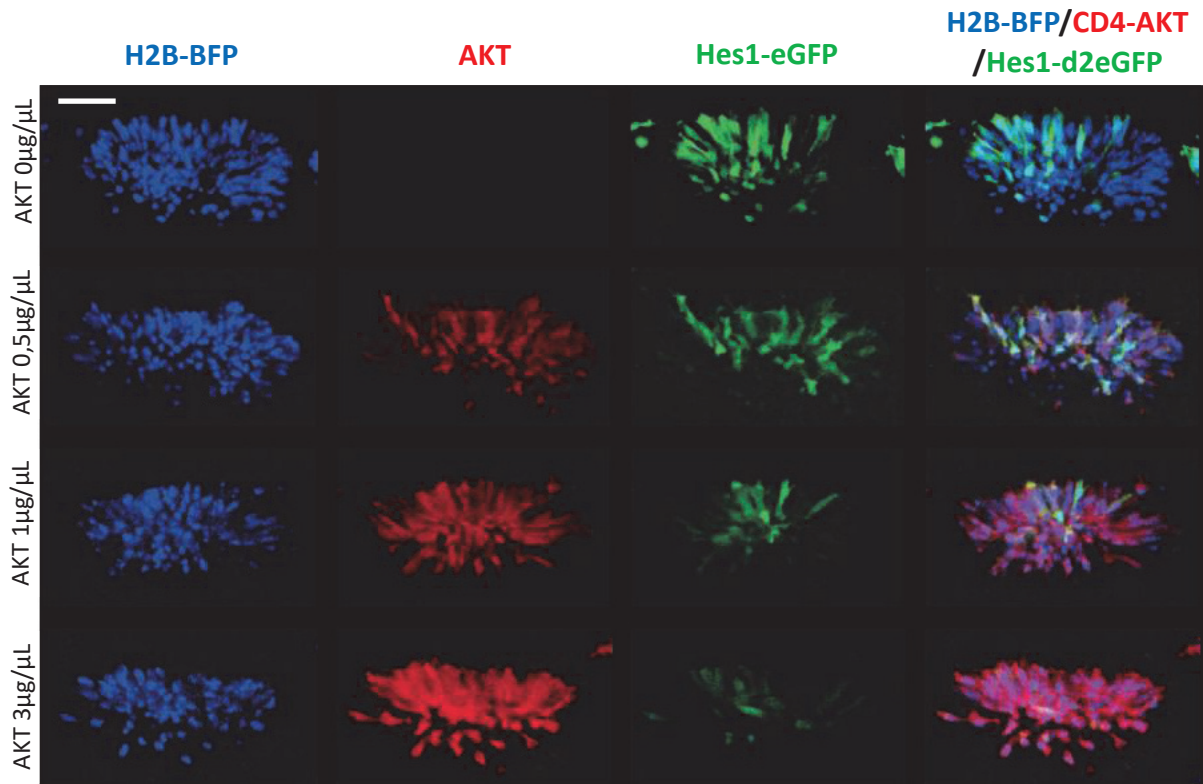


## V.B.5 Inhibition de l'activité transcriptionnelle de NICD par AKT

Dans plusieurs contextes, il a été mis en évidence que HES1 active AKT via phosphorylation et induit l'EMT (Gao et al., 2015, 2015; Li et al., 2018; Wang et al., 2015). Très peu d'études concernent la régulation de l'activité transcriptionnelle de NICD par AKT. Il a été mis en évidence *in vitro* que AKT inhibe l'activité transcriptionnelle de Notch (Song et al., 2008). Afin de vérifier si cette observation est applicable à notre système, nous avons co-électroporé AKT -à différentes concentrations- et un rapporteur de l'activité transcriptionnelle de Notch : le promoteur Hes1 fusionné avec une GFP. Plus la concentration d'AKT électroporé est importante, moins le rapporteur Hes1 est activé (Figure 34). Ainsi, AKT inhibe l'activité transcriptionnelle de Notch, de manière dose dépendante. Cela confirme donc les résultats obtenus *in vitro* dans (Song et al., 2008).

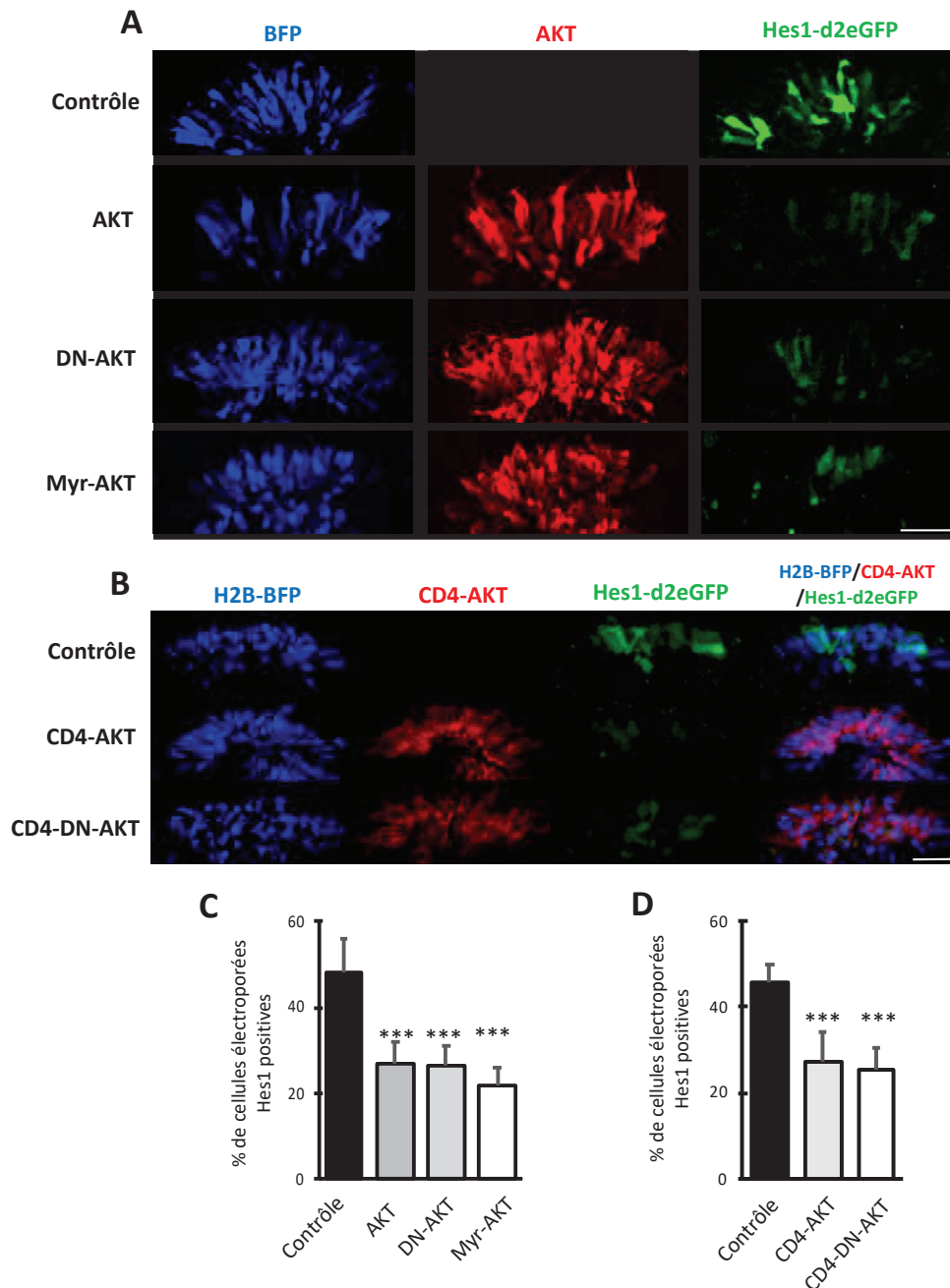
Afin de caractériser plus finement cette inhibition de l'activité transcriptionnelle, nous avons co-électroporé le rapporteur de la voie Notch avec différents variants de AKT, Myr-AKT (kinase constitutivement active) et DN-AKT, localisés ou non à la membrane (CD4). La surexpression des quatre variants testés présente un niveau d'activation de même pourcentage d'activation du rapporteur, similaire à la surexpression de AKT, sauvage, c'est à dire inférieure d'un tiers par rapport au contrôle (Figure 35). Ainsi, l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de Notch médiée par AKT n'est pas liée à une phosphorylation et se produirait dans le cytoplasme. Cela va à l'encontre des résultats publiés par (Song et al., 2008), qui démontrent une inhibition kinase dépendante. Cependant, cette différence pourrait s'expliquer par le fait que leur étude a été réalisée *in vitro* et la nôtre *in vivo*.

De plus, cette étude met en évidence que AKT induit la relocalisation de NICD dans le cytoplasme de manière kinase dépendante et kinase indépendante. L'implication d'une voie AKT kinase indépendante dans la relocalisation de NICD abonde dans notre sens. Nous avons donc cherché à mettre en évidence une relocalisation de NICD lors de la surexpression de AKT.



**Figure 34: Inhibition de l'activité transcriptionnelle de NICD par AKT de manière dose dépendante**

Reconstructions 3D d'empilements de coupes optiques de somites électroporés avec AKT à différentes concentration (en rouge), Hes1-d2eGFP (en vert) et le contrôle d'électroporation nucléaire (en bleu). Les différentes lignes représentent des concentrations croissantes de AKT électroporé. Échelle : 30 $\mu$ m.



**Figure 35: L'activité transcriptionnelle de NICD est inhibée dans le cytoplasme via une activité non phosphorylante de AKT**

**A-B.** Reconstructions 3D d'empilements de coupes optiques de somites électroporés avec différents variants de AKT (en rouge), Hes1-d2eGFP (en vert) et d'un marqueur d'électroporation cytoplasmique (A) ou nucléaire (B) (en vert). **C-D.** Analyse du nombre de cellules électroporées exprimant Hes1-d2eGFP par rapport au nombre total de cellules électroporées dans la DML. **C.** 50% des cellules électroporées expriment Hes1-d2eGFP (en noir) dans les conditions endogènes. 27,1% des cellules surexprimant AKT ont un rapporteur Hes1 actif (gris foncé), 26,4% pour les cellules surexprimant DN-AKT (kinase dead) (gris clair) et 22,0% pour les cellules surexprimant Myr-AKT (kinase constitutivement actif) (blanc). **D.** 45,7% des cellules électroporées expriment Hes1-d2eGFP (en noir) dans les conditions endogènes. 27,5% des cellules surexprimant CD4-AKT ont un rapporteur Hes1 actif (gris) et 25,2% pour les cellules surexprimant CD4-DN-AKT (blanc). Échelle : 20µm. \*\*\* : p<0,0001.

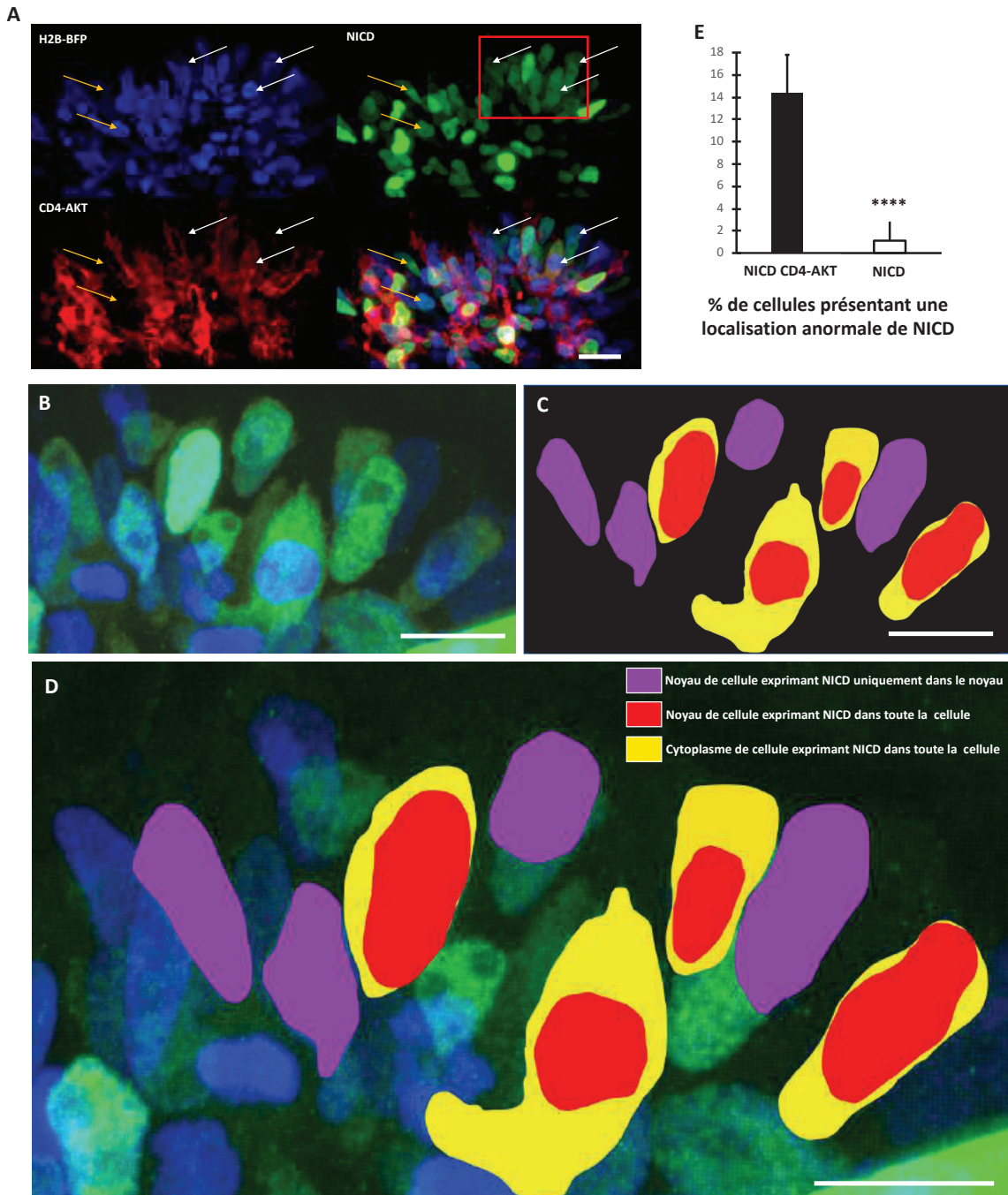
## V.B.6 Relocalisation de NICD par AKT

Afin de mettre en évidence la relocalisation de NICD par AKT, j'ai co-électroporé NICD et AKT. La visualisation *in vivo* n'a pas été très concluante, que ce soit par observation directe ou bien par quantification de l'intensité de la fluorescence générée après immunomarquage de NICD. Cependant, la co-électroporation de NICD et CD4-AKT a permis de mettre en évidence une localisation cytoplasmique de NICD dans environ 15% des cellules (**Figure 36**), soit une multiplication par 15 par rapport au contrôle. Le « faible » pourcentage de cellules présentant une relocalisation de NICD peut s'expliquer d'une part par le fait que ce système, bien qu'*in vivo* est totalement artificiel et d'autre part par le fait que les interactions interprotéiques sont des processus extrêmement labiles et éphémères, et donc qu'une relocalisation est complexe à visualiser. De plus, la méthode de visualisation après immunomarquage ne permet pas la détection de très faibles niveaux d'expression et ainsi, il est envisageable d'imaginer que beaucoup plus de cellules présentent une localisation cytoplasmique.

## V.B.7 Implication de NICD et AKT dans l'inhibition de GSK3 $\beta$

Mon travail de thèse ainsi que des études précédemment réalisées au laboratoire ((Sieiro et al., 2016) ont permis de mettre en évidence que NICD et AKT répriment l'activité de GSK3 $\beta$ , très certainement par phosphorylation. NICD n'étant pas une kinase, il semble probable que ce soit AKT (ou une autre molécule qui phosphoryle GSK3 $\beta$ ). NICD pourrait alors servir de co-activateur à AKT, ou bien maintenir les deux molécules physiquement liées (**Figure 21**).

Une étude laisse supposer que le domaine RAM ne serait pas nécessaire à l'activité transcriptionnelle -qui serait médié par le domaine ANK- mais permettrait de la faciliter, en déplaçant les co-represseurs. Une seconde hypothèse pour expliquer notre modèle pourrait donc être que le domaine RAM pourrait démasquer les sites de phosphorylation de GSK3 $\beta$  et ainsi faciliter la phosphorylation inhibitrice médiée par AKT. Une troisième hypothèse serait que le domaine RAM de NICD masquerait le site de liaison de GSK3 $\beta$  à l'ubiquitine ligase E3 et ainsi, bien que GSK3 $\beta$  soit techniquement active, elle ne pourrait plus adresser de molécules au protéasome.



**Figure 36 : Relocalisation de NICD dans le cytoplasme par AKT.**

**A.** Reconstruction 3D d'empilement de coupes optiques de somites électroporés avec CD4-AKT (en rouge), NICD (en vert) et d'un marqueur d'électroporation nucléaire (en bleu). Les flèches blanches mettent en évidence les cellules avec une localisation de NICD dans toute la cellule. Les flèches jaunes mettent en évidence les cellules avec une localisation nucléaire de NICD. **B-D.** Agrandissements de la région encadrée en rouge sur la figure (A). **B.** superposition de NICD en vert et d'un marqueur d'électroporation nucléaire en bleu. **C.** Schéma interprétatif de (B). **D.** superposition de (B) et (C). **E.** Analyse statistique du nombre de cellules électroporées exprimant NICD dans toute la cellule par rapport au nombre total de cellules électroporées dans la DML. 14,3% (ET=3,4) des cellules co-électroporées avec CD4-AKT expriment NICD dans toute la cellule alors que 1,1% (ET=2,4) des cellules électroporées avec NICD seul l'expriment dans toute la cellule. Échelle : 20µm. \*\*\*\* : p<0,0001.



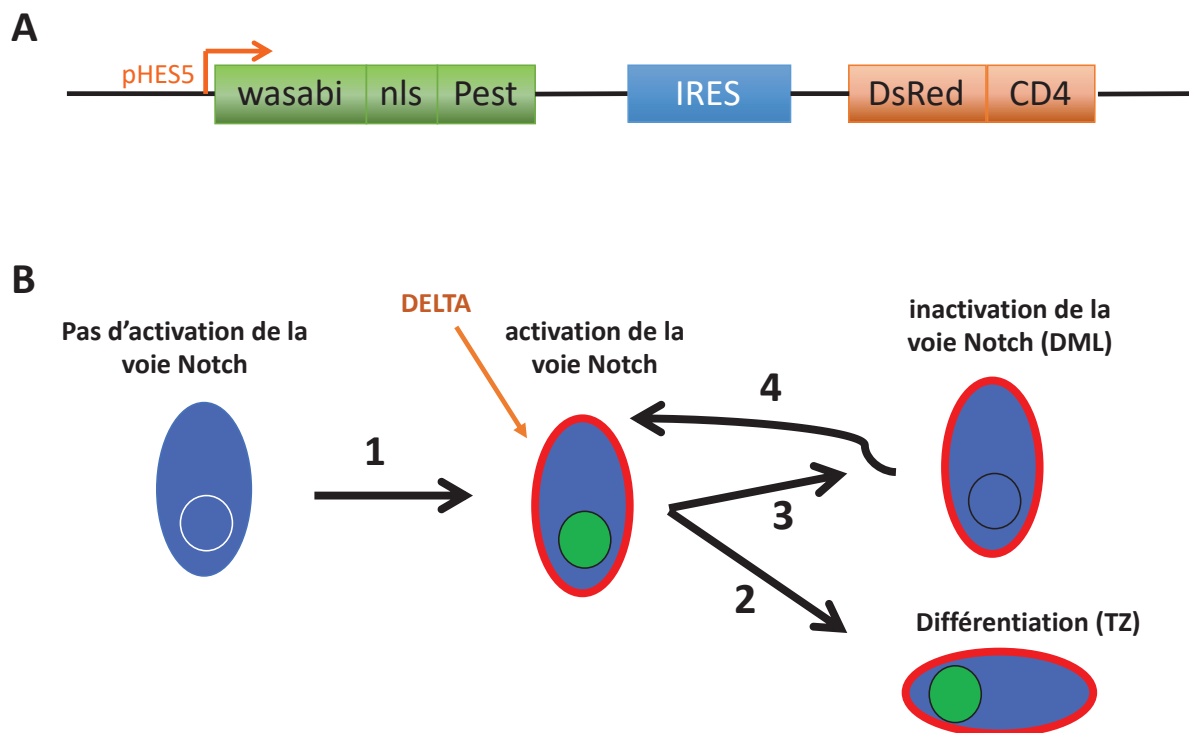
## V.C Caractérisation de l'activation de NOTCH au niveau de la DML via DELTA provenant des crêtes neurales

### V.C.1 Expérience

Notre équipe en évidence que toutes les cellules de la DML sont compétentes à activer la voie d'EMT/différenciation myogénique (Rios et al., 2011) mais que dans les conditions endogènes l'activation de cette voie est progressive, permettant le maintien de cellules indifférenciées au niveau de la DML. La surexpression de NICD provoque une activation massive de la voie d'EMT/différenciation et une translocation de la plupart des cellules de la DML dans la zone de transition, sans pour autant que les cellules réalisent une différenciation correcte. Ainsi, si toutes les cellules sont compétentes à entrer dans la voie d'EMT/différenciation mais que seulement certaines le font alors que toutes sont exposées au même signal extracellulaire activateur, cela laisse fortement suggérer qu'il existe un ou plusieurs points de contrôle. Afin de déterminer si le mécanisme permettant la régulation de l'induction de l'EMT s'effectue avant ou après l'activation de la voie NOTCH via DELTA j'ai cherché à réaliser une expérience basée sur la visualisation in vivo en continu de l'activité de la voie NOTCH dans les cellules de la DML.

L'expérience envisagée pour répondre à cette question est présentée dans la **Figure 37 B**. Un exemple de vecteur construit est représenté dans la **Figure 37 A**. Le promoteur HES5 (activé par NICD) permet la transcription d'une protéine verte (wasabi) adressée au noyau (NSL) et déstabilisée (PEST) ainsi que d'une protéine rouge (DsRed) adressée à la membrane (CD4). Cette construction permet de mettre en évidence si l'activité de NICD peut être pulsatile ou alors si l'activation de NICD engage directement la cellule dans la voie de différenciation. Ainsi, ce plasmide est co-électroporé avec un plasmide Caggs-BFP qui sert de contrôle interne d'électroporation. Avant l'activation de NOTCH, les cellules électroporées sont bleues. Suite à l'activation de NICD via DDL1, la cellule concernée, si électroporée, verra les deux protéines du plasmide transcrites et traduites. La cellule aura alors un cytoplasme bleu, un noyau bleu et vert et une membrane rouge (**Figure 37.B.1**). Deux devenir sont alors envisagés : soit la cellule s'engage dans la voie de différenciation, transloque dans la zone de transition (**Figure 37.B.2**) et continue d'exprimer les rapporteurs verts et rouges (la voie NOTCH est active dans la zone de transition). Soit la cellule ne se différencie pas et reste

dans la DML transition (Figure 37.B.3). Le plus probable dans ce cas serait que la voie NOTCH soit inhibée. Quelques heures après cette inhibition, les protéines vertes nucléaires déstabilisées – produites par l’activation antérieure de la voie NOTCH- seraient détruites alors que les protéines rouges membranaires stabilisées seraient encore visibles. Ainsi, les cellules ayant activé puis inhibé la voie NOTCH au niveau de la DML sans s’engager dans une voie de spécification apparaissent bleues (ie électroporées) et rouges (activation antérieure de la voie NOTCH) mais pas verts (inhibition de la voie NOTCH). Les cellules pourraient alors réactiver la voie NOTCH (**Figure 37.B.3**) et donc réexprimer le plasmide contrôlé par le promoteur Hes5. Les cellules redeviendraient alors bleues, rouges et vertes.



**Figure 37: Schéma d'une mise en évidence du niveau point de contrôle de l'activation de NOTCH lors de l'activation par DELTA au niveau des cellules de la DML**

**A.** exemple d'un des vecteurs construits. Le promoteur HES5 (activé par NICD) permet la transcription d'une protéine verte (wasabi) adressée au noyau (NSL) et déstabilisée (PEST ainsi que d'une protéine rouge (DsRed) adressée à la membrane (CD4). **B.** schéma mettant en évidence les deux possibilités de point de contrôle. (cf texte pour plus de détails).

Afin de réaliser cette expérience, j'ai réalisé différents plasmides sous le contrôle du promoteur Hes5 avec une protéine de couleur stable et une déstabilisée (**Figure 38**). Différentes méthodes de clonage (via enzymes ou via Gibson), différentes stratégies (insérer le promoteur ou bien l'une ou les deux protéines), différents outils permettant l'expression de plusieurs protéines sous le contrôle du même promoteur (P2A, IRES), différents systèmes d'amplification de signal (p10, Syn21) ont été testés.

La plupart des plasmides montrent des niveaux de fluorescence détectables après marquage mais des niveaux d'expression natifs très faible (difficilement détectables au confocal). De plus, les deux protéines ne sont pas exprimées de manière comparable dans beaucoup de plasmides et l'expression diffère d'une structure à l'autre.

Les plasmides les plus prometteurs sont le pHes5-DsRedExDR-Ires-nls-eGFP ainsi que le pHes5-NLSmCherry-IRES-d2eGFP (**Figure 38**).

nom	vert						rouge					
	L	DSB	DML	TN	CN	I	L	DSB	DML	TN	CN	I
pHes5-d2eGFP-nls-IRES2-Tomato	N	X	D	✓	✓	+	C	X	D	✓	✓	+
pHes5-Tomato-nls-PEST-IRES2-eGFP	C	X	✓	✓	✓	-	N	?	✓	✓	✓	+
pHes5-Tomato-nls-PEST-IRES2-eGFPCaax	?	?	X	X	X	?	?	?	X	X	X	?
pHes5-d2eGFPnls-P2A-Tom	N	X	✓	✓	✓	+	C	X	✓	✓	✓	+
pHes5-IVS-Syn21-d2eGFPnls-P2A-Tom	N	X	✓	✓	✓	+	C	X	✓	✓	✓	+
pHes5-d2eGFPnls-P2A-Tom-p10	N	X	✓	✓	D	+	C	X	✓	✓	D	+
pHes5-IVS-Syn21-d2eGFPnls-P2A-Tom-p10	N	X	✓	✓	D	++	C	X	✓	✓	X	++
pHes5-d2eGFP-P2A-NLS-mCherry	C	✓	D	✓	D	+	N	X	D	✓	D	+
pHes5-DsRedExDR-Ires-nls-eGFP	N	X	✓	✓	✓	-+	C	✓	✓	✓	✓	+
pHes5-d2eGFP-IRES-H2B-mRFP1	C	?	✓	✓	✓	++	N	X	✓	✓	✓	-+
pHes5-d2eGFP-P2A-H2B-mRFP1	C	?	✓	✓	✓	++	?	?	X	✓	X	-
pHes5-NLSmCherry-IRES2-eGFPCaax	C	✓	X	✓	X	+	N	X	X	✓	X	+
pHes5-NLSmCherry-IRES-d2eGFP	N	✓	✓	✓	✓	+	C	X	✓	✓	✓	+

**Figure 38: Tableau de comparaison des différents plasmides pHes5 doubles construits.**

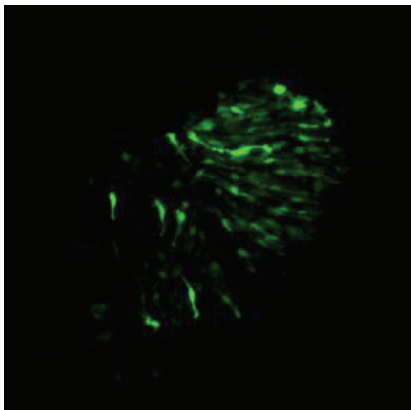
*DML : lèvres dorso-médiales. TN : tube neural. CN : crêtes neurales. I : intensité. D : embryon dépendant. L : localisation. DSB : déstabilisé. N : nucléaire. C : cytoplasmique.*

Parallèlement à la réalisation du plasmide, deux techniques de culture d'embryons ont été testées.

## V.C.2 Culture de tissu

La première technique de culture est la culture de tissu *ex vivo*. Une partie de l'embryon ou une « tranche » sont déposés dans un milieu de culture semi-solide et imagées au microscope confocal inversé (**Figure 41 1 à 5**). Durant ma thèse, nous avons eu plusieurs déconvenues avec ces techniques. Il n'y avait apparemment aucun problème majeur à réaliser ce montage en Australie, mais lorsque je suis arrivée en France, et que j'ai mis en place l'expérience, les résultats se sont révélés plus aléatoires que prévu et dans la plupart des expériences réalisées les tissus se détérioraient au lieu de se développer. J'ai été prendre conseil auprès des

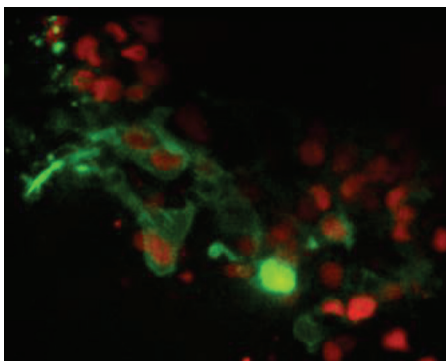
équipes de Valérie Castellani et Jérôme Gros afin de modifier mon protocole. Cela a eu pour effet une survie améliorée des cellules et un développement normal au niveau du tube neural (**Figure 39, Vidéo 1**). Le film de la **Vidéo 1** (<https://www.dropbox.com/s/nd99uhjat33j3au/coupe%20NT%2015h%20GFP.avi?dl=0>) met en évidence que les cellules électroporées de la partie dorsale du tube neural se divisent, réalisent des projections et migrent. La mise en place de structures axonales est visible à partir de la moitié de la vidéo dans la région ventrale. Une augmentation de taille du tube neurale est visible. Ainsi donc, le développement au niveau du tube neural est normal. Cependant, les somites sont apparus comme des structures beaucoup plus sensibles et les résultats moins convainquant qu'au niveau du tube neural. Des résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence (**Figure 40 et Vidéo 2**, <https://www.dropbox.com/s/yei0b0shdnvily4/DLM%2012h%20H2BRFP%20MLCGFP.mov?dl=0>) des cellules qui transloquent de la DML à la ZT ainsi que des cellules qui se divisent (dans le myotome). Ces résultats préliminaires doivent être vérifiés. De plus il semble que les processus biologiques observés sur sections soient plus lents que *in ovo*. J'ai donc remis en place au laboratoire une technique précédemment utilisée afin de visualiser des embryons entiers vivants *ex ovo*.



**Vidéo 1: Film de 15h de développement d'un héli-tube neural dorsal électroporé avec de la GFP**

*La partie dorsale de l'héli-tube neural gauche d'un embryon de 2,5 jours a été électroporé avec de la GFP. 6h après électroporation, l'embryon a été coupé via le tissu chopper et monté en milieu nutritif puis imagé directement pendant 15h sous microscope confocal inversé.*

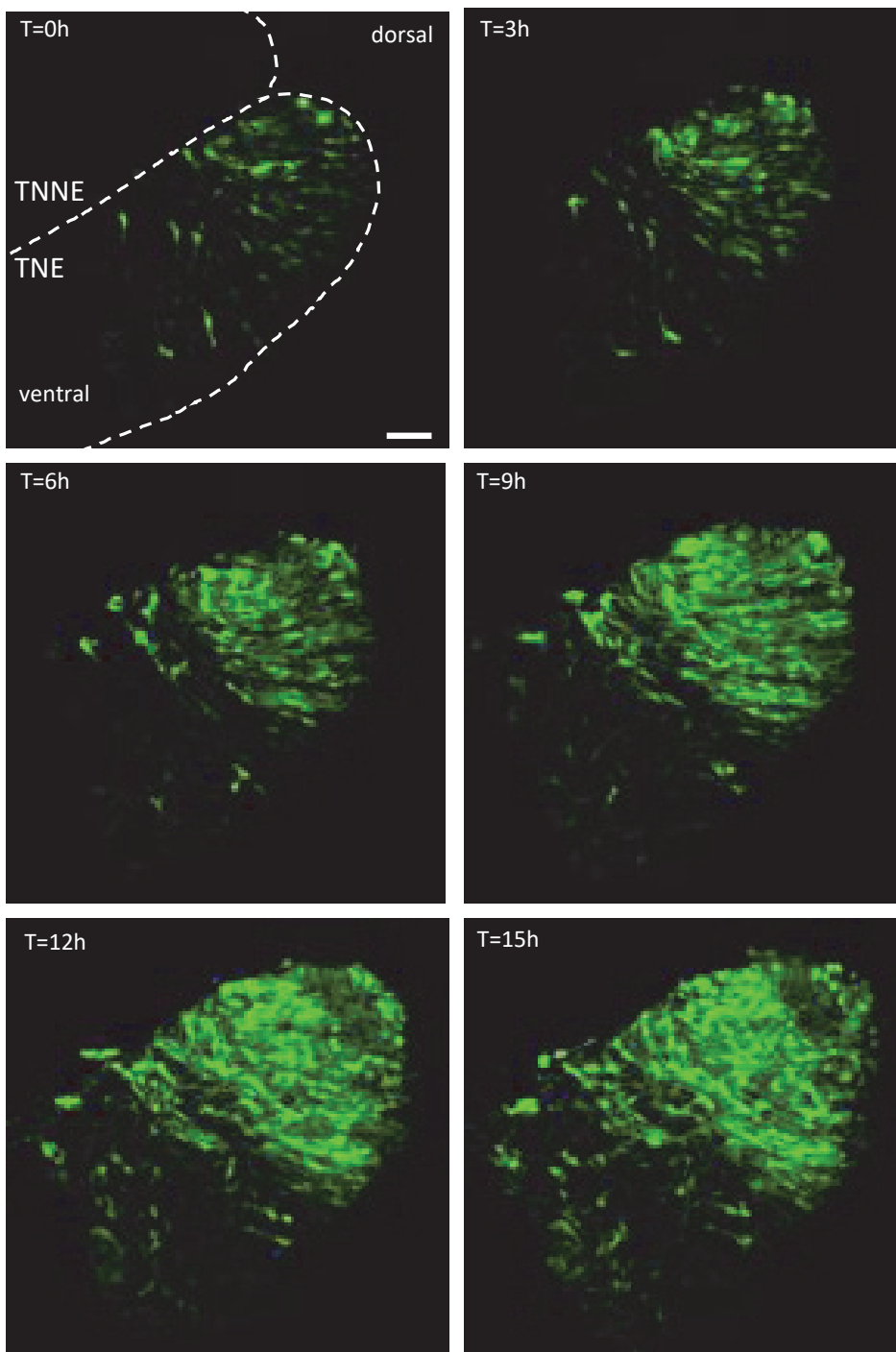
<https://www.dropbox.com/s/nd99uhjat33j3au/coupe%20NT%2015h%20GFP.avi?dl=0>



**Vidéo 2: Film de 12h d'une DML électroporée**

*Embryon électroporé à J2.5 et observé 20h plus tard, pendant 12h. En rouge : noyau (H2B- RFP), en vert MLC-FGF.*

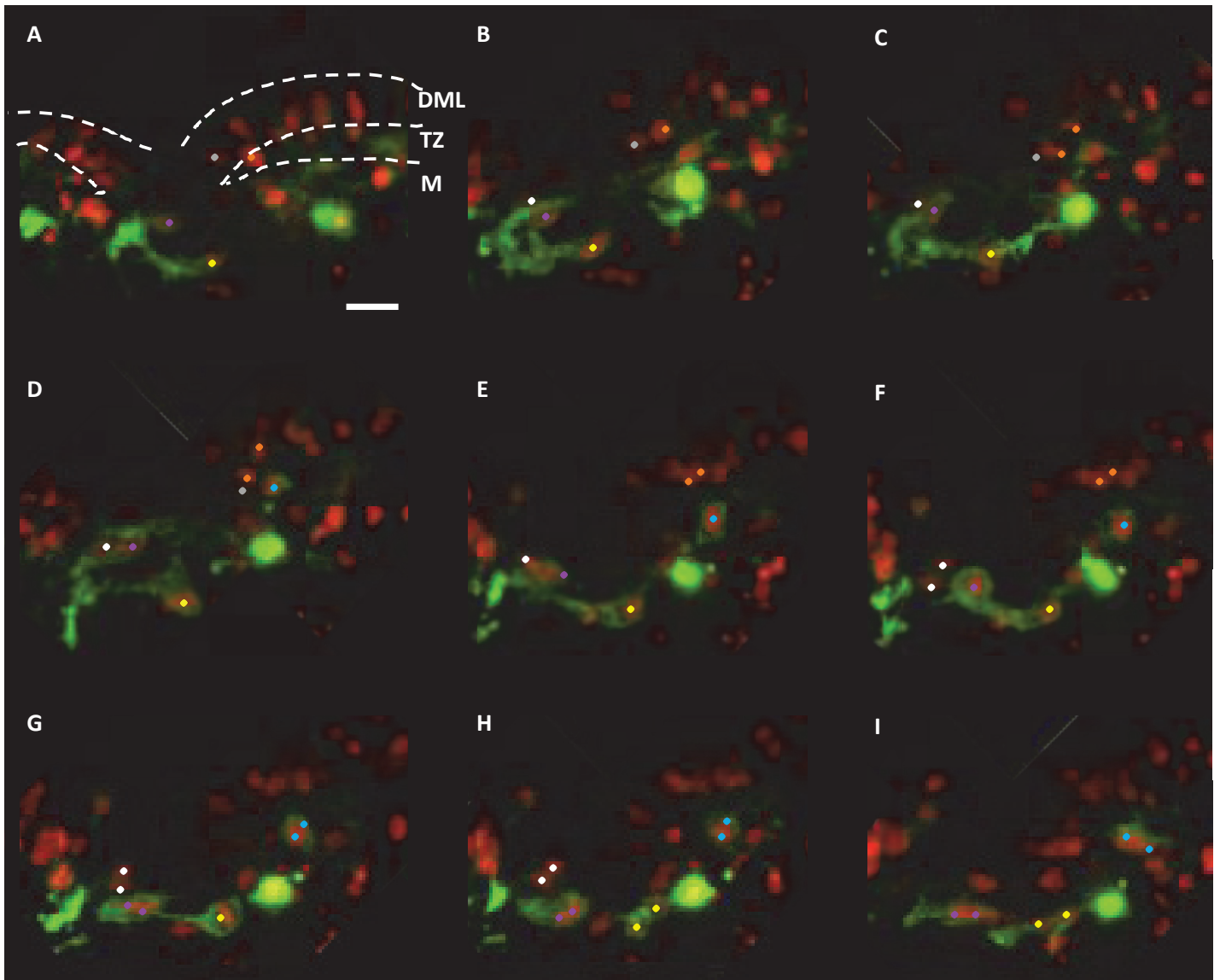
<https://www.dropbox.com/s/yei0b0shdnvily4/DLM%2012h%20H2BRFP%20MLCGFP.mov?dl=0>



***Figure 39: Time lapse d'un héli-tube neural dorsal électroporé***

La partie dorsale de l'héli-tube neural gauche d'un embryon de 2,5jours a été électroporé avec de la GFP. 6h après électroporation, l'embryon a été coupé à l'aide du tissu chopper, monté en milieu nutritif puis imagé directement pendant 15h sous microscope confocal inversé. TNE : héli-tube neural électroporé dorsalement. TNNE : héli-tube neural non électroporé. Échelle : 10 $\mu$ m.





**Figure 40: time-lapse d'une DML électroporé (12h)**

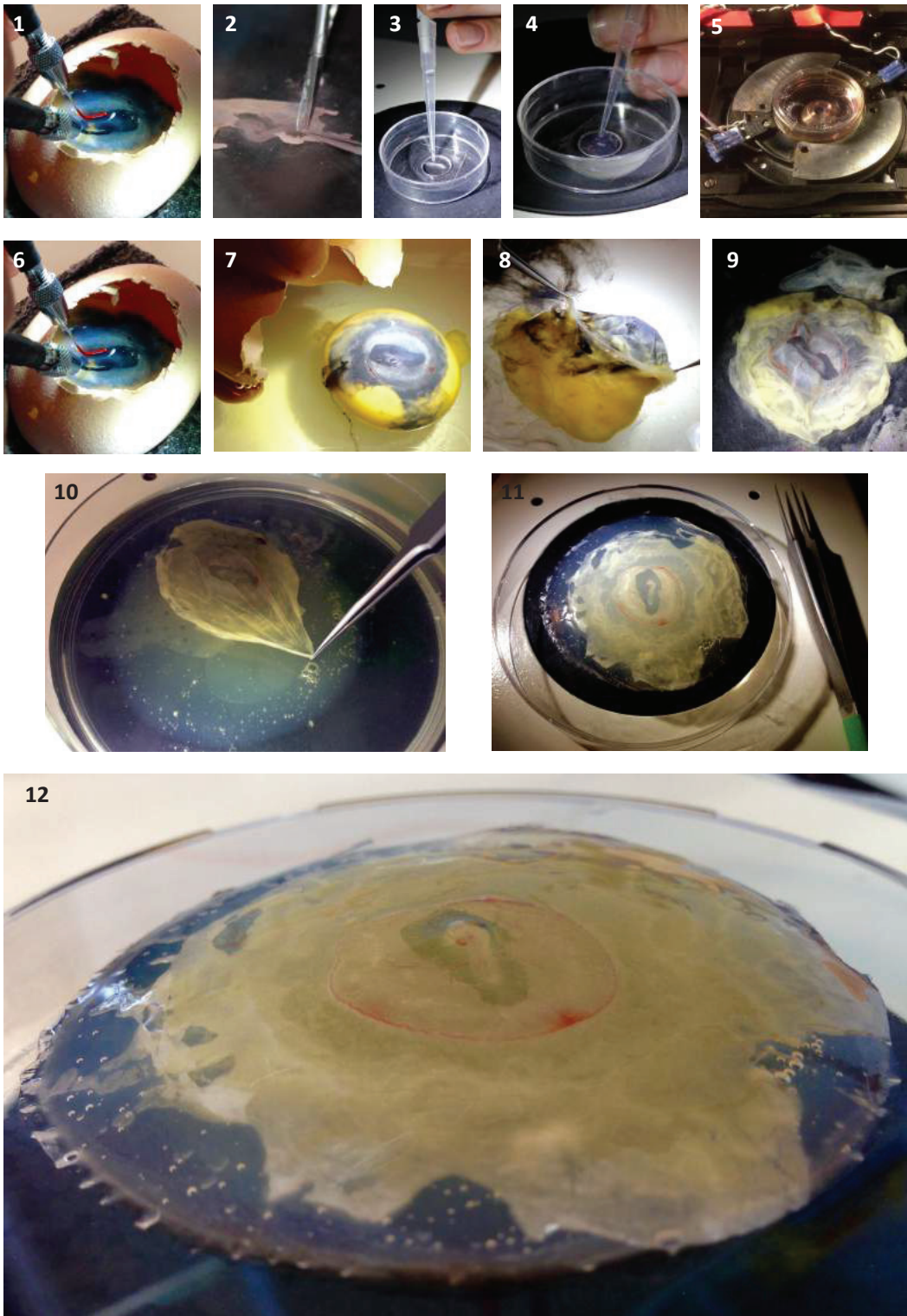
En rouge : noyau (H2B- RFP), en vert MLC-FGP. Cellule grise : passage de la DML à la ZT. Cellule orange : passage de la DML à la ZT, division puis les deux cellules retournent dans la DML. Cellules blanche, violette et jaune se divisent dans cet ordre, bien que déjà dans le myotome. Il semble que les deux cellules jaunes ne soient pas dans la même fibre musculaire, contrairement aux deux cellules violettes.

## V.C.3 Culture ex-vivo : le blop

### V.C.3.1 Mise au point de la technique

La seconde technique que j'ai utilisée afin de pouvoir suivre les cellules au sein d'un embryon est une technique mise en place précédemment au sein du laboratoire afin de cultiver des embryons ex-vivo : le blop (**Figure 41 6 à 12**). Après électroporation, l'embryon et sa membrane sont séparés du reste de l'œuf et transférés sur une demi-sphère d'agarose et milieu nutritif. J'ai réalisé des expériences afin d'optimiser le milieu de culture des embryons, l'incurvation de la sphère et j'ai testé différentes techniques de fixation de l'embryon. J'ai aussi déterminé le stade préférentiel auquel le transfert ex-vivo devait être réalisé.

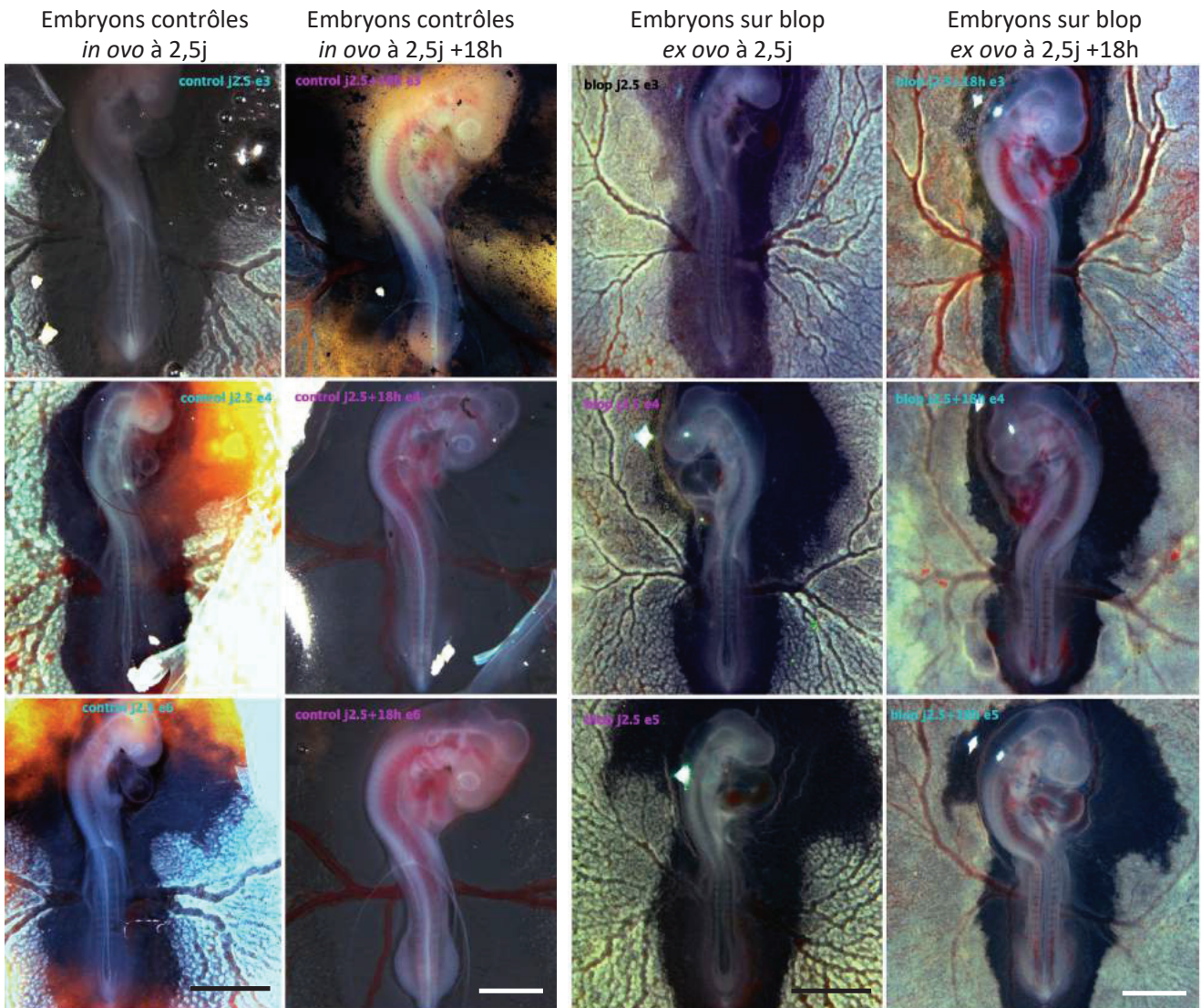
J'ai réalisé des tests de survie et de développement qui montrent que les embryons se développent correctement (**Vidéo 3** : <https://www.dropbox.com/s/prk51k3lvcyopzn/blop%20coeur.mov?dl=0> ) bien que légèrement plus lent (0,30 somite/h au lieu de 0,33 somite/h pour une culture *in ovo*) pendant au moins 36h (**Figure 42**).



**Figure 41: montages réalisés pour la culture de tissus ou embryons**

**1-5 :** culture de tissus. **1 :** électroporation. **2 :** dissection. **3 :** positionnement du tissu dans une boîte Labteck. **4.** Fixation de l'embryon à l'aide d'agarose et milieu de culture. **5 :** montage dans un cercle chauffant sous un microscope confocal inversé. **6-12 :** blop. **6 :** Électroporation. **7 :** séparation de l'œuf de la coquille. **8 -9 :** séparation de l'embryon sur sa membrane vitelline du reste de l'œuf. **10 :** positionnement de l'embryon sur le blop en milieu liquide. **11-12 :** embryon sur blop prêt à être imagé.





**Figure 42: Comparaison d'embryons développés *in ovo* et *ex ovo***

Les deux colonnes de gauche présentent trois embryons contrôles à 2,5j de développement (1<sup>ère</sup> colonne) puis 18h plus tard (2<sup>ème</sup> colonne). Les deux colonnes de droite présentent trois embryons à 2,5j juste après transfert sur blop (3<sup>ème</sup> colonne) puis 18h plus tard (4<sup>ème</sup> colonne). Échelle : 0,2cm.



**Vidéo 3: Mise en évidence de la survie d'un embryon après 12h sur blop**

On observe que la vascularisation est normale et que le cœur bat correctement (bien qu'un peu lentement du fait que l'embryon est resté à température ambiante quelques minutes). Un dézoom en fin de vidéo permet de visualiser le blop entier.

<https://www.dropbox.com/s/prk51k3lvcyopzn/blop%20coeur.mov?dl=0>

### V.C.3.2 Méthode d'observation

Afin de réaliser cette expérience, j'ai cherché à savoir quel serait le microscope le plus adapté à l'observation de cellules de DML électroporées sur un embryon sur blop. Il s'avère que la plupart des microscopes confocaux droits commerciaux ne sont pas conçus pour pouvoir accueillir une structure de 10cm de diamètre et 3cm de hauteur. De plus très peu d'objectifs à air présentent une résolution suffisante pour à 20x. Dans un premier temps, j'ai cherché à adapter le blop de manière à pouvoir utiliser un objectif à immersion mais sans succès.

J'ai ensuite décidé de réaliser des tests sur l'Axiozoom du l'équipe, qui est équipé d'un module apotome (pseudo-confocal). L'utilisation du module apotome s'est révélée très agressive pour l'embryon, du fait de la multiplication des prises de vues nécessaires à l'établissement d'images débruitées. Cependant les embryons se sont développés normalement pendant plus de 18h sous l'apotome et l'on peut observer que les somites se mettent en place normalement au niveau caudale et que les quatre membres émergent (

**Figure** \_\_\_\_\_ **43**, **Vidéo** \_\_\_\_\_ **4** et **Vidéo** \_\_\_\_\_ **5**

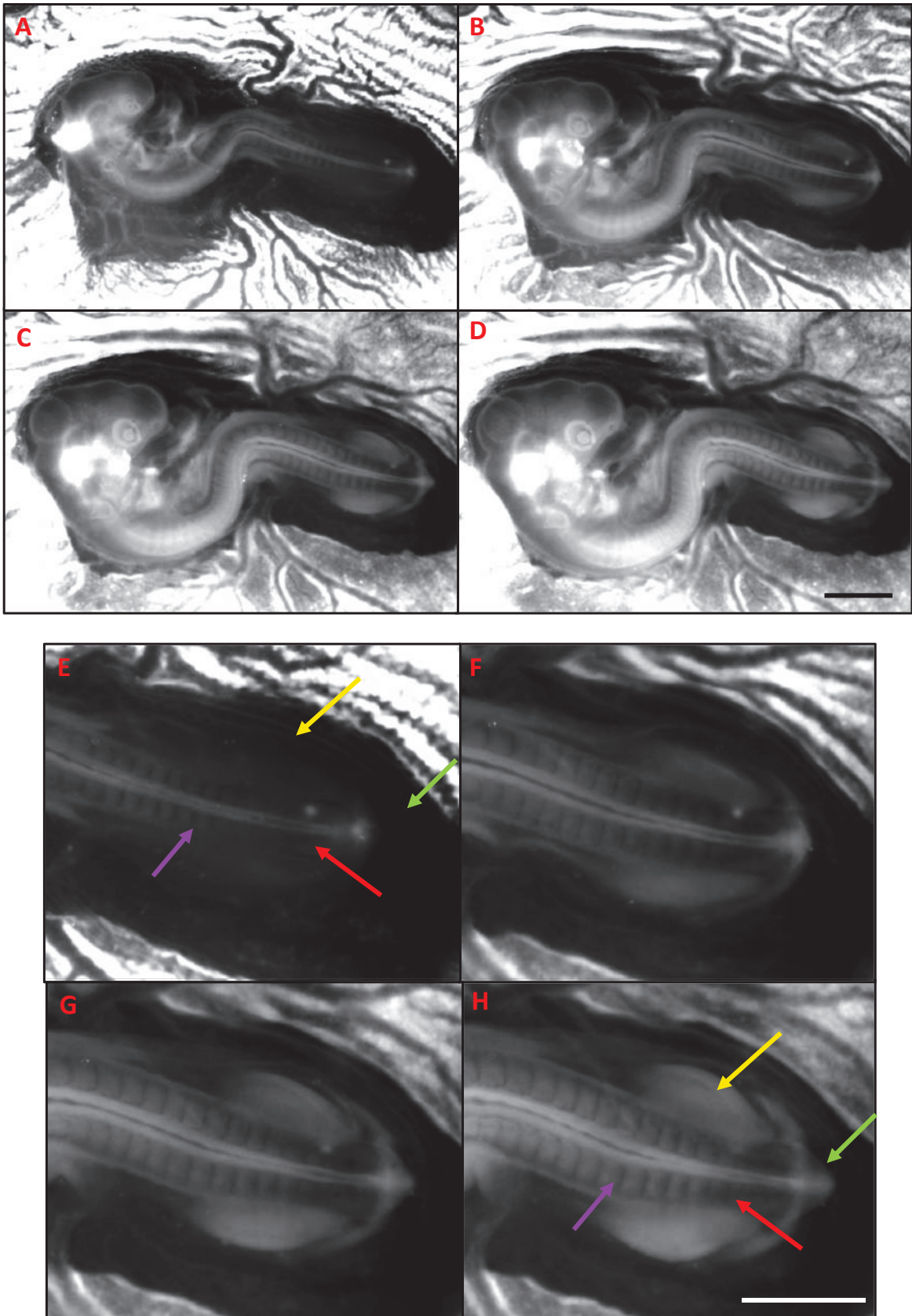
<https://www.dropbox.com/s/kspwx9qauwlsjgq/embryon%20entier%2018H%20apotome.mov?dl=0>

<https://www.dropbox.com/s/8fz428dpupcedv9/queue%20embryon%2018h%20apotome.mov?dl=0> ). Il s'est cependant avéré que les vidéos obtenues grâce à ce microscope ne

présentent pas la résolution nécessaire à l'observation des processus cellulaires (des migrations sont discernables mais les contours cellulaires sont mal définis et il est très compliqué de suivre les cellules).

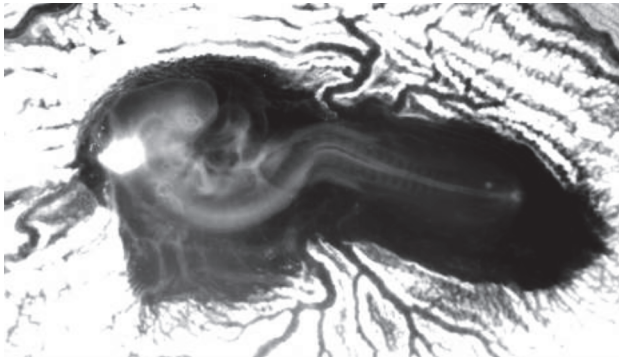
Nous avons donc décidé de réaliser une collaboration avec l'équipe de professeur Pierre-François Brevet, de l'Institut Lumière-Matière, situé sur le campus de la Doua. L'objectif de cette collaboration est de réaliser un microscope à feuillet de lumière bi-photon.





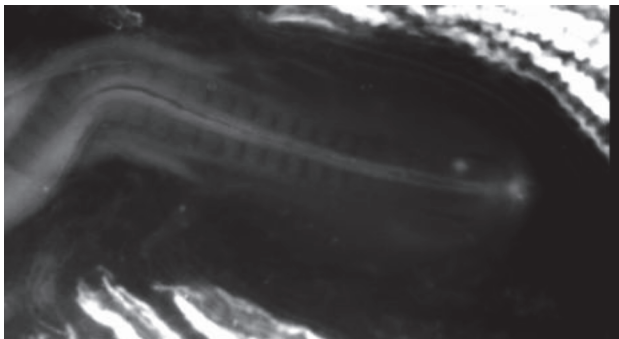
**Figure 43: Captures d'écran de d'un embryon imagé en plein champs pendant 18h**

A-D. captures à T=0, 6, 12 et 18h. E-H : agrandissement des images A à D. flèche violette : somite immature à T=0 et mature à T=18. flèche rouge : somite en cours d'individualisation à T=18h. Flèche jaune : bourgeon de membre postérieur. Flèche verte : bourgeon caudal. Échelle : 0,15cm.



**Vidéo 4: Embryon sur blop en plein champs durant 18h**

<https://www.dropbox.com/s/kspwx9qauwlsigq/embryon%20entier%2018H%20apotome.mov?dl=0>



**Vidéo 5: Agrandissement sur la région caudale d'embryon sur blop en plein champs durant 18h**

<https://www.dropbox.com/s/8fz428dpupcedv9/queue%20embryon%2018h%20apotome.mov?dl=0>

La technique de microscopie à feuillets de lumière ou SPIM (pour *Selective Plan Imaging Microscopy*) a connu un fort développement depuis 15 ans (depuis le papier de Huisken et al. (Huisken et al., 2004)). Le principe est assez simple : un faisceau laser plan illumine une série de sections de plan dans l'échantillon (qui doit être suffisamment transparent) qui sont détectés par une caméra située à 90° par rapport au faisceau incident. Cette technique permet donc d'analyser un plan entier et pas seulement point par point, ce qui a pour conséquence une augmentation considérable de la vitesse d'acquisition des images. Cela est non négligeable lors de l'étude de processus extrêmement rapide ou bien lorsque les échantillons sont mobiles (par exemple le cœur d'un embryon qui bat et fait osciller les structures).

Le principe de la microscopie bi-photonique (ou microscopie à deux photon) est d'exciter l'échantillon avec deux photons de faible intensité qui se rejoignent et s'additionnent au niveau de la structure à illuminer afin d'atteindre le niveau d'énergie nécessaire à l'excitation des fluorochromes, c'est un phénomène d'optique non linéaire (Helmchen and Denk, 2005). Cela a pour effet plusieurs conséquences : l'intensité plus faible des photons ainsi que l'illumination d'un point spécifique (contrairement à la microscopie confocale classique qui

illumine sur une profondeur plus importante avant que la fluorescence réémise ne soit filtrée) permet de mieux préserver les échantillons contre des illuminations trop importantes qui peuvent devenir létales. De plus, la grande longueur d'onde des photons utilisés par le bi-photon permet une pénétration plus importante dans les tissus (multipliée par deux environ) et ainsi l'étude de structures plus profondes.

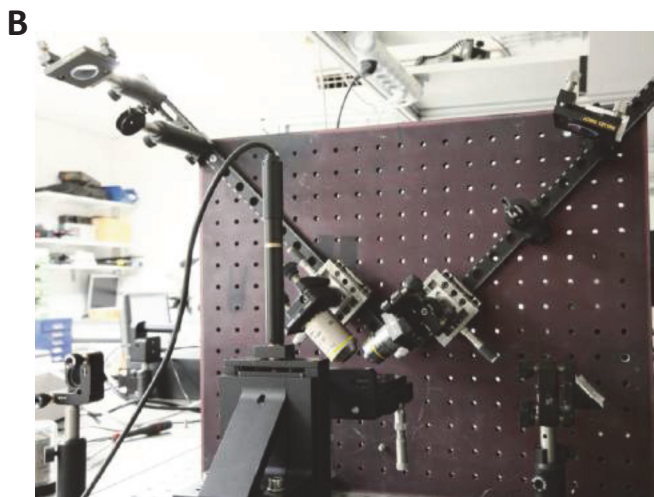
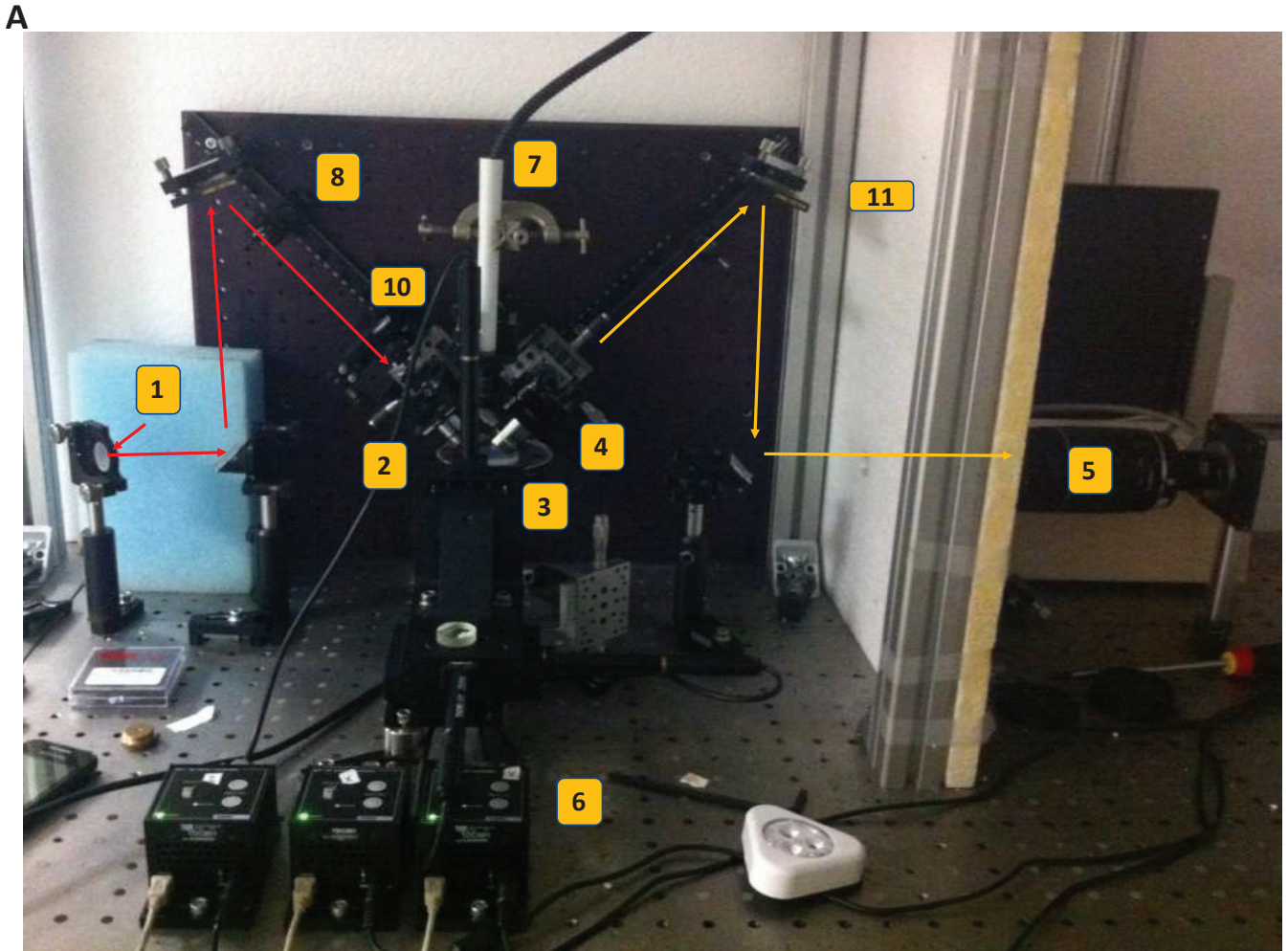
Depuis quelques d'années, plusieurs études couplent ces deux techniques et obtiennent des résultats très intéressants (Fahrbach et al., 2013; Mahou et al., 2012; Nemoto, 2008; Truong et al., 2011; Zhao et al., 2014), et même récemment en neurologie (Piksarv et al., 2016) ou pour des tissus épais (Lavagnino et al., 2016).

Pour ce faire, j'ai travaillé avec Estelle Salmon, Christian Jonin et Cedric Ray au sein de leurs locaux à la Doua. Un microscope SPIM horizontal, configuration iSPIM (ou inverted SPIM) a été créé et amélioré au cours des deux dernières années. La **Figure 44** montre le montage le plus récent utilisé. Le chemin optique est figuré par les flèches rouges et oranges. Dans cette première version, deux sources laser de base puissance à 473 nm et 532 nm permettent de réaliser des études par microscopie de feuillet de lumière en fluorescence à un photon. Les objectifs utilisés possèdent des grossissements variant de X10 à X50, et une lentille cylindrique de focale 50 cm est utilisée pour mettre en forme le faisceau laser et fabriquer un feuillet.

Les résultats préliminaires montrent que le système est adapté à l'étude de l'embryon de poulet. En effet, la **Figure 45 A** met en évidence que de la fluorescence est détectable suite à l'excitation d'un tube neural électroporé mais seulement à grande échelle. Afin de pouvoir observer des processus de niveau cellulaire, des modifications du système ont été effectuées. Des billes de taille définies recouvertes de molécules fluorescentes enchâssées dans une matrice d'agarose ont permis de calibrer le système et d'obtenir une résolution au niveau cellulaire. La **Figure 45 B** montre le système lors de l'excitation d'un embryon de poulet. La **Figure 45 C** est un agrandissement sur les frange de diffractions émises par l'embryon et non retenues pour analyse.

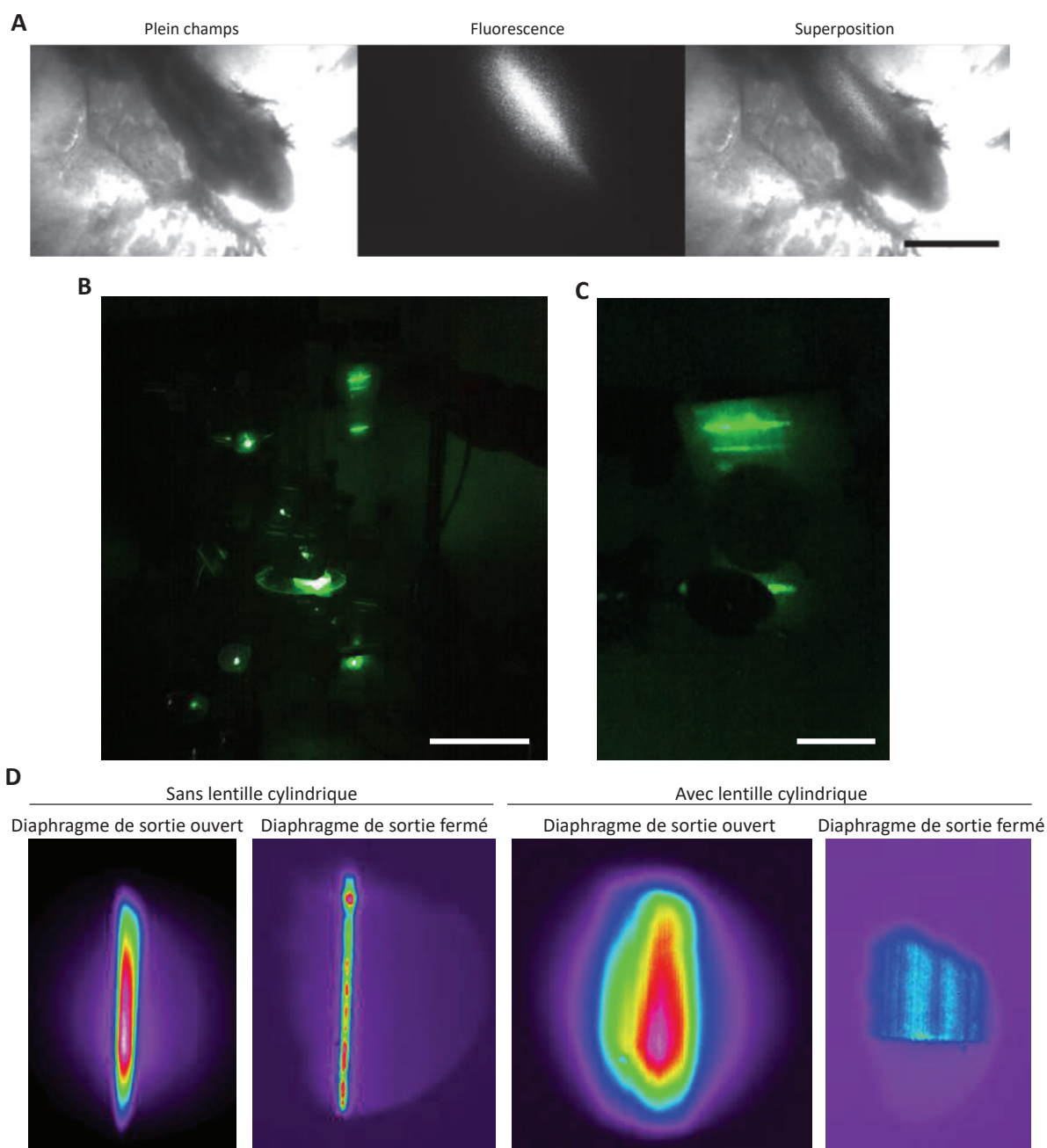
La **Figure 45 D** met en évidence l'importance d'un diaphragme de sortie et la différence entre un illumination par un point (qui génère une ligne) ou par une ligne, via utilisation de la lentille cylindrique (qui génère un plan). Sur la dernière image, la fluorescence en bas de l'image se termine selon une pseudo horizontale qui est due à la fin de signal fluorescent émis (sortie de l'échantillon).





**Figure 44 : Microscope réalisé à l'ILM**

**A-C** : montage réalisé. **A** : modèle le plus récent réalisé. Flèches rouges : chemin optique du faisceau incident. Flèches oranges : chemin optique du faisceau réémis par l'échantillon. 1 : point d'arrivée du faisceau laser (obstrué par une plaque bleue ici). 2 : objectif. 3 : échantillon. 4 : objectif. 5 : module de collecte de la fluorescence. 6 : contrôle de la platine galvo. 7 : caméra plein champs permettant le positionnement de l'embryon. 8 : diaphragme d'entrée. 9 : diaphragme d'entrée. 10 : lentille cylindrique. 11 : portion de la chambre créée afin de contrôler la température et l'humidité.  
**B-C**. autres vues du montage. Le diaphragme est particulièrement visible en B et l'embryon en C.



**Figure 45: Résultats préliminaires obtenus en collaboration avec l'ILM**

**A.** images permettant de mettre en évidence la bonne détection de fluorescence émise. A gauche, image plein champs de la queue de l'embryon. Au centre, la fluorescence émise par le tube neural électroporé. A droite la superposition des deux images précédentes. Échelle : 2mm. **B.** photo du montage avec le laser allumé. Échelle 10cm. **C.** agrandissement de la photo B qui montre les franges de dispersion non retenues par le montage. Échelle : 2cm. **D.** images de fluorescence collectées par le système pour calibration. Les couleurs représentent l'intensité (rouge plus intense). L'image de droite représente le signal reçu en microscopie simple, avec un diaphragme de sortie ouvert. La suivante avec le diaphragme fermé. Les deux suivantes représentent le signal obtenu en présence de la lentille cylindrique (SPIM) ; à gauche avec un diaphragme ouvert et à droite avec un diaphragme fermé.



Ainsi, ma collaboration avec les membres de l'ILM a permis de mettre en place les premiers éléments physiques d'un microscope à façon afin de pouvoir visualiser des processus cellulaires au sein d'un embryon de poulet *in-vivo*. Bien que cette étude n'ait pas pu être finalisée durant ma thèse à cause du fort taux d'occupation de la salle d'expérience et des travaux qui l'ont immobilisé pendant 9 mois, cette technique reste prometteuse avec la perspective à plus long terme d'une étude en bi-photon.

Des études préliminaires ont permis de mettre en évidence que 12h après électroporation, plus de cellules de la DML expriment une molécule fluorescente stable sous le contrôle du promoteur Hes5 que qu'une molécule fluorescente déstabilisée sous le contrôle du promoteur Hes5. Ainsi, il semble que les cellules de la DML pourraient activer Notch sans pour autant induire l'EMT et la différenciation myogénique (il y aurait des cycles d'activation). Corréler ces résultats (ou le plasmide décrit plus haut) avec un marqueur Fucci ou bien un marquage EdU permettrait de conforter ces résultats et de mettre en évidence un lien entre régulation de la myogenèse via NICD et cycle cellulaire.

# VI Matériel et méthodes

*« La connaissance s'acquiert par l'expérience,  
tout le reste n'est que de l'information »  
Albert Einstein*

## **VI.A** Modèle animal

Des œufs fécondés de *Gallus gallus*, majoritairement des Cou Nus provenant de l'élevage du Grand Buisson (Rhône) ainsi que des Hy-line Brown domestic provenant Hy-line Australia Pty Ltd (Huntly, Victoria) ont été utilisés. Les œufs sont stockés entre 15 et 18°C afin d'empêcher le développement embryonnaire puis incubés dans des armoires ventilées à 38,5°C et 95% d'humidité durant une durée précise afin de permettre le développement des embryons au stade souhaité pour les différentes expériences.

Le stade de développement embryonnaire a été déterminé à l'aide de la table réalisée par Hamburger et Hamilton (1992). Les électroporations de tube neural et de crêtes neurales ont été réalisées entre le stade 11 (48h d'incubation) et le stade 16 (62h d'incubation). Les électroporations des différentes régions des somites ont été réalisées autour du stade 16.

## **VI.B** Méthode d'électroporation *in ovo*

La **Vidéo 6** montre les différentes étapes préalables à l'électroporation ainsi que les différents types d'électroporation (structures et régions).



**Vidéo 6 : Résumé de la technique électroporation *in ovo***

<https://www.dropbox.com/s/sedcsp3gewju0h/m%C3%A9thode%20%C3%A9lectroporation.mov?dl=0>

### **Préparation des œufs**

Les œufs ont été préparés selon des protocoles standard (Stern & Holland 1993). 4,5 mL d'albumine sont extraits des œufs à l'aide d'une seringue avant de réaliser une fenêtre de 2cm de diamètre dans la coquille. 0,1 mL d'encre de Chine (Lefranc & Bourgeois) diluée au 1/10 dans une solution de Ringer-Penistreptomycine (cf liste des solutions), sont injectés dans le vitellus, juste sous l'embryon afin de pouvoir mieux visualiser ce dernier.

La membrane vitelline est déchirée et retirée au niveau de l'embryon à l'aide d'une aiguille 31G (BD Medical) dont l'extrémité a été courbée afin de lui donner une forme d'hameçon.

## **Injection d'ADN**

Des capillaires en verre (GC120T-10, Harvard Apparatus) ont été étirés à l'aide d'un P- 2000 laser puller (Sutter Instrument). Une fois les capillaires étirés, la pointe est sectionnée afin de permettre à la solution d'ADN d'être aspirée puis injectée via l'extrémité étroite du capillaire. L'extrémité non étirée est reliée à un tube en plastique souple. La solution d'ADN (cf liste des solutions) est aspirée dans le capillaire via une pression négative à poussée buccale. Le capillaire est ensuite inséré dans la structure cible : cavité neurale pour l'électroporation du tube neural et des crêtes et somitocoele pour l'électroporation des somites. Le capillaire est inséré au niveau postérieur de l'embryon puis lentement remonté vers le pôle antérieur. L'ADN est injecté via une pression positive à poussée buccale lors du mouvement de retrait du capillaire jusqu'à ce que les structures soient totalement remplies. Les structures antérieures sont donc injectées avant les structures postérieures.

Lors d'expériences nécessitant la préservation de l'intégrité de chaque somite (électroporation d'un somite sur deux, ou électroporation de différents plasmides dans différents somites afin de visualiser la fusion des fibres provenant de différents somites), le capillaire est inséré dans le somitocoele d'un seul somite via la face latérale de l'embryon.

## **Electroporation**

Environ 300 $\mu$ L de solution de Ringer/PS sont versés sur la surface de l'embryon. Les électrodes positive (platinium) et négative (tungstène) sont placées de part et d'autre de l'embryon, selon une position spécifique à la structure à électroporer. Les différentes positions d'électroporation sont décrites dans (Scaal and Christ, 2004). Suite à l'impulsion électrique, l'ADN se dirige vers le pôle positif et intègre les cellules. 2 à 3 décharges électriques (10msec) sont appliquées via un électroporateur TSS20 Ovodyne et un amplificateur EP21 (Intracel). Le voltage d'électroporation est dépendant du stade de développement de l'embryon ainsi que de la structure ciblée; 35 à 55 volts pour les structures neurales, 35-55 volts dermomyotome dorsal et la face ventrale des somites et 55-65 volts pour les bordures du somite. Pour les doubles électroporations, le voltage d'électroporation est diminué de 5 à 10 volts.

La fenêtre réalisée en début d'expérience dans la coquille est alors refermée à l'aide de scotch épais transparent puis l'œuf est remis dans l'incubateur afin de poursuivre son développement jusqu'au stade de développement désiré.



## **Injections de doxycycline**

Afin d'activer l'expression de plasmide médiée par la doxycycline, 200 $\mu$ L d'une solution de 3  $\mu$ g/mL doxycycline/PBS sont insérés sur les embryons électoporés par la fenetre de la coquille au moment choisi.

## **VI.C Fixation et marquage sur embryons**

### **Fixation**

Les embryons sont fixés dans une solution de formaldéhyde à 4% dans du PBS. Le temps de fixation varie de 1 à 4h en fonction du stade de l'embryon. Une fixation à température ambiante est réalisée pour les anticorps communs, mais pour les anticorps tels que Myf5 ou MyoD, une fixation plus lente et légère à 4° est nécessaire.

Deux lavages de 10 min au PBT sont ensuite réalisés.

### **Marquage**

Les embryons sont mis en washing buffer entre 1 et 3h.

Les anticorps primaires sont dilués (voir liste des anticorps) dans du washing buffer et les embryons incubés avec sur la nuit à 4°C. 3 lavages au washing buffer sont réalisés le jour suivant.

Les anticorps secondaires sont dilués au 1/500 dans du washing buffer et les embryons incubés avec sur la nuit à 4°C. au minimum 3 lavages au PBT sont réalisés le jour suivant jusqu'à disparition du bruit de fond.

### **Montage**

Après dissection dans du PBT, les embryons sont transférés dans une solution 80% glycérol/PBS.

Pour le montage, des couches successives de scotch sont déposées sur des lames (Menzel-Gläser) jusqu'à obtenir l'épaisseur désirée puis une fenêtre est découpée pour pouvoir accueillir l'embryon avec du glycerol. Cela permet de préserver l'intégrité des structures qui peuvent être volumineuses.

Une lamelle#1.5 (Menzel-Gläser) est déposée sur la lame. Du scotch permet de sceller le montage.

## VI.D Whole-mount In Situ Hybridisation (ISH)

Disséquer les embryons et les fixer 24h en formaldéhyde 4%. Les déshydrater en meOH/PBS 25%, 50%, 75% et 100%.

### Premier jour

- 1- Réhydrater les embryons en meOH/PBS 75%, 50%, 25% puis rincer 2x en PBT. Changer la solution quand les embryons tombent au fond du tube.
- 2- Traiter les embryons avec 0,25 µl/ml de protéinase K à 20µg/ml en PBT à 50°C. 20 min pour les 3,5 jours, 30min/4,5 jours, 40min/5,5 jours.
- 3- Rincer brièvement en PBT puis fixer 20min en 4% formaldéhyde + 0.1 % glutaraldéhyde (45µl pour 10 ml)
- 4- Laver 2x en PBT et transférer les embryons en tube 2ml (3 embryons/tube)
- 5- Rincer en 1 :1 PBT/HM jusqu'à ce que les embryons tombent au fond du tube.
- 6- Rincer en HM jusqu'à ce que les embryons tombent au fond du tube.
- 7- Remplacer par 1ml of HM et incuber horizontalement 1h/65 °C.
- 8- Remplacer par 1 ml de HM (préchauffé à 65°C) contenant la sonde (10µl / 1 ml à ajuster en fonction de l'intensité de la bande)
- 9- Incuber horizontalement à 65°C ON.

### Deuxième jour

- 1- Rincer les embryons 2x5min/65°C avec 1ml de HM
- 2- Laver 2x30min/65°C avec 1ml de HM
- 3- Laver avec 1 ml de 1:1 HM/MABT pendant 10min à 65°C
- 4- Laver 3x10min en MABT (15ml falcon/roller)
- 5- Incuber 1h en MABT + 2% BBR + 20% Heat-treated serum. Puis comme BBR 10% et HTS 100% pour 20ml = 4ml de BBR et 4ml de HTS, 12ml MABT)
- 6- Incuber 6h à RT avec 1 ml de MABT + 2% BBR + 20% Heat-treated serum + 1/2000 anti-DIG-AP
- 7- Rinçage MABT à 4°C O/N

### Troisième jour

- 1- Rincer 3x10 min en MABT
- 2- Laver 3x1h en MABT
- 3- Transférer les embryons en plaque 12 puits et laver 2x10min en NTMT (1ml). Couvrir avec de l'aluminium.
- 4- Incuber avec 1ml de BMPurple (laisser le BM à RT avant utilisation et le centrifuger 5min à 11000g). Poser la boîte recouverte d'aluminium sur la plateforme à balance. Vérifier régulièrement la coloration.
- 5- On peut arrêter la réaction et laver les embryons en MABT pour faire partir le bruit de fond. La réaction peut être relancée après sans problème.
- 6- On peut aussi diluer le BM purple en NTMT si la réaction va trop vite, ou placer les tubes à 4°C.

## **VI.E Marquage EdU**

Deposer 60  $\mu$ L d'EdU à 10  $\mu$ M sur les embryons et les remettre 1h à l'incubateur avant dissection. Réaliser la fixation et le marquage anticorps primaires et secondaires normalement puis rincer en PBS. Remplacer par la solution de Click-it pendant 30 min sur sections et 2h pour des embryons entiers puis rincer en PBS.

## **VI.F Imagerie et analyse**

### **Imagerie**

Les images ont été réalisés sur deux plateformes : Monash Micro Imaging (MMI, Clayton, Victoria, Australie) et le CICLE (Lyon, France).

Au MMI, un confocal Leica SP5 inversé 5-canaux a été utilisé à l'aide du logiciel LAS. Un scanner résonnant a été utilisé avec une vitesse de scan de 8000 Hertz. La puissance du laser était généralement de 20%. Le moyennage des images était compris entre 8 et 16. 3 objectifs ont été utilisés : 20 X multi-immersion NA 0.7, 40 X oil NA 1.25 et 63 X glycerol NA 1.3.

Au CICLE, un confocal Leica SP5 inversé 5-canaux a été utilisé à l'aide du logiciel LAS. Un scanner résonnant a été utilisé avec une vitesse de scan de 8000 Hertz.

La puissance du laser blanc était généralement de 70%. Le moyennage des images était compris entre 8 et 16. 3 objectifs ont été utilisés : 20 X multi-immersion NA 0.7, 40 X oil NA 1.25 et 63 X glycerol NA 1.3.

### **Analyse**

Les stack confocaux ont été analysés sur Imaris (Bitplane). Les comptages et quantifications ont été réalisés sur ImageJ (NIH). Les analyses statistiques ont été réalisées sur Prism (GraphPad). Les figures et graphiques ont été réalisées à l'aide de Powerpoint et d'Adobe Illustrator CS5.1.

## **VI.G Fixation et marquages sur sections**

### **Fixation**

Après électroporation et une fois les embryons ayant atteint le stade désiré, ceux-ci sont disséqués grossièrement et fixés à plat à l'aide d'épingles d'entomologie. Les embryons sont

fixés dans une solution de formaldéhyde à 4% dans du PBS pendant 1h à température ambiante. 2 lavages dans du PBS sont ensuite réalisés.

## **Cryosection**

Les embryons sont inclus dans une solution de sucrose 15% puis une solution de sucrose 15%/gélatine 7,5% à 42°C. Les embryons sont ensuite déposés dans des moules et la solution est laissée à température ambiante afin de permettre sa solidification. Les blocs sont congelés à l'aide d'une solution d'éthanol et carboglace. Avant section, les blocs peuvent être conservés quelques heures à -80°C. L'épaisseur des coupes est d'environ 30µm pour les embryons électroporés et 15µm pour les embryons destinés à des hybridations in situ.

## **Marquage**

Après un minimum de 30min de séchage, les lames peuvent être stockées à -20°C avant d'être marquées.

Les lames sont plongées 5min dans du PBS à 42° C afin de retirer la gélatine entourant les sections. Elles sont ensuite rincées dans du PBS à température ambiante.

Les lames incubées dans du washing buffer pendant 1h puis une solution d'anticorps primaires dilués dans du washing buffer est déposée sur les lames pour la nuit à 4°C.

3 lavages de 15min dans du washing buffer sont réalisés. Les anticorps secondaires sont dilués au 1/500 dans du washing buffer et déposés 1h sur les lames. Au minimum 3 lavages de 10 min au PBS sont réalisés le jour suivant jusqu'à disparition du bruit de fond.

## **Montage**

Après le dernier rinçage, 30 µL de Fluoromont, avec ou sans DAPI, sont déposés sur la lame avant ajout de la lamelle.

## **VI.H Biologie moléculaire- plasmide utilisés**

J'ai utilisé un nombre certain de plasmides durant ma thèse. Ceux que j'ai construits sont en vert. J'ai construit ces plasmides via Gibson ou digestion enzymatique. Les plasmides construits au laboratoire ou provenant de l'extérieur sont en noir.

nom	provenance		
T2-Caggs-BFP		pCMV-mWasabi-Zyxin6	addgene n° 56513
pCaggs-eGFP		pCMV-Ypet-N1	addgene n° 54637
pCaggs-HANICD-6xmyc		pCMV-3xFlag-mNICD4	addgene n° 20186
Caggs-CD4-HANICD-6xmyc		Caggs-GFP	
pCaggs-WT-betaCat-6xmyc		TF12x-d2eGFP	
Caags-betaCat Y489-6xmyc		H2B-mCherry	
Caggs-H2B-RFP		T2-Caggs-RttA-IRES-nls-mCherry	
T2-Caggs-H2B-BFP		pCMV-mTFP1-Zo1-C14	addgene n° 55518
pHes5-nls-d2eGFP		pCMX mRBPj CA	
TF12x-DsRedexpDR		Hes1-DsRedexpDR	
pCMV-mWasabiN1	addgene n°54765	Hes1-Venus-nls-Pest	
pCMV-mTFP1N1	addgene n°54521	T2-Hes1-eGFPcaax	
pCIG-V5-Snail2-IRES-NLS-GFP	addgene n°44282	T2-TF12x-TK-DsRedExpressDR	
pHes5-DsRedexpDR		T2-MLC-nls-mCherry-IRES-eGFP-caax	
pHes5-Venus-nls-Pest		T2-Hes1d2eGFP	
pCS2-HA-Lef1-VP16		T2-Caggs-GFP	
T2-pHes1-d2eGFP	Kageyama	U2-Tk-eGFP	
T2-TF12x-BFP		U3-Tk-eGFP	
pCMV-mVenus-ZO1-C-14	addgene n°56394	Caggs mCherryCaax IRES nlsGFP	
pHes5-TagBFP		TF12x TK GFP	
pCMV-mTFP1-Paxillin-22	addgene n°55504	Hes1 GFP	
pCMV-3xFlag-mNICD1	addgene n°20183	pCMX mRBPj WT	
pCMV-3xFlag-mNICD2	addgene n°20184	GSK3 biosensor	
pHes5-d2eGFP		pHes5-VNP	Domingo
pHes1-eGFP		EST 79n10 (Snail2)	
Caggs-RFP		EST 702b3 (SOX10)	
T2-TF12x-d2eGFP		pCaggs-Tomato	Castellani
pCMV-sfGFP-vimentin-7	addgene n°56489	tdTom-2A-H2B-GFP	Courchet
pCMV-mWasabi-vinculin23	addgene n°56512	Hes5-TdTomato	
pCMX mRBPj Dn		pHes5-Wasabi	
Sox10 E1-GFP	Marianne Bronner	TdTomato-C1	Addgene n°54653
pHes1-DsRedExpDR		peGFP-HA-Akt1	Addgene n°39531
pBI-CD4-HA-NICD-myc		HA-Akt DN (K179M)	Addgene n°16243
Caggs-H2B-BFP		pCX-NICD-DeltaRamAnk	
pT2-Caggs-rtTA	Pourquier	pCX-NICD-DeltaAnk	
pCMV-3xFlag-mNICD3	addgene	pCaax-CD4-NICD-DeltaRamAnk	
T2-pHes1-DsRedExpDR		pCaax-CD4-NICD-DeltaAnk	
		pCX-HA-NICD1mouse	



pCX-HA-NICD2mouse  
 pCX-HA-NICD3mouse  
 pCX-HA-NICD4mouse  
 pHes5-d2eGFP-nls-IRES2-Tomato  
 pHes5-Tomato-nls-PEST-IRES2-eGFP  
 pHes5-Tomato-nls-PEST-IRES2-  
 eGFPcaax  
 pCaggs-HA-CD4-Ram(NICD)-6xmyc  
 pCaggs-HA-Ram (NICD)-6xmyc  
 pU2-H2B-BFP  
 pHes5-d2eGFP-P2A-NLS-Tom  
 pLNCX-myrAKT1m  
 biosensor GSK3 Lyon  
 pU3-Syn21-H2B-BFP  
 pHes5-IVS-Syn21-d2eGFPnls-P2A-Tom  
 pHes5-d2eGFPnls-P2A-Tom-p10

pCaggs-Dn AKT-6xHis  
 pSV40 BFP  
 pSV40 H2B BFP  
 pCaggs-Akt-6xHis  
 pCaggs-myrAkt-6xHis  
 pHes5-d2eGFP-P2A-NLS-mCherry  
 pU2-Syn21-GFP version1  
 pHes5-DsRedExDR-Ires-nls-eGFP  
 pFucci-G1 orange-IRES-nls-eGFP-PCNA  
 pHes5-d2eGFP-IRES-H2B-mRFP1  
 pHes5-d2eGFP-P2A-H2B-mRFP1  
 addgene n° 17245 pHes5-NLSmCherry-IRES2-eGFPcaax  
 pHes5-NLSmCherry-IRES-d2eGFP  
 pCaggs-CD4-DnAkt-6xHis  
 pCaggs-CD4-Akt-6xHis  
 pCaggs-VP16-SLUG-IRES-NLS-MCHERRY

toulouse

## VI.I Solutions

### Ringer 1X (5000 ml)

-36 g	NaCl
-1.2 g	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
-18 g	KCl
-qsp	Eau stérile

Ajouter 1/25 Penicilline/Streptomycine

### solution d'ADN 1X (15 µL)

-15 µg	ADN (plasmide)
-2.5 µL	1% haute viscosité carboxyméthylcellulose
-0.75 µL	20% fast green dye
-0.3 µL	50 mM MgCl <sub>2</sub>
-1.5 µL	PBS 10X
-qsp	Eau stérile

### washing buffer 1X (500mL)

-1 g	BSA
-500 µl	Triton
-500 µl	SDS 20%
-50 ml	10X PBS
-qsp	Eau stérile

### 1X NTMT (50 ml) -1 ml

-1ml	1M NaCl
-5 ml	1M TrisHCl pH 9.5
-2.5 ml	1M MgCl <sub>2</sub>
-500 µl	tweenK20
-qsp	Eau sterile

### 1X MABT (1000 ml)

-8.7 g	NaCl
-11.6g	Acide maléique
-10 ml	Tween-20
-qsp	Eau stérile

### 1X Blocking solution

-1g	BSA
-500 µl	Triton
-500 µl	SDS 20%
-50ml	10X PBS
-qsp	Eau stérile

### Click-it (1mL)

-Tris 2M, pH8	50 µL
-CuSO <sub>4</sub> 1M	1 µL
-Fluoroazide (100µM)	2 µL
-Acide ascorbique 0,5M	200 µL (à mettre en dernier)
-PBS	747 µL

## 1X Hybridisation mix (500 ml)

-250 ml	formamide ultrapure
-32.5 ml	20x SSC pH 50.5 M
-5 ml	EDTA pH 8
-1.25 ml	Tween-20
-1 ml	CHAPS
-2.5 g	heparin
-50 mg	sodium
-qsp	Eau stérile

pHer à 7,5 à l'aide de tris en poudre

## VI.J Anticorps utilisés

### Anticorps primaires

nom	antigène	ref	société
acetylated tubulin	mouse monoclonal	T7451	sigma
Akt	Rabbit	9272S	ozyme
beta catenin (P Tyr489)	Rabbit	ORB155829	interchim
c myc	rabbit	5605S	CS
c myc (9E10)	monoclonal mouse	ab32	abcam
cadherin 6B	mouse IgG I	CCD6B 1	DSHB
Cdk2 phospho Y15	mouse monoclonal	76146	abcam
Cdk4	mouse monoclonal	108357	abcam
cyclin B1	monoclonal mouse	32053	abcam
cyclin D1	monoclonal rabbit	ab16663	abcam
cyclin D1	monoclonal Rabbit	134175	abcam
cyclin D1	monoclonal Rabbit	16663	abcam
cyclin D1	monoclonal mouse	6152	abcam
cyclin E1	monoclonal mouse	3927	abcam
desmin	monoclonal mouse	D1033	sigma
flag	polyclonal chicken	ab1170	abcam
flag™	rabbit	F7425	sigma
GAPDH (14C10)	Rabbit monoclonal	2118	ozyme
GFP	polyclonal Rabbit	ab6556	abcam
GFP	rabbit	OSE00002W	invitrogen
GFP	polyclonal chicken	ab13970	abcam
GFP tag(3E6)	mouse IgG lia	a 11120	thermo
GSK3β (3D10)	monoclonal Mouse	9832	ozyme
HA	mouse IgG1	ab 1424	abcam

Ha Tag (C29F4)	Rabbit	3724S	ozyme
HA-Tag (6E2)	monoclonal mouse	2367	ozyme
histone H3, C-terminal body	rabbit IgG	61277	active motif
HNK1	mouse IgM	3H5	DSHB
MF 20	mouse IgGIIb		DSHB
muscle marker	mouse IgM	13F4	DSHB
myosin	mouse IgGIIb		DSHB
N-Cadherin (GC4)	monoclonal mouse	C2542	sigma
p-GSK-3beta (Ser9)	polyclonal goat	sc-11757	santa cruz
p-GSK3-3beta (Tyr216)	polyclonal rabbit	sc-135653	santa cruz
p-GSK3-3beta (Tyr216)	mouse IgG1	612312	bioscience
Pax 3	mouse IgGIIa		DSHB
Pax7	mouse IgG I		DSHB
phospho-Akt (Ser473)	Rabbit	4060S	ozyme
phospho-Akt (Thr308)	Rabbit	13038S	ozyme
Phospho-GSK3β (ser9)	monoclonal Rabbit	5558	ozyme
RFP	mouse monoclonal	2702202	sigma
RFP	mouse monoclonal	2702214	sigma
RFP	monoclonal mouse	ab65856	abcam
RFP	polyclonal rabbit	ab62341	abcam
RFP 2	rabbit	AV34143	sigma
Slug	mouse IgG I	62.1E6	DSHB
snail	Rabbit	3879S	CS
Sox10	Rabbit	ab27655	abcam
ZO1	rat IGG I	R26 4C	DSHB

## Anticorps secondaires

Tous les anticorps secondaires que j'ai utilisé proviennent de ThermoFisher., des Alexa Fluor utilisés au 1/1000.

# VII Bibliographie

*« Plus grande est notre connaissance, plus grande est notre ignorance. »*

*Alain Leblay*



- Ahmed, N., Maines-Bandiera, S., Quinn, M.A., Unger, W.G., Dedhar, S., and Auersperg, N. (2006). Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, C1532-1542.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B. *Curr. Biol.* 7, 261–269.
- Andersen, P., Uosaki, H., Shenje, L.T., and Kwon, C. (2012). Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol.* 22, 257–265.
- Andjelković, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., and Hemmings, B.A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 272, 31515–31524.
- Aoyama, H., and Asamoto, K. (1988). Determination of somite cells: independence of cell differentiation and morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 104, 15–28.
- Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbinavar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y., and Slamon, D.J. (2003). Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 63, 196–206.
- Archives of Neurology (1951). The Neural Crest: Its Properties and Derivatives in the Light of Experimental Research. *AMA Arch. Neurol. Psychiatry* 65, 792–792.
- Arend, R.C., Londoño-Joshi, A.I., Straughn, J.M., and Buchsbaum, D.J. (2013). The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in ovarian cancer: a review. *Gynecol. Oncol.* 131, 772–779.
- Arnoux, V., Nassour, M., L'Helgoualc'h, A., Hipskind, R.A., and Savagner, P. (2008). Erk5 Controls Slug Expression and Keratinocyte Activation during Wound Healing. *Mol. Biol. Cell* 19, 4738–4749.
- Artavanis-Tsakonas, S., and Muskavitch, M.A.T. (2010). Chapter One - Notch: The Past, the Present, and the Future. In *Current Topics in Developmental Biology*, R. Kopan, ed. (Academic Press), pp. 1–29.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.
- Ayaz, F., and Osborne, B.A. (2014). Non-canonical notch signaling in cancer and immunity. *Front. Oncol.* 4, 345.
- Aybar, M.J. (2003). Snail precedes Slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the *Xenopus* neural crest. *Development* 130, 483–494.
- Baker, C.V., and Bronner-Fraser, M. (1997). The origins of the neural crest. Part I: embryonic induction. *Mech. Dev.* 69, 3–11.
- Bardeen, C. (1900). The development of the musculature of the body wall in the pig. *Johns Hopkins Hosp Rep Vol 9 Pp* 367–399.
- Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Dev. Camb. Engl.* 132, 3151–3161.
- del Barrio, M.G., and Nieto, M.A. (2002). Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development* 129, 1583–1593.
- Basch, M.L., Bronner-Fraser, M., and García-Castro, M.I. (2006). Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature* 441, 218–222.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638–642.
- Bénazéraf, B., Francois, P., Baker, R.E., Denans, N., Little, C.D., and Pourquie, O. (2010). A random cell motility gradient downstream of FGF controls elongation of an amniote embryo. *Nature* 466, 248–252.

- Bhatt, S., Diaz, R., and Trainor, P.A. (2013). Signals and Switches in Mammalian Neural Crest Cell Differentiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008326–a008326.
- Bielen, H., and Houart, C. (2014). The Wnt cries many: Wnt regulation of neurogenesis through tissue patterning, proliferation, and asymmetric cell division. *Dev. Neurobiol.* 74, 772–780.
- Bjornson, C.R.R., Cheung, T.H., Liu, L., Tripathi, P.V., Steeper, K.M., and Rando, T.A. (2012). Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 232–242.
- Bolos, V. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell Sci.* 116, 499–511.
- Borello, U., Berarducci, B., Murphy, P., Bajard, L., Buffa, V., Piccolo, S., Buckingham, M., and Cossu, G. (2006). The Wnt/beta-catenin pathway regulates Gli-mediated Myf5 expression during somitogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 133, 3723–3732.
- Borycki, A.G., and Emerson, C.P. (1997). Muscle determination: another key player in myogenesis? *Curr. Biol. CB* 7, R620–623.
- Bosada, F.M., Devasthali, V., Jones, K.A., and Stankunas, K. (2016). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling enables developmental transitions during valvulogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 143, 1041–1054.
- Boutet, A., De Frutos, C.A., Maxwell, P.H., Mayol, M.J., Romero, J., and Nieto, M.A. (2006). Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J.* 25, 5603–5613.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., and Lopez-Rios, J. (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J. Cell Sci.* 121, 737–746.
- Boyd, J. (1960). Development of striated muscle. *Struct. Funct. Muscle.*
- Bozulic, L., Surucu, B., Hynx, D., and Hemmings, B.A. (2008). PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol. Cell* 30, 203–213.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., and Kirchner, T. (2001). Variable  $\beta$ -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10356–10361.
- Brand-Saberi, B., Wiltling, J., Ebensperger, C., and Christ, B. (1996). The formation of somite compartments in the avian embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 411–420.
- Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E., and Arnold, H.H. (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* 8, 701–709.
- Braun, T., Bober, E., Winter, B., Rosenthal, N., and Arnold, H.H. (1990). Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J.* 9, 821–831.
- Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 678–689.
- Brent, A.E., and Tabin, C.J. (2004). FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate scleraxis expression. *Dev. Camb. Engl.* 131, 3885–3896.
- Brent, A.E., Schweitzer, R., and Tabin, C.J. (2003). A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* 113, 235–248.
- Brodgers-Bondon, F., Paul-Gilloteaux, P., Gazquez, E., Heysch, J., Piel, M., Mayor, R., Lambris, J.D., and Dufour, S. (2016). Control of the collective migration of enteric neural crest cells by the Complement anaphylatoxin C3a and N-cadherin. *Dev. Biol.* 414, 85–99.
- Bryson-Richardson, R.J., and Currie, P.D. (2008). The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 9, 632–646.
- Buckingham, M. (1996). Skeletal muscle development and the role of the myogenic regulatory factors. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 506–509.

- Buckingham, M. (2006). Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 525–532.
- Bush, G., diSibio, G., Miyamoto, A., Denault, J.B., Leduc, R., and Weinmaster, G. (2001). Ligand-induced signaling in the absence of furin processing of Notch1. *Dev. Biol.* 229, 494–502.
- Cabrera, C.V., Alonso, M.C., Johnston, P., Phillips, R.G., and Lawrence, P.A. (1987). Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. *Cell* 50, 659–663.
- Calleja, V., Laguerre, M., Parker, P.J., and Larijani, B. (2009). Role of a Novel PH-Kinase Domain Interface in PKB/Akt Regulation: Structural Mechanism for Allosteric Inhibition. *PLoS Biol.* 7.
- Calzavara, E., Chiaramonte, R., Cesana, D., Basile, A., Sherbet, G.V., and Comi, P. (2008). Reciprocal regulation of Notch and PI3K/Akt signalling in T-ALL cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* 103, 1405–1412.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2, 76–83.
- Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., and Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11452–11457.
- Carmona-Fontaine, C., Matthews, H.K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G.A., Parsons, M., Stern, C.D., and Mayor, R. (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature* 456, 957–961.
- Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., et al. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448, 439–444.
- Carver, E.A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K.F., and Gridley, T. (2001). The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8184–8188.
- Catala, M., Teillet, M.A., Robertis, E.M.D., and Douarin, M.L.L. (1996). A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* 122, 2599–2610.
- Chan, T.O., and Tsichlis, P.N. (2001). PDK2: a complex tail in one Akt. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2001, pe1.
- Chanrion, M., Kuperstein, I., Barrière, C., El Marjou, F., Cohen, D., Vignjevic, D., Stimmer, L., Paul-Gilloteaux, P., Bièche, I., Tavares, S.D.R., et al. (2014). Concomitant Notch activation and p53 deletion trigger epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in mouse gut. *Nat. Commun.* 5, 5005.
- Charrier-Savournin, F.B., Château, M.-T., Gire, V., Sedivy, J., Piette, J., and Dulic, V. (2004). p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress. *Mol. Biol. Cell* 15, 3965–3976.
- Chen, C.-H., Shaikenov, T., Peterson, T.R., Aimbetov, R., Bissenbaev, A.K., Lee, S.-W., Wu, J., Lin, H.-K., and Sarbassov, D.D. (2011). ER stress inhibits mTORC2 and Akt signaling through GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation of rictor. *Sci. Signal.* 4, ra10.
- Chen, W., ten Berge, D., Brown, J., Ahn, S., Hu, L.A., Miller, W.E., Caron, M.G., Barak, L.S., Nusse, R., and Lefkowitz, R.J. (2003). Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 301, 1391–1394.
- Chen, X., Xiao, W., Liu, X., Zeng, M., Luo, L., Wu, M., Ye, S., and Liu, Y. (2014). Blockade of Jagged/Notch pathway abrogates transforming growth factor  $\beta$ 2-induced epithelial-mesenchymal transition in human retinal pigment epithelium cells. *Curr. Mol. Med.* 14, 523–534.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407–413.
- Chin, Y.R., and Toker, A. (2010). The actin-bundling protein palladin is an Akt1-specific substrate that regulates breast cancer cell migration. *Mol. Cell* 38, 333–344.
- Choi, S.-C., and Han, J.-K. (2002). *Xenopus* Cdc42 regulates convergent extension movements during

- gastrulation through Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway. *Dev. Biol.* 244, 342–357.
- Christ, B., and Scaal, M. (2008). Formation and differentiation of avian somite derivatives. *Adv. Exp. Med. Biol.* 638, 1–41.
- Christ, B., Huang, R., and Scaal, M. (2004). Formation and differentiation of the avian sclerotome. *Anat. Embryol. (Berl.)* 208, 333–350.
- Christiansen, J.H., Dennis, C.L., Wicking, C.A., Monkley, S.J., Wilkinson, D.G., and Wainwright, B.J. (1995). Murine Wnt-11 and Wnt-12 have temporally and spatially restricted expression patterns during embryonic development. *Mech. Dev.* 51, 341–350.
- Cinnamon, Y., Kahane, N., Bachelet, I., and Kalcheim, C. (2001). The sub-lip domain—a distinct pathway for myotome precursors that demonstrate rostral-caudal migration. *Dev. Camb. Engl.* 128, 341–351.
- Ciruna, B., and Rossant, J. (2001). FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev. Cell* 1, 37–49.
- Clevers, H., Loh, K.M., and Nusse, R. (2014). Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346, 1248012.
- Colas, J.F., and Schoenwolf, G.C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 221, 117–145.
- Coleman, M.E., DeMayo, F., Yin, K.C., Lee, H.M., Geske, R., Montgomery, C., and Schwartz, R.J. (1995). Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 270, 12109–12116.
- Coles, E.G., Taneyhill, L.A., and Bronner-Fraser, M. (2007). A critical role for Cadherin6B in regulating avian neural crest emigration. *Dev. Biol.* 312, 533–544.
- Conboy, I.M., Conboy, M.J., Smythe, G.M., and Rando, T.A. (2003). Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 302, 1575–1577.
- Cooke, J. (1975). Control of somite number during morphogenesis of a vertebrate, *Xenopus laevis*. *Nature* 254, 196–199.
- Cooke, J., and Zeeman, E.C. (1976). A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J. Theor. Biol.* 58, 455–476.
- Cordle, J., Johnson, S., Tay, J.Z.Y., Roversi, P., Wilkin, M.B., de Madrid, B.H., Shimizu, H., Jensen, S., Whiteman, P., Jin, B., et al. (2008a). A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 849–857.
- Cordle, J., Redfieldz, C., Stacey, M., van der Merwe, P.A., Willis, A.C., Champion, B.R., Hambleton, S., and Handford, P.A. (2008b). Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity. *J. Biol. Chem.* 283, 11785–11793.
- Dahl, E., Koseki, H., and Balling, R. (1997). Pax genes and organogenesis. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 19, 755–765.
- Dale, J.K., Malapert, P., Chal, J., Vilhais-Neto, G., Maroto, M., Johnson, T., Jayasinghe, S., Trainor, P., Herrmann, B., and Pourquié, O. (2006). Oscillations of the snail genes in the presomitic mesoderm coordinate segmental patterning and morphogenesis in vertebrate somitogenesis. *Dev. Cell* 10, 355–366.
- Daniels, D.L., and Weis, W.I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 364–371.
- Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000.
- De Calisto, J., Araya, C., Marchant, L., Riaz, C.F., and Mayor, R. (2005). Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Dev. Camb. Engl.* 132, 2587–2597.
- DeBEER, G.R. (1947). The differentiation of neural crest cells into visceral cartilages and odontoblasts in *Amblystoma*, and a re-examination of the germ-layer theory. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 134, 377–398.

- Denetclaw, W.F., and Ordahl, C.P. (2000). The growth of the dermomyotome and formation of early myotome lineages in thoracolumbar somites of chicken embryos. *Dev. Camb. Engl.* 127, 893–905.
- Denetclaw, W.F., Christ, B., and Ordahl, C.P. (1997). Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Dev. Camb. Engl.* 124, 1601–1610.
- Denetclaw, W.F., Berdugo, E., Venters, S.J., and Ordahl, C.P. (2001). Morphogenetic cell movements in the middle region of the dermomyotome dorsomedial lip associated with patterning and growth of the primary epaxial myotome. *Dev. Camb. Engl.* 128, 1745–1755.
- Dequéant, M.-L., and Pourquié, O. (2008). Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nat. Rev. Genet.* 9, 370–382.
- Dietrich, S., Schubert, F.R., and Lumsden, A. (1997). Control of dorsoventral pattern in the chick paraxial mesoderm. *Dev. Camb. Engl.* 124, 3895–3908.
- Dillon, R.L., Marcotte, R., Hennessy, B.T., Woodgett, J.R., Mills, G.B., and Muller, W.J. (2009). Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res.* 69, 5057–5064.
- Dockter, J., and Ordahl, C.P. (2000). Dorsoventral axis determination in the somite: a re-examination. *Dev. Camb. Engl.* 127, 2201–2206.
- le douarin, N.M.L., and kalcheim, c (1982). the neural crest.
- Duband, J.L., Dufour, S., Hatta, K., Takeichi, M., Edelman, G.M., and Thiery, J.P. (1987). Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *J. Cell Biol.* 104, 1361–1374.
- Duband, J.L., Monier, F., Delannet, M., and Newgreen, D. (1995). Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development. *Acta Anat. (Basel)* 154, 63–78.
- Dubrulle, J., and Pourquie, O. (2003). Welcome to syndetome: a new somitic compartment. *Dev. Cell* 4, 611–612.
- Dubrulle, J., McGrew, M.J., and Pourquié, O. (2001). FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* 106, 219–232.
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., and Greenberg, M.E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661–665.
- Dunwoodie, S.L., Henrique, D., Harrison, S.M., and Beddington, R.S. (1997). Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* 124, 3065–3076.
- Dupont, J., and LeRoith, D. (2001). Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm. Res.* 55 Suppl 2, 22–26.
- Duquette, P.M., and Lamarche-Vane, N. (2014). Rho GTPases in embryonic development. *Small GTPases* 5.
- Edmondson, D.G., and Olson, E.N. (1989). A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* 3, 628–640.
- Emerson, C.P. (1990). Myogenesis and developmental control genes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 1065–1075.
- Endo, Y., Osumi, N., and Wakamatsu, Y. (2002). Bimodal functions of Notch-mediated signaling are involved in neural crest formation during avian ectoderm development. *Dev. Camb. Engl.* 129, 863–873.
- Espinoza, I., and Miele, L. (2013). Deadly crosstalk: Notch signaling at the intersection of EMT and cancer stem cells. *Cancer Lett.* 341, 41–45.
- Fahrbach, F.O., Gurchenkov, V., Alessandri, K., Nassoy, P., and Rohrbach, A. (2013). Light-sheet microscopy in thick media using scanned Bessel beams and two-photon fluorescence excitation. *Opt Express* 21, 13824–13839.
- Falke, L.L., Gholizadeh, S., Goldschmeding, R., Kok, R.J., and Nguyen, T.Q. (2015). Diverse origins of



the myofibroblast—implications for kidney fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* 11, 233–244.

Fan, C.M., Lee, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (1997). A role for WNT proteins in induction of dermomyotome. *Dev. Biol.* 191, 160–165.

Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D., and Hemmings, B.A. (2004). Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 279, 41189–41196.

Feng, J., Sun, Q., Liu, L., and Xing, D. (2015). Photoactivation of TAZ via Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway promotes osteogenic differentiation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 66, 59–68.

Fernández-Sánchez, M.E., Barbier, S., Whitehead, J., Béalle, G., Michel, A., Latorre-Ossa, H., Rey, C., Fouassier, L., Claperon, A., Brullé, L., et al. (2015). Mechanical induction of the tumorigenic  $\beta$ -catenin pathway by tumour growth pressure. *Nature* 523, 92–95.

Fiúza, U.-M., and Arias, A.M. (2007). Cell and molecular biology of Notch. *J. Endocrinol.* 194, 459–474.

Flier, S.N., Tanjore, H., Kokkotou, E.G., Sugimoto, H., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2010). Identification of epithelial to mesenchymal transition as a novel source of fibroblasts in intestinal fibrosis. *J. Biol. Chem.* 285, 20202–20212.

Franz, T., Kothary, R., Surani, M.A., Halata, Z., and Grim, M. (1993). The Splotch mutation interferes with muscle development in the limbs. *Anat. Embryol. (Berl.)* 187, 153–160.

Fre, S., Pallavi, S.K., Huyghe, M., Laé, M., Janssen, K.-P., Robine, S., Artavanis-Tsakonas, S., and Louvard, D. (2009). Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 6309–6314.

Frías, A., Lambies, G., Viñas-Castells, R., Martínez-Guillamon, C., Dave, N., García de Herreros, A., and Díaz, V.M. (2016). A Switch in Akt Isoforms Is Required for Notch-Induced Snail1 Expression and Protection from Cell Death. *Mol. Cell. Biol.* 36, 923–940.

Futterman, M.A., García, A.J., and Zamir, E.A. (2011). Evidence for partial epithelial-to-mesenchymal transition (pEMT) and recruitment of motile blastoderm edge cells during avian epiboly. *Dev. Dyn.* 240, 1502–1511.

Gammill, L.S., and Bronner-Fraser, M. (2002). Genomic analysis of neural crest induction. *Dev. Camb. Engl.* 129, 5731–5741.

Gammill, L.S., and Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 795–805.

Gao, F., Huang, W., Zhang, Y., Tang, S., Zheng, L., Ma, F., Wang, Y., Tang, H., and Li, X. (2015). Hes1 promotes cell proliferation and migration by activating Bmi-1 and PTEN/Akt/GSK3 $\beta$  pathway in human colon cancer. *Oncotarget* 6, 38667–38680.

García-Castro, M.I., Marcelle, C., and Bronner-Fraser, M. (2002). Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* 297, 848–851.

Garside, V.C., Chang, A.C., Karsan, A., and Hoodless, P.A. (2013). Co-ordinating Notch, BMP, and TGF- $\beta$  signaling during heart valve development. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 2899–2917.

Ghahhari, N.M., and Babashah, S. (2015). Interplay between microRNAs and WNT/ $\beta$ -catenin signalling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 51, 1638–1649.

Gilbert, S. (2007). *Developmental Biology*. Eighth edition.

Glackin, C.A. (2014). Targeting the Twist and Wnt signaling pathways in metastatic breast cancer. *Maturitas* 79, 48–51.

Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357–362.

Goldbeter, A., and Pourquié, O. (2008). Modeling the segmentation clock as a network of coupled oscillations in the Notch, Wnt and FGF signaling pathways. *J. Theor. Biol.* 252, 574–585.

Goldstein, R.S., and Kalcheim, C. (1992). Determination of epithelial half-somites in skeletal morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 116, 441–445.

- Gonzalez, I., Tripathi, G., Carter, E.J., Cobb, L.J., Salih, D.A.M., Lovett, F.A., Holding, C., and Pell, J.M. (2004). Akt2, a novel functional link between p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 3607–3622.
- Gordon, W.R., Roy, M., Vardar-Ulu, D., Garfinkel, M., Mansour, M.R., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2009). Structure of the Notch1-negative regulatory region: implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL. *Blood* *113*, 4381–4390.
- Goulding, M.D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J.R., and Gruss, P. (1991). Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.* *10*, 1135–1147.
- Graf, S.A., Busch, C., Bosserhoff, A.-K., Besch, R., and Berking, C. (2014). SOX10 promotes melanoma cell invasion by regulating melanoma inhibitory activity. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 2212–2220.
- Grande, M.T., Sánchez-Laorden, B., López-Blau, C., De Frutos, C.A., Boutet, A., Arévalo, M., Rowe, R.G., Weiss, S.J., López-Novoa, J.M., and Nieto, M.A. (2015). Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat. Med.* *21*, 989–997.
- Greenburg, G., and Hay, E.D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* *95*, 333–339.
- Gridley, T. (1997). Notch signaling in vertebrate development and disease. *Mol. Cell. Neurosci.* *9*, 103–108.
- Gridley, T. (2003). Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum. Mol. Genet.* *12 Spec No 1*, R9–13.
- Grobet, L., Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Ménissier, F., Massabanda, J., et al. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. *Nat. Genet.* *17*, 71–74.
- Gros, J., Scaal, M., and Marcelle, C. (2004). A two-step mechanism for myotome formation in chick. *Dev. Cell* *6*, 875–882.
- Gros, J., Manceau, M., Thomé, V., and Marcelle, C. (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* *435*, 954–958.
- Gros, J., Serralbo, O., and Marcelle, C. (2009). WNT11 acts as a directional cue to organize the elongation of early muscle fibres. *Nature* *457*, 589–593.
- Grosshans, J., and Wieschaus, E. (2000). A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell* *101*, 523–531.
- Groves, A.K., and LaBonne, C. (2014). Setting appropriate boundaries: Fate, patterning and competence at the neural plate border. *Dev. Biol.* *389*, 2–12.
- Gubb, D., and García-Bellido, A. (1982). A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *68*, 37–57.
- Guémar, L., de Santa Barbara, P., Vignal, E., Maurel, B., Fort, P., and Faure, S. (2007). The small GTPase RhoV is an essential regulator of neural crest induction in *Xenopus*. *Dev. Biol.* *310*, 113–128.
- Hacker, A., and Guthrie, S. (1998). A distinct developmental programme for the cranial paraxial mesoderm in the chick embryo. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 3461–3472.
- Halata, Z., Grim, M., and Christ, B. (1990). Origin of spinal cord meninges, sheaths of peripheral nerves, and cutaneous receptors including Merkel cells. An experimental and ultrastructural study with avian chimeras. *Anat. Embryol. (Berl.)* *182*, 529–537.
- Hall, B.K. (2000). The Neural Crest as a Fourth Germ Layer and Vertebrates as Quadroblastic Not Triploblastic. *Evol. Dev.* *2* 3–5.
- Hall, B.K., and Gillis, J.A. (2013). Incremental evolution of the neural crest, neural crest cells and neural crest-derived skeletal tissues: Incremental evolution of the neural crest. *J. Anat.* *222*, 19–31.
- Hamilton, H. (1952). *Lillie's development of the chick, an introduction to embryology*. Holt Rinehart Winst. N. Y.
- Hammond, C.L., Hinits, Y., Osborn, D.P.S., Minchin, J.E.N., Tettamanti, G., and Hughes, S.M. (2007).

- Signals and myogenic regulatory factors restrict pax3 and pax7 expression to dermomyotome-like tissue in zebrafish. *Dev. Biol.* 302, 504–521.
- Han, X., Ju, J., and Shin, I. (2012). Glycogen synthase kinase 3- $\beta$  phosphorylates novel S/T-P-S/T domains in Notch1 intracellular domain and induces its nuclear localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 282–288.
- Hanada, M., Feng, J., and Hemmings, B.A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* 1697, 3–16.
- Harrington, M.J., Hong, E., and Brewster, R. (2009). Comparative analysis of neurulation: first impressions do not count. *Mol. Reprod. Dev.* 76, 954–965.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., et al. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2615–2624.
- Hay, E.D. (1995). An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Cells Tissues Organs* 154, 8–20.
- He, X., Semenov, M., Tamai, K., and Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Dev. Camb. Engl.* 131, 1663–1677.
- Heisenberg, C.-P., and Solnica-Krezel, L. (2008). Back and forth between cell fate specification and movement during vertebrate gastrulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 311–316.
- Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saúde, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C., and Wilson, S.W. (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405, 76–81.
- Helmchen, F., and Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* 2, 932–940.
- Hemavathy, K., Ashraf, S.I., and Ip, Y.T. (2000). Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257, 1–12.
- Hemmings, B.A., and Restuccia, D.F. (2015). The PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7.
- Héron-Milhavet, L., Franckhauser, C., Rana, V., Berthenet, C., Fisher, D., Hemmings, B.A., Fernandez, A., and Lamb, N.J.C. (2006). Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8267–8280.
- hertig, alexandre (2013). transition épithéliomésenchymateuse et fibrogénèse.
- Hirst, C.E., and Marcelle, C. (2015). The avian embryo as a model system for skeletal myogenesis. *Results Probl. Cell Differ.* 56, 99–122.
- His, W. (1868). Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbeltierleibes. Erste Entwicklung Hühnchens Im Ei FCW Vogel Leipz.
- Hoang, B., Moos, M., Vukicevic, S., and Luyten, F.P. (1996). Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to Drosophila frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 271, 26131–26137.
- Hoppler, S., Brown, J.D., and Moon, R.T. (1996). Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in Xenopus embryos. *Genes Dev.* 10, 2805–2817.
- Howard, S., Deroo, T., Fujita, Y., and Itasaki, N. (2011). A positive role of cadherin in Wnt/ $\beta$ -catenin signalling during epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 6, e23899.
- Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., and Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398, 431–436.
- Hsu, J., Shi, Y., Krajewski, S., Renner, S., Fisher, M., Reed, J.C., Franke, T.F., and Lichtenstein, A. (2001). The AKT kinase is activated in multiple myeloma tumor cells. *Blood* 98, 2853–2855.
- Hu, N., Strobl-Mazzulla, P.H., and Bronner, M.E. (2014). Epigenetic regulation in neural crest development. *Dev. Biol.* 396, 159–168.

- Huang, R., Zhi, Q., Neubüser, A., Müller, T.S., Brand-Saber, B., Christ, B., and Wilting, J. (1996). Function of somite and somitocoele cells in the formation of the vertebral motion segment in avian embryos. *Acta Anat. (Basel)* 155, 231–241.
- Huang, R.Y.-J., Wong, M.K., Tan, T.Z., Kuay, K.T., Ng, A.H.C., Chung, V.Y., Chu, Y.-S., Matsumura, N., Lai, H.-C., Lee, Y.F., et al. (2013). An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death Dis.* 4, e915.
- Huisken, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J., and Stelzer, E.H.K. (2004). Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 305, 1007–1009.
- Hutchinson, J.N., Jin, J., Cardiff, R.D., Woodgett, J.R., and Muller, W.J. (2004). Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res.* 64, 3171–3178.
- Illman, S.A., Lehti, K., Keski-Oja, J., and Lohi, J. (2006). Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *J. Cell Sci.* 119, 3856–3865.
- Ishida, T., Hijioka, H., Kume, K., Miyawaki, A., and Nakamura, N. (2013). Notch signaling induces EMT in OSCC cell lines in a hypoxic environment. *Oncol. Lett.* 6, 1201–1206.
- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E.G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* 110, 341–350.
- Jacob, M., Christ, B., and Jacob, H.J. (1979). The migration of myogenic cells from the somites into the leg region of avian embryos. An ultrastructural study. *Anat. Embryol. (Berl.)* 157, 291–309.
- Jacob, M., Christ, B., Jacob, H.J., and Poelmann, R.E. (1991). The role of fibronectin and laminin in development and migration of the avian Wolffian duct with reference to somitogenesis. *Anat. Embryol. (Berl.)* 183, 385–395.
- Jang, J., Byun, S.-H., Han, D., Lee, J., Kim, J., Lee, N., Kim, I., Park, S., Ha, S., Kwon, M., et al. (2014). Notch intracellular domain deficiency in nuclear localization activity retains the ability to enhance neural stem cell character and block neurogenesis in mammalian brain development. *Stem Cells Dev.* 23, 2841–2850.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377, 355–358.
- Jhingory, S., Wu, C.-Y., and Taneyhill, L.A. (2010). Novel insight into the function and regulation of  $\alpha$ N-catenin by Snail2 during chick neural crest cell migration. *Dev. Biol.* 344, 896–910.
- Jin, S., Mutvei, A.P., Chivukula, I.V., Andersson, E.R., Ramsköld, D., Sandberg, R., Lee, K.L., Kronqvist, P., Mamaeva, V., Ostling, P., et al. (2013). Non-canonical Notch signaling activates IL-6/JAK/STAT signaling in breast tumor cells and is controlled by p53 and IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ . *Oncogene* 32, 4892–4902.
- Jin, S., Borkhuu, O., Bao, W., and Yang, Y.-T. (2016). Signaling Pathways in Thyroid Cancer and Their Therapeutic Implications. *J. Clin. Med. Res.* 8, 284–296.
- Johansson, K.A., and Grapin-Botton, A. (2002). Development and diseases of the pancreas. *Clin. Genet.* 62, 14–23.
- Johnson, S.E., and Barrick, D. (2012). Dissecting and circumventing the requirement for RAM in CSL-dependent Notch signaling. *PLoS One* 7, e39093.
- Joiner, D.M., Ke, J., Zhong, Z., Xu, H.E., and Williams, B.O. (2013). LRP5 and LRP6 in development and disease. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 24, 31–39.
- Jordan, N.V., Johnson, G.L., and Abell, A.N. (2011). Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle* 10, 2865–2873.
- Jostes, B., Walther, C., and Gruss, P. (1990). The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech. Dev.* 33, 27–37.
- Julian, L., and Olson, M.F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases* 5, e29846.
- Jung, H., Lee, K.P., Park, S.J., Park, J.H., Jang, Y.-S., Choi, S.-Y., Jung, J.-G., Jo, K., Park, D.Y., Yoon, J.H., et al. (2008). Tmprss4 promotes invasion, migration and metastasis of human tumor cells by

- facilitating an epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 27, 2635–2647.
- Kablar, B., Krastel, K., Ying, C., Asakura, A., Tapscott, S.J., and Rudnicki, M.A. (1997). MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. *Dev. Camb. Engl.* 124, 4729–4738.
- Kaehn, K., Jacob, H.J., Christ, B., Hinrichsen, K., and Poelmann, R.E. (1988). The onset of myotome formation in the chick. *Anat. Embryol. (Berl.)* 177, 191–201.
- Kahane, N., Cinnamon, Y., and Kalcheim, C. (1998). The cellular mechanism by which the dermomyotome contributes to the second wave of myotome development. *Dev. Camb. Engl.* 125, 4259–4271.
- Kahane, N., Cinnamon, Y., Bachelet, I., and Kalcheim, C. (2001). The third wave of myotome colonization by mitotically competent progenitors: regulating the balance between differentiation and proliferation during muscle development. *Dev. Camb. Engl.* 128, 2187–2198.
- Kalcheim, C., and Burstyn-Cohen, T. (2005). Early stages of neural crest ontogeny: formation and regulation of cell delamination. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 105–116.
- Kaneko, S., Feldman, R.I., Yu, L., Wu, Z., Gritsko, T., Shelley, S.A., Nicosia, S.V., Nobori, T., and Cheng, J.Q. (2002). Positive feedback regulation between Akt2 and MyoD during muscle differentiation. Cloning of Akt2 promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 23230–23235.
- Kassar-Duchossoy, L., Giacone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomès, D., and Tajbakhsh, S. (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* 19, 1426–1431.
- Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C., and Wu, W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev. Cell* 7, 525–534.
- Kiefer, J.C., and Hauschka, S.D. (2001). Myf-5 is transiently expressed in nonmuscle mesoderm and exhibits dynamic regional changes within the presegmented mesoderm and somites I-IV. *Dev. Biol.* 232, 77–90.
- Kim, J.-S., Piao, S., Lee, E., Yoon, B.-Y., Moon, H.R., Lee, J., Jung, Y., and Ha, N.-C. (2013). Development of Akt-activated GSK3 $\beta$  inhibitory peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 735–739.
- Kim, K., Ossipova, O., and Sokol, S.Y. (2015). Neural crest specification by inhibition of the ROCK/Myosin II pathway. *Stem Cells Dayt. Ohio* 33, 674–685.
- Kim, K.K., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Robillard, L., Galvez, M.G., Brumwell, A.N., Sheppard, D., and Chapman, H.A. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13180–13185.
- Kimelman, D., and Xu, W. (2006). beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25, 7482–7491.
- Kitzmann, M., Carnac, G., Vandromme, M., Primig, M., Lamb, N.J., and Fernandez, A. (1998). The muscle regulatory factors MyoD and myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J. Cell Biol.* 142, 1447–1459.
- Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K., and Kageyama, R. (2009). The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes Dev.* 23, 1870–1875.
- Koch, U., and Radtke, F. (2007). Notch and cancer: a double-edged sword. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 64, 2746–2762.
- Kölsch, V., Seher, T., Fernandez-Ballester, G.J., Serrano, L., and Leptin, M. (2007). Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of adherens junctions and RhoGEF2. *Science* 315, 384–386.
- Komatsu, H., Chao, M.Y., Larkins-Ford, J., Corkins, M.E., Somers, G.A., Tucey, T., Dionne, H.M., White, J.Q., Wani, K., Boxem, M., et al. (2008). OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *PLoS Biol.* 6, e196.



- Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* 137, 216–233.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/colon carcinoma. *Science* 275, 1784–1787.
- Kos, R., Reedy, M.V., Johnson, R.L., and Erickson, C.A. (2001). The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Dev. Camb. Engl.* 128, 1467–1479.
- Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Sundberg, J.P., Beatus, P., Lendahl, U., Joutel, A., and Gridley, T. (2003). Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation. *Genes. N. Y. N* 2000 37, 139–143.
- LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (2000). Snail-Related Transcriptional Repressors Are Required in *Xenopus* for both the Induction of the Neural Crest and Its Subsequent Migration. *Dev. Biol.* 221, 195–205.
- Lagha, M., Kormish, J.D., Rocancourt, D., Manceau, M., Epstein, J.A., Zaret, K.S., Relaix, F., and Buckingham, M.E. (2008). Pax3 regulation of FGF signaling affects the progression of embryonic progenitor cells into the myogenic program. *Genes Dev.* 22, 1828–1837.
- Lauret, E. (2004). Les récepteurs Notch et leurs ligands: implications dans l'hématopoïèse. *Hématologie* 10, 41–46.
- Lavagnino, Z., Sancataldo, G., d'Amora, M., Follert, P., De Pietri Tonelli, D., Diaspro, A., and Cella Zanacchi, F. (2016). 4D (x-y-z-t) imaging of thick biological samples by means of Two-Photon inverted Selective Plane Illumination Microscopy (2PE-iSPIM). *Sci. Rep.* 6, 23923.
- Le Douarin, N. (1969). [Details of the interphase nucleus in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)]. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 103, 435–452.
- LeBon, L., Lee, T.V., Sprinzak, D., Jafar-Nejad, H., and Elowitz, M.B. (2014). Fringe proteins modulate Notch-ligand cis and trans interactions to specify signaling states. *ELife* 3.
- Lee, J.M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E.W. (2006). The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172, 973–981.
- Leong, K.G., and Karsan, A. (2006). Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* 107, 2223–2233.
- Lepilina, A., Coon, A.N., Kikuchi, K., Holdway, J.E., Roberts, R.W., Burns, C.G., and Poss, K.D. (2006). A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 127, 607–619.
- Leroy, P., and Mostov, K.E. (2007). Slug Is Required for Cell Survival during Partial Epithelial-Mesenchymal Transition of HGF-induced Tubulogenesis. *Mol. Biol. Cell* 18, 1943–1952.
- Li, L., Hutchins, B.I., and Kalil, K. (2009). Wnt5a induces simultaneous cortical axon outgrowth and repulsive axon guidance through distinct signaling mechanisms. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 5873–5883.
- Li, X., Cao, Y., Li, M., and Jin, F. (2018). Upregulation of HES1 Promotes Cell Proliferation and Invasion in Breast Cancer as a Prognosis Marker and Therapy Target via the AKT Pathway and EMT Process. *J. Cancer* 9, 757–766.
- Li, Y., Ma, J., Qian, X., Wu, Q., Xia, J., Miele, L., Sarkar, F.H., and Wang, Z. (2013). Regulation of EMT by Notch signaling pathway in tumor progression. *Curr. Cancer Drug Targets* 13, 957–962.
- Lin, X., and Perrimon, N. (1999). Dally cooperates with *Drosophila* Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature* 400, 281–284.
- Linask, K.K., Ludwig, C., Han, M.D., Liu, X., Radice, G.L., and Knudsen, K.A. (1998). N-cadherin/catenin-mediated morphoregulation of somite formation. *Dev. Biol.* 202, 85–102.
- Lindon, C., Montarras, D., and Pinset, C. (1998). Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts. *J. Cell Biol.* 140, 111–118.
- Linker, C. (2005). -Catenin-dependent Wnt signalling controls the epithelial organisation of somites

- through the activation of paraxis. *Development* 132, 3895–3905.
- Lipinski, M., Braham, K., Caillaud, J.-M., Carlu, C., and Tursz, T. (1983). HNK-1 antibody detects an antigen expressed on neuroectodermal cells. *J. Exp. Med.* 158, 1775–1780.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781–810.
- Lubman, O.Y., Korolev, S.V., and Kopan, R. (2004). Anchoring notch genetics and biochemistry; structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data. *Mol. Cell* 13, 619–626.
- Lubman, O.Y., Ilagan, M.X.G., Kopan, R., and Barrick, D. (2007). Quantitative Dissection of the Notch:CSL Interaction: Insights into the Notch Transcriptional Switch. *J. Mol. Biol.* 365, 577–589.
- Ma, S., Li, Q., and Pan, F. (2015). CXCR4 promotes GSK3 $\beta$  expression in pancreatic cancer cells via the Akt pathway. *Int. J. Clin. Oncol.* 20, 525–530.
- MacGrogan, D., Luna-Zurita, L., and de la Pompa, J.L. (2011). Notch signaling in cardiac valve development and disease. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 91, 449–459.
- Mahadevan, D., Powis, G., Mash, E.A., George, B., Gokhale, V.M., Zhang, S., Shakalya, K., Du-Cuny, L., Berggren, M., Ali, M.A., et al. (2008). Discovery of a novel class of AKT pleckstrin homology (PH) domain inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2621–2632.
- Mahou, P., Zimmerley, M., Loulier, K., Matho, K.S., Labroille, G., Morin, X., Supatto, W., Livet, J., Débarre, D., and Beaurepaire, E. (2012). Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing. *Nat. Methods* 9, 815–818.
- Manceau, M., Gros, J., Savage, K., Thomé, V., McPherron, A., Paterson, B., and Marcelle, C. (2008). Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. *Genes Dev.* 22, 668–681.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2002). Hitting the target: emerging technologies in the search for kinase substrates. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2002, pe49.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261–1274.
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A., and Niehrs, C. (2001). LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411, 321–325.
- Marcelle, C., Stark, M.R., and Bronner-Fraser, M. (1997). Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. *Dev. Camb. Engl.* 124, 3955–3963.
- Marcelle, C., Lesbros, C., and Linker, C. (2002). Somite patterning: a few more pieces of the puzzle. *Results Probl. Cell Differ.* 38, 81–108.
- Mariz, K., Ingolf, J.-B., Daniel, H., Teresa, N.J., and Erich-Franz, S. (2015). The Wnt inhibitor dickkopf-1: a link between breast cancer and bone metastases. *Clin. Exp. Metastasis* 32, 857–866.
- Maroulakou, I.G., Oemler, W., Naber, S.P., and Tschlis, P.N. (2007). Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res.* 67, 167–177.
- Martin, A.C., Kaschube, M., and Wieschaus, E.F. (2009). Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature* 457, 495–499.
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 9, 650–662.
- Mayr, E. (2003). *What evolution is* (London: Phoenix).
- McPherron, A.C., and Lee, S.J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12457–12461.
- Meier, S. (1979). Development of the chick embryo mesoblast. Formation of the embryonic axis and establishment of the metameric pattern. *Dev. Biol.* 73, 24–45.
- Meier, S. (1981). Development of the chick embryo mesoblast: morphogenesis of the prechordal plate and cranial segments. *Dev. Biol.* 83, 49–61.

- Mercado-Pimentel, M.E., and Runyan, R.B. (2007). Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Cells Tissues Organs* 185, 146–156.
- Miettinen, M., McCue, P.A., Sarlomo-Rikala, M., Biernat, W., Czapiewski, P., Kopczynski, J., Thompson, L.D., Lasota, J., Wang, Z., and Fetsch, J.F. (2015). Sox10--a marker for not only schwannian and melanocytic neoplasms but also myoepithelial cell tumors of soft tissue: a systematic analysis of 5134 tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 39, 826–835.
- Miner, J.H., and Wold, B. (1990). Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1089–1093.
- Mlodzik, M. (2002). Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet. TIG* 18, 564–571.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., and Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates  $\beta$ -catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391–399.
- Monsoro-Burq, A.-H. (2005). Sclerotome development and morphogenesis: when experimental embryology meets genetics. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 301–308.
- Monsoro-Burq, A.-H., Fletcher, R.B., and Harland, R.M. (2003). Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals. *Development* 130, 3111–3124.
- Morales, A.V., Acloque, H., Ocaña, O.H., de Frutos, C.A., Gold, V., and Nieto, M.A. (2007). Snail genes at the crossroads of symmetric and asymmetric processes in the developing mesoderm. *EMBO Rep.* 8, 104–109.
- Moritz, A., Li, Y., Guo, A., Villén, J., Wang, Y., MacNeill, J., Kornhauser, J., Sprott, K., Zhou, J., Possemato, A., et al. (2010). Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases. *Sci. Signal.* 3, ra64.
- Mosher, D.S., Quignon, P., Bustamante, C.D., Sutter, N.B., Mellersh, C.S., Parker, H.G., and Ostrander, E.A. (2007). A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet.* 3, e79.
- Müller, T.S., Ebensperger, C., Neubüser, A., Koseki, H., Balling, R., Christ, B., and Wilting, J. (1996). Expression of avian Pax1 and Pax9 is intrinsically regulated in the pharyngeal endoderm, but depends on environmental influences in the paraxial mesoderm. *Dev. Biol.* 178, 403–417.
- Münsterberg, A.E., and Lassar, A.B. (1995). Combinatorial signals from the neural tube, floor plate and notochord induce myogenic bHLH gene expression in the somite. *Dev. Camb. Engl.* 121, 651–660.
- Münsterberg, A.E., Kitajewski, J., Bumcrot, D.A., McMahon, A.P., and Lassar, A.B. (1995). Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev.* 9, 2911–2922.
- Murray, S.A., and Gridley, T. (2006). Snail family genes are required for left-right asymmetry determination, but not neural crest formation, in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10300–10304.
- Musumeci, G., Castrogiovanni, P., Coleman, R., Szychlinska, M.A., Salvatorelli, L., Parenti, R., Magro, G., and Imbesi, R. (2015). Somitogenesis: From somite to skeletal muscle. *Acta Histochem.* 117, 313–328.
- Nakagawa, S., and Takeichi, M. (1995). Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Dev. Camb. Engl.* 121, 1321–1332.
- Nakajima, Y., Yamagishi, T., Hokari, S., and Nakamura, H. (2000). Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP). *Anat. Rec.* 258, 119–127.
- Nakaya, Y., Kuroda, S., Katagiri, Y.T., Kaibuchi, K., and Takahashi, Y. (2004). Mesenchymal-epithelial transition during somitic segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1. *Dev. Cell* 7, 425–438.
- Nemoto, T. (2008). Living cell functions and morphology revealed by two-photon microscopy in intact neural and secretory organs. *Mol. Cells* 26, 113–120.

- Niehrs, C., and Acebron, S.P. (2012). Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J.* *31*, 2705–2713.
- Nieto, M.A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 155–166.
- Nieto, M.A., Sargent, M.G., Wilkinson, D.G., and Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by *Slug*, a zinc finger gene. *Science* *264*, 835–839.
- Nieto, M.A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R.A., and Thiery, J.P. (2016). EMT: 2016. *Cell* *166*, 21–45.
- Nimmagadda, S., Geetha-Loganathan, P., Scaal, M., Christ, B., and Huang, R. (2007). FGFs, Wnts and BMPs mediate induction of VEGFR-2 (Quek-1) expression during avian somite development. *Dev. Biol.* *305*, 421–429.
- Nofziger, D., Miyamoto, A., Lyons, K.M., and Weinmaster, G. (1999). Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 1689–1702.
- Oda, H., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1998). Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev. Biol.* *203*, 435–450.
- Ohtsuka, T., Imayoshi, I., Shimojo, H., Nishi, E., Kageyama, R., and McConnell, S.K. (2006). Visualization of embryonic neural stem cells using *Hes* promoters in transgenic mice. *Mol. Cell. Neurosci.* *31*, 109–122.
- Olivera-Martinez, I., Missier, S., Fraboulet, S., Thélu, J., and Dhouailly, D. (2002). Differential regulation of the chick dorsal thoracic dermal progenitors from the medial dermomyotome. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 4763–4772.
- Olivera-Martinez, I., Thélu, J., and Dhouailly, D. (2004). Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somitic dermomyotome. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 93–101.
- Ordahl, C.P., and Le Douarin, N.M. (1992). Two myogenic lineages within the developing somite. *Dev. Camb. Engl.* *114*, 339–353.
- Otto, A., Schmidt, C., and Patel, K. (2006). *Pax3* and *Pax7* expression and regulation in the avian embryo. *Anat. Embryol. (Berl.)* *211*, 293–310.
- Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquié, O. (1997). Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* *91*, 639–648.
- Palmeirim, I., Dubrulle, J., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquié, O. (1998). Uncoupling segmentation and somitogenesis in the chick presomitic mesoderm. *Dev. Genet.* *23*, 77–85.
- Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H.-J., Fusenig, N., Nieto, M.A., and Cano, A. (2004). *Snail* and *E47* repressors of *E-cadherin* induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J. Cell Sci.* *117*, 2827–2839.
- Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). *Snail*, *Zeb* and *bHLH* factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* *7*, 415–428.
- Perez-Alcala, S., Nieto, M.A., and Barbas, J.A. (2004). *LSox5* regulates *RhoB* expression in the neural tube and promotes generation of the neural crest. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 4455–4465.
- Peterson, R.T., and Schreiber, S.L. (1999). Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr. Biol. CB* *9*, R521–524.
- Piksarv, P., Marti, D., Le, T., Unterhuber, A., Stingl, A., Drexler, W., Andersen, P.E., and Dholakia, K. (2016). A Compact Two Photon Light Sheet Microscope for Applications in Neuroscience. In Conference on Lasers and Electro-Optics (2016), Paper ATu4O.5, (Optical Society of America), p. ATu4O.5.
- Pourquié, O. (2011). Vertebrate segmentation: from cyclic gene networks to scoliosis. *Cell* *145*, 650–663.
- Pourquié, O., Fan, C.M., Coltey, M., Hirsinger, E., Watanabe, Y., Bréant, C., Francis-West, P., Brickell, P., Tessier-Lavigne, M., and Le Douarin, N.M. (1996). Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for *BMP4*. *Cell* *84*, 461–471.
- Pownall, M.E., Strunk, K.E., and Emerson, C.P. (1996). Notochord signals control the transcriptional cascade of myogenic *bHLH* genes in somites of quail embryos. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 1475–1488.

- Prall, F. (2007). Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 50, 151–162.
- Puisieux, A., Brabletz, T., and Caramel, J. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat. Cell Biol.* 16, 488–494.
- Radisky, D.C., Levy, D.D., Littlepage, L.E., Liu, H., Nelson, C.M., Fata, J.E., Leake, D., Godden, E.L., Albertson, D.G., Nieto, M.A., et al. (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436, 123–127.
- Reis, C.R., Chen, P.-H., Srinivasan, S., Aguet, F., Mettlen, M., and Schmid, S.L. (2015). Crosstalk between Akt/GSK3 $\beta$  signaling and dynamin-1 regulates clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J.* 34, 2132–2146.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2004). Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev.* 18, 1088–1105.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435, 948–953.
- Remak, R. (1855). *Untersuchungen uber die entwicklung der wibelthiere.* G Reimer Berl.
- Resende, T.P., Andrade, R.P., and Palmeirim, I. (2014). Timing Embryo Segmentation: Dynamics and Regulatory Mechanisms of the Vertebrate Segmentation Clock. *BioMed Res. Int.* 2014.
- Rezk, S., Brynes, R.K., Nelson, V., Thein, M., Patwardhan, N., Fischer, A., and Khan, A. (2004). beta-Catenin expression in thyroid follicular lesions: potential role in nuclear envelope changes in papillary carcinomas. *Endocr. Pathol.* 15, 329–337.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50, 649–657.
- Rios, A.C., Denans, N., and Marcelle, C. (2010). Real-time observation of Wnt  $\beta$ -catenin signaling in the chick embryo. *Dev. Dyn.* 239, 346–353.
- Rios, A.C., Serralbo, O., Salgado, D., and Marcelle, C. (2011). Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH. *Nature* 473, 532–535.
- Rivera-Feliciano, J., Lee, K.-H., Kong, S.W., Rajagopal, S., Ma, Q., Springer, Z., Izumo, S., Tabin, C.J., and Pu, W.T. (2006). Development of heart valves requires Gata4 expression in endothelial-derived cells. *Dev. Camb. Engl.* 133, 3607–3618.
- Rockey, D.C., Bell, P.D., and Hill, J.A. (2015). Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure. *N. Engl. J. Med.* 372, 1138–1149.
- Rogler, G. (2014). New therapeutic avenues for treatment of fibrosis: can we learn from other diseases? *Dig. Dis. Basel Switz.* 32 Suppl 1, 39–49.
- Rosanò, L., Spinella, F., Di Castro, V., Decandia, S., Nicotra, M.R., Natali, P.G., and Bagnato, A. (2006). Endothelin-1 is required during epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer progression. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 231, 1128–1131.
- Rotwein, P., and Wilson, E.M. (2009). Distinct actions of Akt1 and Akt2 in skeletal muscle differentiation. *J. Cell. Physiol.* 219, 503–511.
- Ruan, K., Bao, S., and Ouyang, G. (2009). The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 2219–2230.
- Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H., and Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351–1359.
- Rusconi, J.C., and Corbin, V. (1998). Evidence for a novel Notch pathway required for muscle precursor selection in *Drosophila*. *Mech. Dev.* 79, 39–50.
- Saga, Y., Hata, N., Koseki, H., and Taketo, M.M. (1997). *Mesp2*: a novel mouse gene expressed in the presegmented mesoderm and essential for segmentation initiation. *Genes Dev.* 11, 1827–1839.
- Saika, S., Ikeda, K., Yamanaka, O., Sato, M., Muragaki, Y., Ohnishi, Y., Ooshima, A., Nakajima, Y., Namikawa, K., Kiyama, H., et al. (2004). Transient adenoviral gene transfer of Smad7 prevents injury-induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium in mice. *Lab. Investig. J. Tech. Methods*



Pathol. 84, 1259–1270.

Sangphech, N., Osborne, B.A., and Palaga, T. (2014). Notch signaling regulates the phosphorylation of Akt and survival of lipopolysaccharide-activated macrophages via regulator of G protein signaling 19 (RGS19). *Immunobiology* 219, 653–660.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101.

Sasai, N., Mizuseki, K., and Sasai, Y. (2001). Requirement of FoxD3-class signaling for neural crest determination in *Xenopus*. *Dev. Camb. Engl.* 128, 2525–2536.

Sassoon, D., Lyons, G., Wright, W.E., Lin, V., Lassar, A., Weintraub, H., and Buckingham, M. (1989). Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature* 341, 303–307.

Sato, M., Muragaki, Y., Saika, S., Roberts, A.B., and Ooshima, A. (2003). Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J. Clin. Invest.* 112, 1486–1494.

Scaal, M., and Christ, B. (2004). Formation and differentiation of the avian dermomyotome. *Anat. Embryol. (Berl.)* 208, 411–424.

von Scheven, G., Alvares, L.E., Mootoosamy, R.C., and Dietrich, S. (2006). Neural tube derived signals and Fgf8 act antagonistically to specify eye versus mandibular arch muscles. *Dev. Camb. Engl.* 133, 2731–2745.

Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., Braun, T., Tobin, J.F., and Lee, S.-J. (2004). Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.* 350, 2682–2688.

Schulte, G. (2015). Frizzleds and WNT/ $\beta$ -catenin signaling--The black box of ligand-receptor selectivity, complex stoichiometry and activation kinetics. *Eur. J. Pharmacol.* 763, 191–195.

Schulte, G., and Bryja, V. (2007). The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 518–525.

Schuster-Gossler, K., Cordes, R., and Gossler, A. (2007). Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 537–542.

Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102, 777–786.

Sela-Donenfeld, D., and Kalcheim, C. (1999). Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Dev. Camb. Engl.* 126, 4749–4762.

Semënov, M., Tamai, K., and He, X. (2005). SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J. Biol. Chem.* 280, 26770–26775.

Semënov, M.V., Tamai, K., Brott, B.K., Kühl, M., Sokol, S., and He, X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol. CB* 11, 951–961.

Shao, S., Zhao, X., Zhang, X., Luo, M., Zuo, X., Huang, S., Wang, Y., Gu, S., and Zhao, X. (2015). Notch1 signaling regulates the epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner. *Mol. Cancer* 14, 28.

Sharma (1973). Wingless a new mutant in *drosophila melanogaster*. RP.

Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J.J., Lindsell, C., Bögl, O., Hayward, D., and Weinmaster, G. (1996). Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Dev. Camb. Engl.* 122, 3765–3773.

Sherry, K.P., Johnson, S.E., Hatem, C.L., Majumdar, A., and Barrick, D. (2015). Effects of Linker Length and Transient Secondary Structure Elements in the Intrinsically Disordered Notch RAM Region on Notch Signaling. *J. Mol. Biol.* 427, 3587–3597.

Shoval, I., Ludwig, A., and Kalcheim, C. (2007). Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination. *Dev. Camb. Engl.* 134, 491–501.

- Sieiro, D., Rios, A.C., Hirst, C.E., and Marcelle, C. (2016). Cytoplasmic NOTCH and membrane-derived  $\beta$ -catenin link cell fate choice to epithelial-mesenchymal transition during myogenesis. *ELife* 5.
- Sieiro Mosti, D. (2015). Cellular and Molecular events during Early Chick Myogenesis.
- Simoes-Costa, M., and Bronner, M.E. (2015). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development* 142, 242–257.
- Simon, C., Lickert, H., Götz, M., and Dimou, L. (2012). Sox10-iCreERT2: a mouse line to inducibly trace the neural crest and oligodendrocyte lineage. *Genes*. N. Y. N 2000 50, 506–515.
- Slusarski, D.C., Yang-Snyder, J., Busa, W.B., and Moon, R.T. (1997). Modulation of embryonic intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling by Wnt-5A. *Dev. Biol.* 182, 114–120.
- Smolen, G.A., Schott, B.J., Stewart, R.A., Diederichs, S., Muir, B., Provencher, H.L., Look, A.T., Sgroi, D.C., Peterson, R.T., and Haber, D.A. (2007). A Rap GTPase interactor, RADIL, mediates migration of neural crest precursors. *Genes Dev.* 21, 2131–2136.
- Sobrado, V.R., Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Holt, L.J., Nieto, M.A., Portillo, F., and Cano, A. (2009). The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *J. Cell Sci.* 122, 1014–1024.
- Solursh, M., Fisher, M., Meier, S., and Singley, C.T. (1979). The role of extracellular matrix in the formation of the sclerotome. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 54, 75–98.
- Song, J., Park, S., Kim, M., and Shin, I. (2008). Down-regulation of Notch-dependent transcription by Akt in vitro. *FEBS Lett.* 582, 1693–1699.
- Songyang, Z., Baltimore, D., Cantley, L.C., Kaplan, D.R., and Franke, T.F. (1997). Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11345–11350.
- Šošić, D., Brand-Saberi, B., Schmidt, C., Christ, B., and Olson, E.N. (1997). Regulation of paraxis expression and somite formation by ectoderm- and neural tube-derived signals. *Dev. Biol.* 185, 229–243.
- Sotillos, S., Roch, F., and Campuzano, S. (1997). The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Dev. Camb. Engl.* 124, 4769–4779.
- Städeli, R., Hoffmans, R., and Basler, K. (2006). Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr. Biol. CB* 16, R378–385.
- Streit, A., Berliner, A.J., Papanayotou, C., Sirulnik, A., and Stern, C.D. (2000). Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* 406, 74–78.
- Strutt, D. (2003). Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. *Dev. Camb. Engl.* 130, 4501–4513.
- Stuhlmiller, T.J., and García-Castro, M.I. (2012). Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3715–3737.
- Sun, T.Q., Lu, B., Feng, J.J., Reinhard, C., Jan, Y.N., Fantl, W.J., and Williams, L.T. (2001). PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* 3, 628–636.
- Tacha, D., Qi, W., Ra, S., Bremer, R., Yu, C., Chu, J., Hoang, L., and Robbins, B. (2015). A newly developed mouse monoclonal SOX10 antibody is a highly sensitive and specific marker for malignant melanoma, including spindle cell and desmoplastic melanomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 139, 530–536.
- Taelman, V.F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.-L., Fuentealba, L.C., Vorwald, P.P., Gumper, I., Sabatini, D.D., and De Robertis, E.M. (2010). Wnt Signaling Requires the Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes. *Cell* 143, 1136–1148.
- Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G., and Buckingham, M. (1997). Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 89, 127–138.
- Tajbakhsh, S., Borello, U., Vivarelli, E., Kelly, R., Papkoff, J., Duprez, D., Buckingham, M., and Cossu, G. (1998). Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Dev. Camb. Engl.* 125, 4155–4162.
- Tanda, N., Ohuchi, H., Yoshioka, H., Noji, S., and Nohno, T. (1995). A chicken Wnt gene, Wnt-11, is

- involved in dermal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *211*, 123–129.
- Taneyhill, L.A., Coles, E.G., and Bronner-Fraser, M. (2007). Snail2 directly represses cadherin6B during epithelial-to-mesenchymal transitions of the neural crest. *Development* *134*, 1481–1490.
- Tanimizu, N., and Miyajima, A. (2007). Molecular mechanism of liver development and regeneration. *Int. Rev. Cytol.* *259*, 1–48.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 131–142.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* *139*, 871–890.
- Timmerman, L.A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertrán, E., Pérez-Pomares, J.M., Díez, J., Aranda, S., Palomo, S., McCormick, F., Izpisua-Belmonte, J.C., et al. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* *18*, 99–115.
- Toker, A., and Marmioli, S. (2014). Signaling Specificity in the Akt Pathway in Biology and Disease. *Adv. Biol. Regul.* *0*, 28–38.
- Tonegawa, A., Funayama, N., Ueno, N., and Takahashi, Y. (1997). Mesodermal subdivision along the mediolateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP-4. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 1975–1984.
- Tremblay, P., Dietrich, S., Mericskay, M., Schubert, F.R., Li, Z., and Paulin, D. (1998). A crucial role for Pax3 in the development of the hypaxial musculature and the long-range migration of muscle precursors. *Dev. Biol.* *203*, 49–61.
- Truong, T.V., Supatto, W., Koos, D.S., Choi, J.M., and Fraser, S.E. (2011). Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy. *Nat Methods* *8*, 757–760.
- Tzou, M., Gazeley, D.J., and Mason, P.J. (2014). Retroperitoneal fibrosis. *Vasc. Med. Lond. Engl.* *19*, 407–414.
- Vallin, J., Girault, J.M., Thiery, J.P., and Broders, F. (1998). Xenopus cadherin-11 is expressed in different populations of migrating neural crest cells. *Mech. Dev.* *75*, 171–174.
- Van Camp, J.K., Beckers, S., Zegers, D., and Van Hul, W. (2014). Wnt signaling and the control of human stem cell fate. *Stem Cell Rev.* *10*, 207–229.
- Van Scoyk, M., Randall, J., Sergew, A., Williams, L.M., Tennis, M., and Winn, R.A. (2008). Wnt signaling pathway and lung disease. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* *151*, 175–180.
- Vandromme, M., Rochat, A., Meier, R., Carnac, G., Besser, D., Hemmings, B.A., Fernandez, A., and Lamb, N.J. (2001). Protein kinase B beta/Akt2 plays a specific role in muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* *276*, 8173–8179.
- Vasyutina, E., Lenhard, D.C., Wende, H., Erdmann, B., Epstein, J.A., and Birchmeier, C. (2007). RBP-J (Rbpsi) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4443–4448.
- Vega, S., Morales, A.V., Ocaña, O.H., Valdés, F., Fabregat, I., and Nieto, M.A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* *18*, 1131–1143.
- Verma, N.K., Fazil, M.H.U.T., Ong, S.T., Chalasani, M.L.S., Low, J.H., Kottaiswamy, A., P, P., Kizhakeyil, A., Kumar, S., Panda, A.K., et al. (2016). LFA-1/ICAM-1 Ligation in Human T Cells Promotes Th1 Polarization through a GSK3 $\beta$  Signaling-Dependent Notch Pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *197*, 108–118.
- Vervoort, michel (2013). atlas d'embryologie descriptive.
- vetopsy (2017). Embryologie générale : segmentation (vue d'ensemble et segmentation méroblastique).
- Vinson, C.R., and Adler, P.N. (1987). Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of *Drosophila*. *Nature* *329*, 549–551.
- Vinson, C.R., Conover, S., and Adler, P.N. (1989). A *Drosophila* tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* *338*, 263–264.

- Wang, S.-C., Lin, X.-L., Wang, H.-Y., Qin, Y.-J., Chen, L., Li, J., Jia, J.-S., Shen, H.-F., Yang, S., Xie, R.-Y., et al. (2015). Hes1 triggers epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like cellular marker alterations and promotes invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma by activating the PTEN/AKT pathway. *Oncotarget* 6, 36713–36730.
- Wang, T., Xuan, X., Pian, L., Gao, P., Hu, H., Zheng, Y., Zang, W., and Zhao, G. (2014). Notch-1-mediated esophageal carcinoma EC-9706 cell invasion and metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition through Snail. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 35, 1193–1201.
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., and Sarkar, F.H. (2010). The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness. *Curr. Drug Targets* 11, 745–751.
- van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., et al. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88, 789–799.
- Wicki, A., Lehembre, F., Wick, N., Hantusch, B., Kerjaschki, D., and Christofori, G. (2006). Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 9, 261–272.
- Willert, K., and Nusse, R. (2012). Wnt Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448–452.
- Williams, B.O., and Insogna, K.L. (2009). Where Wnts went: the exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 24, 171–178.
- Willis, B.C., Johnson, G., Wang, J., and Cohen, C. (2015). SOX10: a useful marker for identifying metastatic melanoma in sentinel lymph nodes. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* 23, 109–112.
- Wolfe, M.S., and Kopan, R. (2004). Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science* 305, 1119–1123.
- Wong, H.-C., Bourdelas, A., Krauss, A., Lee, H.-J., Shao, Y., Wu, D., Mlodzik, M., Shi, D.-L., and Zheng, J. (2003). Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol. Cell* 12, 1251–1260.
- Wu, J., Zhu, D., Zhang, J., Li, G., Liu, Z., and Sun, J. (2015). Lithium protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in PC12 cells via Akt/GSK3 $\beta$ /mTOR pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 465, 368–373.
- Wu, S.-Y., Ferkowicz, M., and McClay, D.R. (2007). Ingression of primary mesenchyme cells of the sea urchin embryo: a precisely timed epithelial mesenchymal transition. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 81, 241–252.
- Wu, S.-Y., Yang, Y.-P., and McClay, D.R. (2008). Twist is an essential regulator of the skeletogenic gene regulatory network in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* 319, 406–415.
- Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W., and Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 67, 2649–2656.
- Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Smallwood, P.M., Williams, J., Woods, C., Kelley, M.W., Jiang, L., Tasman, W., Zhang, K., et al. (2004). Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 116, 883–895.
- Yan, D., and Lin, X. (2009). Shaping morphogen gradients by proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002493.
- Yang, J., and Weinberg, R.A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* 14, 818–829.
- Yang, J., Wheeler, S.E., Velikoff, M., Kleaveland, K.R., LaFemina, M.J., Frank, J.A., Chapman, H.A., Christensen, P.J., and Kim, K.K. (2013). Activated alveolar epithelial cells initiate fibrosis through

secretion of mesenchymal proteins. *Am. J. Pathol.* 183, 1559–1570.

Yardley, N., and García-Castro, M.I. (2012). FGF signaling transforms non-neural ectoderm into neural crest. *Dev. Biol.* 372, 166–177.

Yu, M., Bardia, A., Wittner, B.S., Stott, S.L., Smas, M.E., Ting, D.T., Isakoff, S.J., Ciciliano, J.C., Wells, M.N., Shah, A.M., et al. (2013). Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science* 339, 580–584.

Yuan, X., Wu, H., Han, N., Xu, H., Chu, Q., Yu, S., Chen, Y., and Wu, K. (2014). Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: biological significance and therapeutic application. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 7, 87.

Zabludoff, S.D., Csete, M., Wagner, R., Yu, X., and Wold, B.J. (1998). p27Kip1 is expressed transiently in developing myotomes and enhances myogenesis. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 1–11.

Zeisberg, E.M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A.L., McMullen, J.R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W.T., Roberts, A.B., et al. (2007a). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* 13, 952–961.

Zeisberg, E.M., Potenta, S.E., Sugimoto, H., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2008). Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 19, 2282–2287.

Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M.B., Rieder, F., Tanjore, H., and Kalluri, R. (2007b). Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* 282, 23337–23347.

Zhang, P., Wong, C., Liu, D., Finegold, M., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1999). p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev.* 13, 213–224.

Zhao, M., Zhang, H., Li, Y., Ashok, A., Liang, R., Zhou, W., and Peng, L. (2014). Cellular imaging of deep organ using two-photon Bessel light-sheet nonlinear structured illumination microscopy. *Biomed Opt Express* 5, 1296–1308.

Zhao, Z.-L., Ma, S.-R., Wang, W.-M., Huang, C.-F., Yu, G.-T., Wu, T.-F., Bu, L.-L., Wang, Y.-F., Zhao, Y.-F., Zhang, W.-F., et al. (2015). Notch signaling induces epithelial-mesenchymal transition to promote invasion and metastasis in adenoid cystic carcinoma. *Am. J. Transl. Res.* 7, 162–174.

Zoni, E., van der Pluijm, G., Gray, P.C., and Kruijthof-de Julio, M. (2015). Epithelial Plasticity in Cancer: Unmasking a MicroRNA Network for TGF- $\beta$ -, Notch-, and Wnt-Mediated EMT. *J. Oncol.* 2015, 198967.

ZoologyNotes (2017). Segmentation in Animals (With Diagram) | Zoology.



Merci à tous ceux qui ont survécu à ces quelques pages qui tentent de résumer trois années de ma vie.



